

GENETIC POLYMORPHISM OF WEST-EUROPEAN IMPORTED HORSE BLOOD GROUPS

Tur G., Rossokha V., Voroshina T., Kovaleva T., Aleshchenko O., Zaderikhina E.

Institute of animal science, UAAS

This article highlights the experimental research results on genetic analysis execution. The investigation was fulfilled on the West-European imported horse populations. Trakenenskaya, Hanover & Westfalian horse breeds are characterized by large A ad, D bcm, D de, D dk allele frequency number ($q=0,1364-0,8889$). Few D ad, D cegm, D dg allele frequencies were observed ($q=0,0062-0,0932$). Significance test was executed on D-blood group system. Significant difference was observed between Trokenenskaya & Westfalian breeds. Allele D cgm & D d frequency number differed greatly. Confidence coefficient of D cgm alleles equals $p<0,05$ & $p<0,01$ for D d allele frequency. Significant difference constitutes $p<0,05$ between Trokenenskaya & Hanover horses. Significant difference was defined by D d allele investigation. Significant differences were determined by polymorph blood group systems research. Allele spectrum was implemented. The test data were obtained for each West-European horse population. Genetic value of the above-mentioned horse breeds was defined.

Key words: allele, red blood cell anti-gene, blood groups, West-European horse breeds, horses, population, polymorphism, one-factor systems, many-factor systems, monitoring.

УДК 636.1.082:575

ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕОФИЛИЗАТА LF-7 ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ЛОШАДИ

Рецензенты: канд. с.-г. наук Ткачова Л.В., канд. с.-г. наук Шигімага В.О.

Л.Т.Добродеева*

Институт животноводства УААН

В статье приведены результаты использования митогена леофилизата LF-7 польского производства для стимуляции митоза лимфоцитов в культуре клеток домашней лошади с целью испытания препарата и снижения стоимости цитогенетического анализа. Определен оптимальный объем испытываемого митогена. Установлено, что при использовании митогена LF-7, наибольшая митотическая активность наблюдается в культуре клеток с содержанием в питательной среде RPMI-1640 глутамина. Наиболее эффективно для стимуляции митоза введение митогена LF-7 фирмы "BIOMED" в культуру лимфоцитов лошади в объеме 0,2 мл.

Ключевые слова: цитогенетика, митоген, леофилизат, хромосомы, лошадь домашняя, кариотип, культивирование, митотическая активность.

В последние годы зарубежными и отечественными учеными [1-2] было доказано значительное распространение хромосомных аномалий в патологии сельскохозяйственных животных и лошадей, в частности. В практике мирового коннозаводства замечено, что практически каждый пятый жеребенок, независимо от породы, имеет наследственные аномалии в развитии. Наследственные аномалии проявляются не только в видимых недостатках и пороках лошадей, но и в снижении жизнеспособности, обусловленном множественными нарушениями и/или микроаномалиями развития. Аномалии становятся причиной эмбриональной и раннепостнатальной смертности, физического

* Научный руководитель – канд. с.-х. наук В.И.Россоха

недоразвития и слабости иммунитета, пороков экстерьера и расстройств нервной системы, что выражается в непригодности к спорту и гужевым работам, бесплодию, репродуктивным потерям, ряду наследственно обусловленных заболеваний.

Согласно «Положения о порядке проведения генетической экспертизы происхождения и аномалий племенных животных» [3], цитогенетический контроль является неотъемлемой частью генетической экспертизы отечественных племенных ресурсов сельскохозяйственных животных. Это связано с тем, что наследование структурных aberrаций хромосом обуславливает постепенное накопление дефектов генома в популяции. Информация о носительстве хромосомных аномалий отдельными жеребцами-производителями и племенными матками позволяет селекционерам своевременно выбраковывать животных со скрытой генетической патологией и проводить племенную работу, направленную на очищение генофонда лошадей от неблагоприятного генетического груза.

Цитогенетический анализ базируется на изучении кариотипа – совокупности морфологических особенностей полного хромосомного набора, типичного для соматических клеток представителей данного биологического вида – *Equus Caballus*. Специфичность кариотипа определяется количеством хромосом, их размером и формой, а числовая и структурная стабильность хромосом является важнейшим условием формирования нормального организма в ходе онтогенеза. Источником препаратов хромосом являются лимфоциты периферической крови.

Методика цитогенетического исследования базируется на получении клеточной популяции с высокой митотической активностью. Для этого существуют прямые и непрямые методы. Прямые методы предполагают анализ клеток, которые активно делятся непосредственно в организме. Непрямые методы связаны с предварительным культивированием в питательной среде клеток, выделенных из организма. Непрямой метод получения препаратов, требующий длительного культивирования лимфоцитов периферической крови, позволяет получать значительно большее число метафазных пластинок для анализа, однако метод очень трудоемок и высокзатратен. Особенно высока себестоимость цитогенетического анализа при использовании митогена Rokeweed (PWM) (Sigma, США), который ранее дал хорошие результаты при получении культуры клеток у свиней, и, впоследствии, апробирован на лошадях [4].

Другие митогены (фитогемагглютинин, конканавалин А), используемые для стимуляции деления лимфоцитов у парнокопытных, собак и кроликов, не оказали митогенного влияния на лимфоциты лошадей.

В других источниках [5] отмечалось митогенное действие на лимфоциты лошадей конканавалина А, однако количество полученных метафазных пластинок было значительно меньшим, что снижает достоверность исследований. Кроме того, использование конканавалина А не снижает себестоимости цитогенетического анализа.

В задачу нашего исследования входила разработка получения препаратов хромосом лошади с применением более дешевого митогена LF-7 фирмы “BIOMED” (Польша), что значительно снижает стоимость цитогенетического анализа.

Материалы и методы исследований. Схема приготовления препаратов из культуры лимфоцитов включает в себя следующие этапы:

1. *Взятие крови.*
2. *Постановка культуры клеток с последующим культивированием.*
3. *Обработка клеток культуры раствором колхицина или колцемиды для блокирования митоза на стадии метафазы.*
4. *Обработка клеток гипотоническим раствором для получения свободного распределения хромосом в метафазе.*
5. *Обработка клеток фиксирующей смесью, в состав которой входят метиловый или этиловый спирт и ледяная уксусная кислота.*
6. *Приготовление непосредственно препаратов хромосом при помощи нанесения на предметное стекло осадка с зафиксированными клетками.*
7. *Окраска препаратов.*
8. *Оценка качества полученных препаратов.*

По инструкции использования леофилизата содержимое 1 ампулы растворяли в 1 мл дистиллированной воды и разводили в 6 мл раствора Хенкса. Полученный раствор вводили в питательную среду RPMI-1640 для культивирования лимфоцитов.

Культивирование лимфоцитов осуществляли в термостате при +38 °C в течение 72 часов. С целью более продуктивной оценки исследуемого митогена для культивирования использовали параллельно две среды: среда № 1 RPMI-1640 с глутамином и среда №2 RPMI-1640 без глутамин (Sigma, США). В питательную смесь вносили телячью сыворотку (Sigma, США), лектин LF-7 (BIOMED, Польша) и антибиотики (пенициллин+стрептомицин).

С целью определения оптимального количества испытываемого митогена, препарат вводили в объеме 0,1; 0,2 и 0,4 мл на 5 мл культуральной смеси.

Дальнейшие процедуры проводили по методике Графодатского А.С., Раджабли С.И. [6].

Полученные препараты хромосом оценивали по наличию и количеству метафазных пластинок, разбросу хромосом и степени их спирализации.

Результаты исследований. В результате проведенных опытов были получены препараты хромосом лошади, пригодные для цитогенетического анализа (рис. 1). Оценка этих препаратов показала, что использование митогена LF-7 польского производства позволяет получить метафазы хорошего качества и в количестве, достаточном для достоверного анализа.

Что касается определения оптимального объема исследуемого митогена, то наибольшая митотическая активность отмечалась при введении в культуры клеток 0,2 мл разведенного леофилизата, при этом в случае использования для культивирования среды RPMI-1640 с глутамином, рост культуры клеток происходил активнее, чем при использовании аналогичной среды без глутамин.

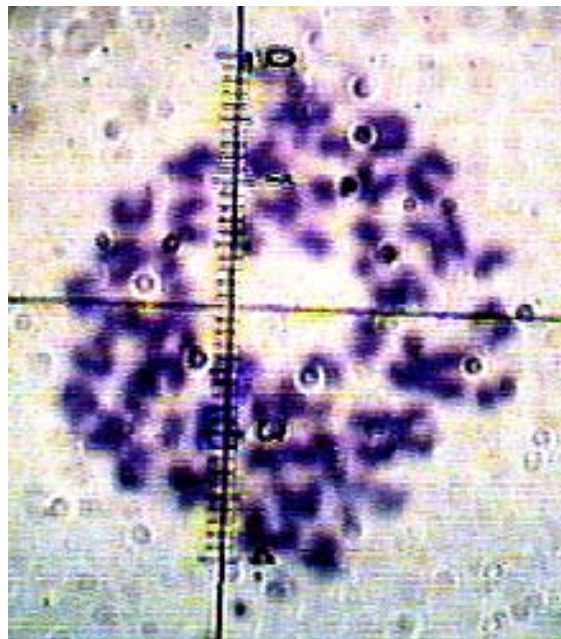
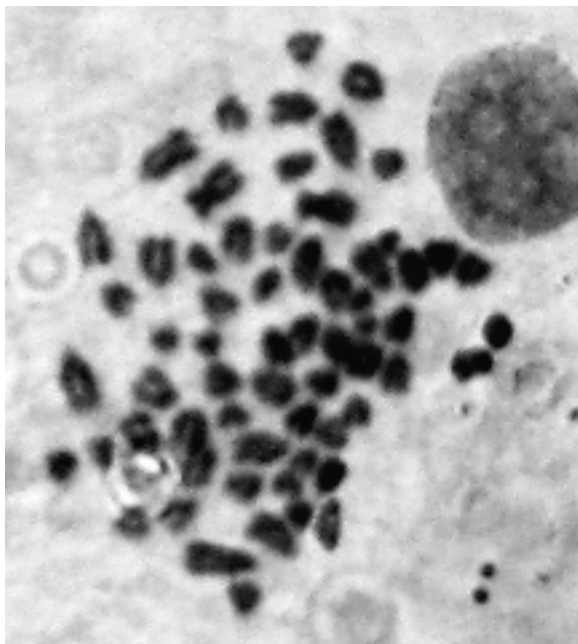


Рис. 1. Метафазные пластинки, полученные из культуры лимфоцитов периферической крови лошади, с применением митогена LF-7 польского производства.

При введении в культуры клеток исследуемого митогена в количестве 0,1 мл, метафазных пластинок было значительно меньше, а при введении 0,4 мл митогена отмечалось угнетение митотической активности лимфоцитов, причем данные результаты были отмечены в культуре клеток, где использовали среду RPMI-1640 с глутамином. При введении митогена в объемах 0,1 и 0,4 мл на 5 мл культуральной смеси с использованием среды RPMI-1640 без глутамин деление клеток не наблюдалось.

Выводы:

1. Использование митогена LF-7 фирмы “BIOMED” производства Польши эффективно для стимуляции митоза в культуре лимфоцитов лошади.
2. Применение митогена LF-7 фирмы “BIOMED” польского производства для получения препаратов хромосом лошади позволяет снизить стоимость цитогенетического анализа на 15%.
3. Наиболее эффективно для стимуляции митоза введение митогена LF-7 фирмы “BIOMED” в культуру лимфоцитов лошади в объеме 0,2 мл.
4. При изучении эффективности использования LF-7 и для стимулирования митоза в культуре лимфоцитов лошади с использованием культивирования параллельно в двух средах, установлено, что рост культуры клеток проходил активнее в питательной среде RPMI-1640, содержащей глутамин.

Библиографический список

1. Bowling A.T. Horse genetics /Bowling A.T. – CAB international. – Cambridge, 2000. – 226 p.

2. Шельов А.В. Цитогенетичні дослідження в тваринництві /Шельов А.В. // Мат. Юб. науч. конф. студ., асп. и мол. уч., посв. 100-летию со дня рожд. Л.С.Ценковского. – Одесса, 2003. – С.192.

3. Положення про порядок проведення генетичної експертизи походження та аномалій племінних тварин. – К.: ППНВ, 2006, – С.3.

4. Кленовицкий П.М. Лабораторный практикум по цитогенетике животных /Кленовицкий П.М., Моисейкина Л.Г., Живалев И.К.- Элиста, 1997.- 48 с.

5. Кленовицкий П.М. Вопросы прикладной цитогенетики сельскохозяйственных животных /[Кленовицкий П.М., Багиров В.А., Иолчиев Б.С., Доцев А.В.]. // Достижения науки и техники АПК. – 2003. - № 10. – С.17-19.

6. Графодатский А.С. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих /Графодатский А.С., Раджабли С.И. – Новосибирск: Наука, 1988. –127 с.

ЗАСТОСУВАННЯ ЛЕОФІЛІЗАТУ LF-7 ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ МІТОТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЛІМФОЦИТІВ КОНЯ

Добродєєва Л.Т., Інститут тваринництва УААН

У статті наведено результати використання мітогену леофілізату LF-7 польського виробництва для стимуляції мітозу лімфоцитів у культурі клітин свійського коня з метою випробування препарату та здешевлення цитогенетичного аналізу. Визначено оптимальний об'єм мітогену, що випробовувався. Встановлено, що при застосуванні мітогену LF-7, найбільша мітотична активність спостерігається в культурі клітин у випадку наявності в живильному середовищі RPMI-1640 глютаміну. Найефективніше для стимуляції мітозу введення мітогену LF-7 фірми "BIOMED" у культуру лімфоцитів коня в об'ємі 0,2 мл.

Ключові слова: цитогенетика, мітоген, леофілізат, хромосоми, кінь свійський, каріотип, культивування, мітотична активність.

LF-7 PREPARATION USE FOR MITOTIC LYMPHOCYTE ACTIVITY STIMULATION IN THE HORSES

Dobrodeeva L.; Institute of animal science, UAAS

This article highlights the experimental research results on LF-7 preparation use for lymphocytes mitosis stimulation in the cell culture of the domesticated horses. The medicine is based on LF-7 mitotic activity gene. The preparation was manufactured in Poland for remedy trial. Simultaneously the medicine was applied for cost reduction of genetic analysis execution. Dosage rate of the tested gene-stimulator was defined. The top mitotic activity was observed by LF-7 gene-stimulator application. The process was activated in the cell culture with RPMI-1640 glutamine content. The above-mentioned supplement was added to the nutrient medium. The optimal dosage rate of LF-7 mitotic activity gene-stimulator constitutes 0,2ml. The preparation is administrated into the horse lymphocyte culture for mitosis stimulation. 'BIOMED' firm manufactured the medicine.

Key words: cytology genetics, mitotic activity gene-stimulator, LF-7 preparation, chromosomes, domesticated horse, morphological chromosome set peculiarities, cultivation, mitotic activity.