

ВНЕСОК ВЧЕНИХ ХАРКІВСЬКОЇ ШКОЛИ РЕПРОДУКТОЛОГІВ ТВАРИН У РОЗВИТОК КРІОБІОЛОГІЇ

В.Ф.Коваленко, С.Г.Мироненко

Інститут свинарства ім. О.В.Квасницького УААН

А.А.Беліков

Інститут тваринництва УААН

Стаття присвячена історії розвитку кріобіології в Україні, зокрема внеску вчених Харківської школи репродуктологів тварин Інституту тваринництва УААН. Висвітлені найбільш вагомі результати по кріоконсервації гамет і ембріонів сільськогосподарських тварин. Харківською школою репродуктологів тварин, завдяки комплексності досліджень на стикові таких наук, як біологія (зокрема, фізіологія тварин на органному і клітинному рівнях), біофізика, математика і інженерія, було розкрито механізми кріоушкоджень і кріозахисту гамет і ембріонів, розкрито фізіологічні фактори підвищення приживаності трансплантованих ембріонів і розроблено високоефективну Харківську технологію кріоконсервації гамет і ембріонів та трансплантації ембріонів, яка знайшла застосування не лише в Україні, а й далеко за її межами.

Ключові слова: біотехнологія, кріобіологія, кріоконсервація, тварини, гамети, ембріон.

Кріоконсервація біоб'єктів відкрила нову еру в фізіології репродукції. Застосування низьких та наднизьких температур створило можливість фактично безстрокового збереження генофонду і транспортування біоб'єктів у будь-яку точку планети, а також стало джерелом пластичного матеріалу для досліджень у галузі репродуктивної біотехнології.

В Україні розвиток кріобіології починається з відкриття І.В.Смирновим у 1947 р. можливості зберігати життєздатність і функції клітин після кріоконсервації у межах від 78° С до 196 °С (Диплом на открытие № 103 с приоритетом от июня 1947 года, выданный Государственным комитетом изобретений и открытый СССР 12 декабря 1972 года). Пізніше вдалося на основі розробки спеціального кріоконсерванту і певного удосконалення способу охолодження реалізувати ефект вітрифікації для потреб практичної медицини і сільського господарства. Заслужений діяч науки УРСР, лауреат Державної премії України, доктор біологічних наук, професор І.В.Смирнов досить скромно оцінював значення свого наукового відкриття, однак, усі технології, які пізніше створювались і удосконалювались з метою заморожування і тривалого зберігання різних біологічних об'єктів, так чи інакше базувались на теоретичних наукових розробках цього вченого [11].

Після світового відкриття І.В.Смирнова його послідовниками був продовжений зазначений напрям досліджень і поширений на розкриття фізіологічних закономірностей репродукції плідників та маточного поголів'я.

Заслужений діяч науки і техніки України, лауреат Державної премії України, доктор біологічних наук, професор, академік УААН Федір Іванович Осташко – є автором сучасної теорії кріоушкодження та кріопротекції біологічних клітин і теорії фортифікації мембранного апарата клітин ліпідними сполуками, Харківської технології кріоконсервації та використання сперми плідників та ембріонів ссавців, а також численних технологічних розробок із підвищення репродуктивної здатності плідників і маточного поголів'я. В активі

академіка 456 опублікованих наукових праць та винаходів, дисертацій учнів і монографій. Його наукова школа, що носить назву „Харківська школа репродуктологів тварин”, істотно відрізняється від інших тим, що в ній зосереджені спеціалісти різних профілів: ветеринарної медицини, зооінженерії, біології, фізики, електротехніки і навіть радіотехніки. Це давало можливість швидко вирішувати складні експериментально-теоретичні і практичні проблеми репродуктології на стикові наук [5, 7, 9].

Починаючи з 1949 р., академік Ф.І.Осташко разом зі своїми численними учнями розробив і впровадив у виробництво перші в Україні та СРСР технології заморожування сперми бугаїв і баранів і започаткував виробниче використання новітніх біотехнологій. Підсумком його численних розробок стала створена система методів, відома в літературі під назвою “Харківська технологія кріоконсервації та використання сперми плідників та ембріонів ссавців” [6-7].

Проаналізувавши наявні на той час дослідження явища температурного шоку та базуючись на результатах своїх власних експериментів, вчений відкрив осмотичну природу температурного шоку. Це положення встановлене при заморожуванні 172 еякулятів бугаїв і 196 еякулятів баранів за режимом, при якому температура сперми від -51°C до -196°C знижувалась зі швидкістю $60 - 200^{\circ}\text{C}$ за хвилину. Після такого заморожування зберігалось 92 – 96 % еякулятів, які мали нормальну запліднювальну здатність. Було виявлено, що ступінь прояву температурного шоку сперми можна знизити шляхом ступеневого охолодження за два – три етапи і шляхом збільшення осмотичного тиску сперми, а застосування яєчного жовтка є при цьому необхідним заходом. Таким чином, було доведено, що в основі механізму температурного шоку клітини лежить ушкодження її мембранного апарату осмотичною роботою, пов’язаною зі спрямованим усередину клітини потоком води, викликаним урівноваженням концентраційного градієнта, який виникає при різкому охолодженні системи „клітина–середовище”. Отже, температурний і осмотичний шок – явища одного порядку. На підставі узагальнення даних значної кількості досліджень фізико-хімічних процесів, які відбуваються у заморожуваних розчинах, а також власних багаторічних досліджень, Ф.І.Осташко створив багатофакторну теорію кріоушкоджень і запропонував модель механізму захисту клітини. У 1974 р. на основі експериментальних даних і зазначених теоретичних положень було розроблено нову технологію заморожування сперми плідників. Важливе місце у цих досягненнях займає розроблена Ф.І.Осташком теорія фортифікації ліпофільних структур цитоплазматичної мембрани клітини, суть якої полягає у зміцненні цих структур ліпідними сполуками. Ліпідна композиція мембрани спермій містить відносно високий рівень поліненасичених жирних кислот, котрий істотно знижується протягом кріоконсервації, зокрема після фази відтавання у результаті перекисного окислення, тому додаткове зміцнення цих структур забезпечує збереження цілісності спермальної мембрани. В цілому розроблена Ф.І.Осташком разом з його учнями Харківська технологія кріоконсервації сперми бугаїв-плідників стала могутнім засобом крупномасштабної селекції тварин [8].

Не менш важливе значення мають виконані доктором ветеринарних наук, професором С.І.Сердюком дослідження фізіологічних параметрів спермопродукції і гамет кнура у зв’язку з кріоконсервацією. Вони включали вивчення сезонних змін рН сперми, її осмотичного тиску, фізіологічних станів спермій за умов використання різних кріопротектантів [10]. У 70-х рр. минулого століття С.І.Сердюк разом з кандидатом ветеринарних наук А.А.Беліковим розпочали проведення

лабораторних і виробничих експериментів стосовно пошуку оптимальних розбавників для заморожування сперми кнурів.

Розвитку біотехнології відтворення великої рогатої худоби присвятив свої роботи добре відомий вчений доктор біологічних наук, професор О.Д. Бугров, який розробив комплексний підхід до вивчення ушкоджень спермій при заморожуванні з одночасним з'ясуванням ступеня впливу окремих факторів. Разом зі своїми учнями він розкрив фізіологічні закономірності і механізм пошкодження спермій у процесі заморожування і відтавання: вплив температурного шоку, зупинок заморожування і режиму охолодження у взаємозв'язку з впливом різних кріопротекторів. О.Д. Бугровим дано обґрунтування і розвиток багатфакторної теорії кріоушкоджень спермій і намічені шляхи їх усунення методом створення оптимальних режимів заморожування в різних упаковках. Визначені зони ушкоджень і встановлені загальні закономірності ушкоджень спермій при розморожуванні з енто- і екзоцеллюлярними кріопротекторами. На основі фізіологічних і кріобіологічних досліджень виявлена роль адаптаційних і еквілібраційних процесів при заморожуванні сперми бугаїв. Виявлено, що ентоцеллюлярні кріопротектори (гліцерин, диметилсульфоксид, диметилформамид, етиленгліколь, метилцеллозоль) здатні проникати в спермії і захищати їх від кріоушкоджень. Було встановлено, що вони рівнозначно зберігають спермії після 10-секундної експозиції перед заморожуванням при температурах біля 0° і $-2-4^{\circ}\text{C}$ і процесу заморожування. Цей факт дозволив вченим передбачити, що механізм кріозахисту ентоцеллюлярних кріопротекторів полягає ще й у пригніченні окремих біохімічних реакцій в процесі заморожування, тому поєднання ентоцеллюлярних кріопротекторів з екзоцеллюлярними забезпечує вищу збереженість сперми після кріоконсервації і високу запліднювальну здатність. Розроблена технологія зберігання сперми бугаїв у рідкому азоті впроваджена в Україні та інших країнах. П'ять пристроїв і способів захищені авторськими свідоцтвами [3-4].

Цикл робіт О.Д. Бугрова разом з його учнями і колегами був присвячений проблемі прискореного розмноження високопродуктивної молочної худоби – Українській технології трансплантації ембріонів корів. Вирішивши проблему одержання повноцінних ембріонів від корів-донорів, О.Д. Бугров, О.Ф. Гончар і Д.І. Барановський запропонували розроблений ними метод одержання двійнят у молочному скотарстві на основі трансплантації двох ембріонів (по одному у кожний ріг матки для прискореного відтворення високоцінних генотипів і одержання тварин-аналогів для експериментальних цілей). Це забезпечувало підвищення тільності корів на 4-13 % і не впливало негативно на перебіг отелень, живу масу при народженні і очікувану продуктивність приплоду в порівнянні з двійнями, одержаними спонтанно [3-4].

Результатом фундаментальних досліджень з фізіологічних і біофізичних особливостей і закономірностей заморожування ембріонів стало створення технології кріоконсервації ембріонів корови на рівні збереження 90 % клітин і 40 % приживлення після трансплантації, тобто практично на рівні приживлення нативних ембріонів [3-4]. Сучасні технології трансплантації ембріонів великої рогатої худоби включають і таку ланку, як хірургічний поділ (бісекцію) ембріона навпіл із метою збільшення кількості нащадків від генетично цінних тварин. На підставі одержаних ним даних щодо осмотичних якостей ембріонів, М.Д. Бугров розробив зберігаючий метод розподілу ембріона на частини у неізотонічних розчинах. Розподілені за його методом половинки ембріонів трансплантувались свіжими або після деконсервації – по дві кожному реципієнтові, що забезпечило тільність у 33 і 30% корів, відповідно. Серед одержаних телят було до 10% моно-

зиготних двійнят. Навіть із четвертинок ембріонів теж одержували приплід [3-4].

Новий напрям робіт з експериментальної біології – кріоконсервацію ембріонів ссавців – було започатковано в Україні у 80-х рр. XX ст. роботами Ф.І.Осташка, М.Д.Безуглого, В.В.Песоцького і остаточно завершено докторською дисертацією М. Д. Безуглого під науковим керівництвом О.Д. Бугрова і Ф.І.Осташка [2]. Як і завжди, при розробці нового розділу біотехнології, виникла необхідність проведення глибоких фізіологічних досліджень, на цей раз на клітинному рівні. Перш за все було з'ясовано, що основні закономірності фізіологічної реакції яйцеклітин і ембріонів ссавців на вплив низьких температур визначаються їх осмотичними властивостями. У зв'язку з цим виникла необхідність розробити метод визначення осмотичної здатності живих клітин і їх життєздатності. Розроблений метод волюмометрії, заснований на реєстрації ступеня проникності мембрани і змін об'єму клітини в залежності від осмотичного тиску розчину, в який її переносили. Були визначені осмотичні параметри яйцеклітин і ембріонів миші, кролика, свині, вівці, кози і корови і відкритий феномен зміни кількості осмотично активної води, тобто тієї частини внутрішньоклітинної води, що слугує розчинником сухих речовин у яйцеклітинах і бластомерах ембріонів протягом оогенезу і ембріогенезу. Такі ж зміни спостерігались у формуванні системи транспорту гліцерину через цитоплазматичні мембрани під час запліднення яйцеклітин і розвитку ембріона. Виявлено, що питома проникність цитоплазматичної мембрани яйцеклітин і ембріонів до гліцерину стрибкоподібно зростає після запліднення і дроблення бластомерів. На підставі одержаних даних академік УААН М.Д.Безуглий розробив вельми важливу у теоретичному і практичному відношенні фізико-математичну модель впливу низьких температур на яйцеклітини і ембріони ссавців, яка допомогла визначити необхідність поступового зниження температури при їх заморожуванні для запобігання температурного шоку [1]. Для визначення життєздатності клітини було запропоновано поміщати її у гіпертонічний розчин хлористого натрію: життєздатні клітини при цьому зменшують свій об'єм, тоді як загиблі не реагують на зміну осмотичного тиску середовища [2]. Розроблена крапельна методика насичення і виведення кріопротекторів та прискорений режим охолодження дозволяє спростити процес кріоконсервації, а також має практичну значимість у створенні генетичного потенціалу, який можна зберігати тривалий час у спеціальних банках. Комбіноване застосування морфологічного і флуоресцентного методу оцінки життєздатності ембріонів дає змогу підвищити відбір якісних ембріонів як для заморожування, так і для пересаджування [1-2].

Перші успіхи по заморожуванню зародків ссавців були досягнуті в 1984 р., коли в Інституті тваринництва УААН отримали першу тварину (теля) після трансплантації ембріону, який зберігався в рідкому азоті при температурі -196°C . Через два роки вченими цього ж закладу проведений перший в Україні широкомасштабний дослід по транспортуванню заморожених ембріонів у Алтайський край. У результаті пересадження реципієнтам 77 ембріонів народилось 33 теляти.

У 1987 р. в Інституті тваринництва УААН з'явилися перші у світі однойцеві близнюки з половинок деконсервованого ембріона, а в 1995 – перше в Україні теля-трансплантат з “четвертинки” деконсервованого ембріона [1].

Метод заморожування ембріонів успішно використовується для збереження генофонду рідкісних та зникаючих видів ссавців, у тому числі і сільськогосподарських тварин. Так, в Інституті тваринництва УААН закладено на збереження 188 ембріонів сірої української, білоголової української і лебединської порід корів. Кріобанки зародків і статевих клітин Інституту тваринництва включені

Міністерством у справах науки і технологій до переліку національних наукових надбань [1]

Таким чином, Харківською школою репродуктологів тварин, завдяки комплексності досліджень на стикові таких наук, як біологія (зокрема, фізіологія тварин на органному і клітинному рівнях), біофізика, математика і інженерія, було розкрито механізми кріоушкоджень і кріозахисту гамет і ембріонів, розкрито фізіологічні фактори підвищення приживаності трансплантованих ембріонів і розроблено високоефективну Харківську технологію кріоконсервації гамет і ембріонів та трансплантації ембріонів, яка знайшла застосування не лише в Україні, а й далеко за її межами.

Бібліографічний список

1. Безуглий М.Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин. – Х.: Харківський біотехнологічний центр, 2002. – 160 с.
2. Безуглый Н.Д. Низкотемпературная консервация яйцеклеток и эмбрионов в биотехнологии воспроизведения сельскохозяйственных животных: Автореф. дисс. ... д-ра с.-х. наук: 06.00.27/ Институт животноводства. - Харьков. -1995.-48 с.
3. Бугров А.Д. Итоги и перспективы использования технологии трансплантации эмбрионов в скотоводстве // Научно-техн. бюл. – Х.: Институт тваринництва УААН.- 1998.-№75.-С. 3-7.
4. Вчені у галузі тваринництва. Кн. 2; Під ред. академіків УААН Г.О.Богданова, В.П.Бурката. – К.: Аграрна наука, 1999. – 424 с.
5. Вчені-селекціонери у галузі тваринництва. Кн. 1; Під ред. академіків УААН М.В.Зубця, В.П.Бурката.– К.: Аграрна наука, 1997. – 252 с.
6. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. – К.: Урожай, 1968. – 248 с.
7. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота. – К.: Аграрна наука, 1995. – 191 с.
8. Осташко Ф.И. Створення та впровадження у виробництво Харківської технології кріоконсервації гамет і зигот як засобу крупномасштабної селекції тварин: Зб. наук. пр. Ін-ту тваринництва УААН. – Х., 1999. – Вип.40. – С.48-55.
9. Осташко Федір Іванович: Бібліографічний показник наук. праць за 1952 – 2003 рр. – К.: Аграрна наука, 2004. – 104 с.
10. Сердюк С.И. Основные вопросы теории и практики искусственного осеменения свиней: Автореф. дисс. ... д-ра вет. наук: 16.807 / НИИ жив-ва Лесостепи и Полесья УССР. – Харьков, 1970. – 34 с.
11. Смирнов И.В. Техника глубокого охлаждения семени с. -х. животных: Сб. тр. Харьковского вет. ин-та за 1943-1946 гг. – 1956. – Т.VIII. – С. 45-51.

ВКЛАД УЧЕНЫХ ХАРЬКОВСКОЙ ШКОЛЫ РЕПРОДУКТОЛОГОВ ЖИВОТНЫХ В РАЗВИТИЕ КРИОБИОЛОГИИ

В.Ф.Коваленко, С.Г.Мироненко, Институт свиноводства УААН

Статья посвящена истории развития криобиологии в Украине, в частности вклада ученых Харьковской школы репродуктологов животных Института животноводства УААН. Освещены наиболее важные результаты по кріоконсервации гамет и эмбрионов сельскохозяйственных животных.

Ключевые слова: биотехнология, криобиология, кріоконсервация, животные, гаметы, эмбрион.

KHARKOV ANIMAL SCIENTISTS-REPRODUCERS CONTRIBUTION TO THE FREEZING BIOLOGY DEVELOPMENT

Kovalenko V., Mironenko S., the Institute of pig breeding, UAAS.

Belikov A., Miroshnik O., the Institute of animal science, UAAS.

This article highlights the investigations on the freezing biology developmental stages in Ukraine. The attention is focused on the animal scientists-reproducers to the livestock husbandry development in Ukraine. The scientists collaborate in the institute of animal science affiliated to the Ukrainian academy of agrarian sciences. The institute is located in the village Kulinichi, Kharkov area, Kharkov region. This article also highlights the net peak results on freezing preservation of the agricultural animal gametes & embryos. Kharkov animal scientists reproducers fulfill complex researches in biology, animal physiology, biophysics, mathematics & engineering. The scientists investigate the cells & organs. Freezing preservation & damage process impact on the gametes & embryos were studied. The biological factor impact on ET adaptation was researched. Kharkov high-efficient freezing preservation technology of the gametes & embryos was elaborated. The ET technology was developed too. These techniques are wide-spread both in Ukraine & abroad.

Key words: biological technology, freezing biology, freezing preservation, animals, germ cells, embryo.

636.082.4(09)

ІСТОРИЧНІ ТА ТЕОРЕТИКО-МЕТОДОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СТАНОВЛЕННЯ І РОЗВИТКУ БІОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ ВІДТВОРЕННЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН У КОНТЕКСТІ ДІЯЛЬНОСТІ ІНСТИТУТУ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН

В.П. Буркат, Й.З. Сірацький, Л.О. Бегма, С.І. Ковтун, І.С. Бородай

Інститут розведення і генетики тварин УААН

Висвітлено історичні та теоретико-методологічні аспекти розвитку біології і біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин. Наведено комплексну оцінку внеску вчених Київської дослідної станції тваринництва «Терезине», Центральної дослідної станції штучного осіменіння сільськогосподарських тварин та їх правонаступника – Інституту розведення і генетики тварин УААН у розробку та запровадження ефективних методів репродукції сільськогосподарських тварин.

Ключові слова: штучне осіменіння, відтворення, кріоконсервація, банк генетичних ресурсів, біотехнологія, наукова школа.

Розвиток вітчизняного тваринництва, забезпечення продовольчої незалежності України та заповнення своєї ніші у сталому загальноєвропейському господарчому комплексі перебувають у прямій залежності від розробки та запровадження ефективних методів відтворення тварин бажаного типу. Вирішальною передумовою подальшого удосконалення методів репродукції у тваринництві є розв'язання завдань біології та фізіології розмноження сільськогосподарських тварин, оптимізації технології кріоконсервації гамет, запровадження новітніх біотехнологій.

Окреслені напрями були ключовими у діяльності Київської дослідної станції тваринництва «Терезине» та Центральної дослідної станції штучного осіменіння сільськогосподарських тварин [4, 12]. З утворенням у 1975 р. на їх базі Інституту розведення і генетики тварин тривалі пошуки з розробки та