

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ РІЗНИХ СПОСОБІВ ВИВЕДЕННЯ КРІОПРОТЕКТОРІВ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ І ДОЗРІВАННЯ ДЕКОНСЕРВОВАНИХ ООЦИТ- КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ КОРІВ

П.А.Троцький

Інститут розведення і генетики тварин УААН

У статті викладено результати досліджень щодо впливу різних способів виведення кріопротекторів на життєздатність і дозрівання in vitro деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів корів.

біотехнологія, корова, ооцити, кріопротектори, розморожування, дозрівання поза організмом

Нині інтенсивний розвиток сучасних методів агробіотехнології відкриває великі можливості кріоконсервування, тривалого зберігання та практичного використання репродуктивних клітин і ембріонів сільськогосподарських тварин залежно від потреб народного господарства. Тривале зберігання гамет обох батьків припускає необмежені варіанти їх поєднання в майбутньому, а створення ооцитобанку та банку запліднених яйцеклітин дасть змогу різко знизити витрати на отримання ембріонів та сприятиме розв'язанню цілої низки наукових проблем у розгортанні досліджень з клітинної та генної інженерії [1-3].

У пошуках способів зменшення кріопошкодження ооцитів використовують різні кріопротектори та методи заморожування, оцінюють вплив стадії дозрівання ооцитів, зміни в прозорій оболонці, збереженість клітин тощо. Безумовно, що одним з важливих факторів збереження заморожено-розмороженими клітинами своєї життєздатності є режим відтавання та спосіб видалення кріопротектора. Для цього одним з простих і зручних способів, яким ми користувались, є перенесення пайет із замороженими клітинами у холодну (+4°C) водяну баню [4-6]. Теоретичні та експериментальні розробки питань кріозахисту репродуктивних клітин і ембріонів нині спрямовані на спрощення відповідної техніки, скорочення часу заморожування й розморожування біоб'єктів. Крім цього, успіх заморожування в значній мірі залежить від умов насичення і виведення кріопротекторів, морфологічної якості клітин, стадії їх розвитку та інших чинників [7-8].

Метою досліджень було порівняти вплив різних способів виведення кріопротекторів після розморожування на життєздатність і дозрівання поза організмом ооцит-кумулюсних комплексів корів.

Матеріал і методика. Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулюсні комплекси, які отримували з яєчників корів і телиць чорно-рябої породи. Ооцитів 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 пайети і занурювали у рідкий азот.

Ооцит-кумулюсні комплекси корів культивували в чотирилунокових планшетах у краплях поживного середовища протягом 27 годин при температурі 38,5°C, 5% CO₂ у повітрі, у краплях середовища 199 з 10% попередньо інактивованою сироваткою корів, 2,5 мкг/мл ФСГ, 1,0 мкг/мл естрадіолу, 2,5 МОд/мл лютеїнізуючого гормону, 2,0 мМ натрію пірувату, 2,92 мМ кальцію лактату, 40 мкг/мл гентаміцину. На різних етапах культивування ооцити підлягали морфологічному і цитогенетичному аналізу. Цитогенетичні препарати готували за методом Tarcowski A.K. [9], забарвлювали 10%-ним розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

Результати досліджень. На рисунку наведено результати досліджень впливу різних способів виведення кріопротекторів з деконсервованих гамет на їх життєздатність і дозрівання поза організмом. В експериментальних варіантах 1, 2, 3 для виведення кріопротекторів використовували обробку клітин відповідно 0,5; 0,75 і 1,0 М розчином сахарози протягом 10 хвилин.

На рис. вказано кількість ооцитів дозрілих поза організмом до метафази-2 мейозу та з порушенням хромосомного апарату (a : c, b : d, g : f – P < 0,05; a : d, e : f – P < 0,001; різні сіперскрипти вказують на вірогідну різницю між показниками).

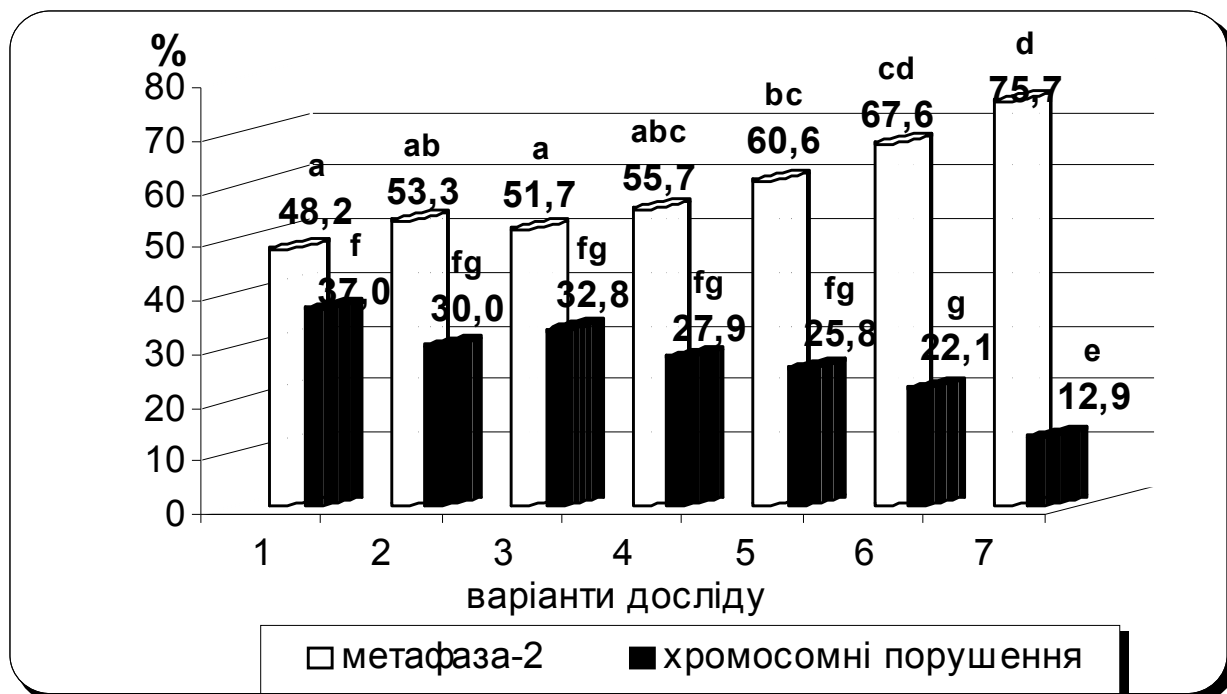


Рис. Порівняльний аналіз різних способів виведення кріопротекторів після розморожування гамет корів

У цих дослідних варіантах через 27-м годин культивування *in vitro* деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів корів стадії метафази-2 мейозу досягали 48,2; 53,3; 51,7% гамет відповідно, а показник кількості

клітин з хромосомними порушеннями в цих варіантах дослідів становив відповідно 37,0; 30,0 і 32,8%.

У трьох дослідних варіантах 4, 5, 6 після розморожування гамет корів для виведення кріопротекторів застосовували відповідно 2-х, 4-х та 10-и ступеневий спосіб. Так, у варіанті 4 ооцит-кумулюсні комплекси спочатку протягом 5 хвилин обробляли 1,0 М розчином сахарози, а потім ще 5 хв. 0,5 М розчином. У варіанті 5 гамети корів на кожному ступені по 2,5 хв. обробляли спочатку 1,0 М, потім 0,75 М, 0,5 М і 0,25 М розчинами сахарози, а у варіанті 6 – відповідно 1,0 М, 0,9 М, 0,8 М, 0,7 М, 0,6 М, 0,5 М, 0,4 М, 0,3 М, 0,2 М, 0,1 М розчинами сахарози з 1-хвилинною експозицією на кожному етапі. Дослідний варіант 7 був контролем, в якому використовували нативні ооцит-кумулюсні комплекси корів (без заморожування).

За результатами цитогенетичного аналізу після 27-ми годин культивування деконсервованих клітин спостерігали тенденцію збільшення кількості дозрілих гамет корів, а саме стадії метафази-2 мейозу досягали 55,7% ооцитів корів у варіанті 4; 60,6% - у варіанті 5; 67,6% - у варіанті 6. Кількість клітин з хромосомними порушеннями в цих експериментальних варіантах (4, 5 і 6) становила відповідно 27,9; 25,8 та 22,1%. Показники дозрівання до метафази-2 мейозу і кількість клітин з хромосомними порушеннями у контрольній групі були відповідно 75,7% і 12,9%.

Висновок. Таким чином, за результатами наших досліджень встановлено ефективність різних способів виведення кріопротекторів після розморожування ооцит-кумулюсних комплексів корів. Показники рівня дозрівання поза організмом деконсервованих гамет корів до метафази-2 мейозу та хромосомних порушень прокультивованих клітин свідчать про перевагу ступеневого способу виведення кріопротекторів у порівнянні з варіантами (із застосуванням 1,0 М; 0,75 М; 0,5 М сахарози) одноступеневого способу.

Бібліографічний список

1. Безуглий М.Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин.- Х., 2002.- 155с.
2. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизводства крупного рогатого скота.- К.: Аграрна наука, 1995.- 183 с.
3. Мельничук Д.О., Гузеватий О.Є. Перспективи біотехнології у тваринництві //Вісник аграрної науки.- 2002.- №12.- С.3-11.
4. Papis K., Shimizu M., Izake Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. Theriogenology. 2000, V.54, №5, P. 651-658.
5. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method /K. Misumi, M. Suzuki, S Sato, N. Saito. //Theriogenology.- 2003, V.60, I.2.- P.253-260.
6. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer /Atabay E.S., Takahashi Y., Kaatagiri S. et al. //Theriogenology. 2004.- V.61, I.1.- P.15-23.
7. In vitro development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocyst /Cuellar C., Gil M.A., Parrilla I. et al. //Theriogenology. 2004.- V.62, I.6.- P.1144-1152.

8. Polge C. Freezing of gametes and development of embryo technologies in farm animals. Acta. Agr. Scandinavica. Section A. //An. Sci. 1998.- №29.-P.5-11.
9. Tarkowski A.K. An air drying method for chromosoma preparation from mouse eggs. Cytogenetics. 1966.-V.5.- P. 394-400.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗНЫХ СПОСОБОВ ВЫВЕДЕНИЯ
КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И СОЗРЕВАНИЕ
ДЕКОНСЕРВОВАННЫХ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ КОРОВ**

П.А. Троцкий

Институт разведения и генетики животных УААН

В статье изложены результаты исследований по влиянию различных способов выведения криопротекторов на жизнеспособность и созревание in vitro деконсервированных ооцит-кумулусных комплексов коров.

**THE COMPARATIVE ANALYSIS OF THE VARIOUS CRYOPROTECTORS CREATION
TECHNIQUES IMPACT ON VIABILITY AND MATURATION OF THE DECONSERVATED
OOCYTES CUMULOUS COMPLEXES OF THE COWS**

P.A. Trotskiy

The institute of animal breeding and genetics UAAS

This article highlights the results of the investigations concerning various cryoprotectors creation techniques impact on viability and maturation in vitro of the deconserved oocytes cumulous complexes of the cows.

УДК 636.1.026:575

**ПОРІВНЯЛЬНА ІМУНОГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА
ПОПУЛЯЦІЙ УКРАЇНСЬКОЇ ВЕРХОВОЇ ПОРОДИ КОНЕЙ
ПРОВІДНИХ КІННИХ ЗАВОДІВ УКРАЇНИ**

Г.М.Тур, В.І.Россоха, Т.Л.Ворошина, С.К.Бакшеєва, М.М.Біденко

Інститут тваринництва УААН

У статті викладено результати вивчення імуногенетичного профілю трьох популяцій української верхової породи, коней. Визначено частоти та спектр антигенів за основними системами груп крові.

**антигени еритроцитарні, групи крові, імуногенетичний профіль,
популяція, українська верхова порода коней, селекція**

Методи популяційної імуногенетики, як ніякі інші, доступні зоотехнії, показують особливості і природу генетичних процесів, які відбуваються при селекції сільськогосподарських тварин. Аналіз за антигенами груп крові та варіантами біохімічного поліморфізму надає реальні умови для прямого контролю динаміки концентрації алелів і генотипів, зміни генофонду типів при вдосконаленні популяцій методом лінійного розведення.

У конярстві на сьогодні генетичні маркери використовуються, головним чином, при вирішенні питань контролю достовірності походження та ідентифікації коней на іподромах, кінних заводах і фермах [2-3, 7].