

ИСТОЧНИКИ МИКРОМИЦЕТНОЙ КОНТАМИНАЦИИ СПЕРМЫ ХРЯКОВ

О.С. Мирошникова, Институт животноводства УААН

Приведены результаты исследований по изучению путей микромицетной контаминации спермы хряков. Источниками микромицетов являются половые органы хряков, воздух производственных помещений для содержания хряков и пункта искусственного осеменения, разбавитель для спермы и его ингредиенты.

THE SOURCES OF MICROMYCETAL CONTAMINATION OF BOAR SEMEN

O.S. Miroshnikova, The Institute of Animal Science UAAS

This article highlights the investigation results of fungal boar semen contamination. Fungus sources are sex organs of boar, contaminated air in the industrial premises where the boar are kept and artificial insemination station, semen diluent and it's ingredients.

УДК 57.08:636

ВИЗНАЧЕННЯ УМОВ ЗАСТОСОВНОСТІ КІЛЬКІСНОГО МЕТОДУ ОЦІНКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ЕМБРІОНІВ ССАВЦІВ

Ю.Г. Міщенко, Л. В. Горбунов

Інститут тваринництва УААН

Визначено умови застосовності кількісної оцінки життєздатності ембріонів корови, якими є показники приживлюваності - імовірність розвитку в культурі in vivo - H_i . Вони приймають наступні значення в залежності від якості ембріона (відмінної, доброї, задовільної) і стадії його розвитку: пізня морула - 40,9; 32,9; 21,7 %, бластоциста рання - 53,6; 45,0; 17,5 %, бластоциста розширена 57,5; 39,7; 23,4 %, відповідно. Встановлені величини середньоквадратичного відхилення життєздатності ембріонів миші й корови, що характеризують їх біологічну різноякісність, зумовлену якістю і стадією розвитку ембріона, становлять від 6 до 11,6 %.

різноякісність, ембріони ссавців, кількісний метод оцінки життєздатності

Найбільш розповсюдженим критерієм оцінки й оптимізації різних кріобіотехнологічних досліджень є рівень схоронності біооб'єкта. Однак ця величина має широку варіабельність ($C_v \approx 10 \div 200$ %) і залежить від ряду факторів, таких як біологічна різноякісність ембріонів і різні критерії оцінки їхньої придатності для подальшого використання.

У свою чергу, біологічна різноякісність ембріонів зумовлена такими показниками, як якість самого ембріона, стадія розвитку ембріона, вид ссавця, від якого отримано біооб'єкт, порода тварини, умови годівлі й утримання тварин. Необхідно відзначити, що врахування цієї величини нині не проводиться. Аналіз різноякісності можна проводити за допомогою застосування кількісного методу оцінки життєздатності ембріонів ссавців [1-2]. Однак для використання такого способу необхідно визначити умову його застосовності.

Метою роботи було - встановити умови застосовності кількісного методу оцінки життєздатності ембріонів ссавців для врахування їхньої біологічної різноякісності.

Матеріал і методика досліджень. Об'єктами дослідження є ембріони миші і великої рогатої худоби (ВРХ), що знаходилися на різних стадіях розвитку.

Усі маніпуляції з біооб'єктом - пошук, відмивання та підготовку до експериментів проводили за загальноприйнятими методиками [3]. Оцінку життєздатності ембріонів проводили за морфологічними показниками. Функціональний стан ембріонів встановлювали за зовнішніми ознаками, а також за результатами їхнього культивування *in vitro* і *in vivo* [4].

Для обчислення величини схоронності (S) біооб'єкта на різних біотехнологічних етапах застосовували якісний метод оцінки (формула 1), а визначення життєздатності (V) ембріонів проводили за допомогою розрахункового способу оцінки (формула 2) [5]:

$$S_j = \frac{n_j}{N} \cdot 100\%, \quad (1) \quad V_j = \frac{\sum_{i=1}^k H_i n_i}{N} \cdot 100\%, \quad (2)$$

де: n_j - кількість ембріонів придатної якості на j -м етапі кріоконсервування; N - початкова загальна кількість ембріонів; k - кількість груп ембріонів різної якості (відмінної, доброї, задовільної); i - номер групи; n_i - кількість ембріонів певної якості після заморожування або культивування; H_i - імовірність розвитку свіжоотриманого біооб'єкта i -тої якості в умовах *in vivo* і *in vitro*.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за загальноприйнятим [6] і запропонованим способами [5]. Середньоквадратичне відхилення σ_1 для якісного і σ_2 для кількісного методів визначали за допомогою наступних формул:

$$\sigma_1 = \sqrt{M_j(100 - M_j)}, \quad (3) \quad \sigma_2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k (M_j - M_{ji})^2}{N-1}}, \quad (4)$$

де: M - величина схоронності (життєздатності) ембріонів.

Результати досліджень. Для з'ясування умови застосовності кількісного методу оцінки життєздатності ембріонів визначили показники імовірності розвитку ембріона в культурі *in vivo* і *in vitro* - H_i на основі аналізу власних і літературних даних [7-10]. Показники H_i є усередненими величинами приживлюваності (П) ембріонів корови (табл. 1) і схоронності (S_i) ембріонів миші за результатами їхнього культивування (табл. 2).

Варто вважати, що показник H_i дорівнює величині приживлюваності ембріонів корови при індукованому еструсі телиць-реципієнтів унаслідок застосування синхронізації статевих циклів корови-донора і реципієнта для забезпечення максимального рівня досліджуваної величини. Усі інші дані

мають незначні розбіжності ($p < 0,05$), що дає можливість їх усереднити і подати у вигляді однієї вибірки.

1. Величини імовірності розвитку в культурі *in vivo* (H_i , %) для ембріонів корови

Якість ембріона	Стадія розвитку ембріона							
	морула пізня		бластоциста рання		експандована бластоциста		розширена бластоциста	
	П, %	H_i , %	П, %	H_i , %	П, %	H_i , %	П, %	H_i , %
Відмінна	51,7	51,7	52,7	53,6	54,5÷51,1	54,5	55,8÷59,2	57,5
Добра	39,3	39,3	41,4	45,0	50,5÷21,4*	50,5	39,7	39,7
Задовільна	21,7	21,7	17,5	17,5	-	-	23,4	23,4

Примітка. П – приживлюваність; * – величини приживлюваності ембріонів корови при індукованому і спонтанному еструсі телиць-реципієнтів відповідно, представлених у літературі [7-10].

Величини імовірності розвитку в культурі *in vitro* (H_i , %) для ембріонів миші 8-ми клітинної стадії розвитку

Якість	H_i , %
Відмінна	52,4±7,5
Добра	49,5±4,3
Задовільна	-

Необхідно зазначити, що відносно ембріонів миші існуючих даних недостатньо для визначення коефіцієнта H_i , тому встановлення умови застосовності кількісного способу обліку їхньої різноякісності. Це призводить до необхідності проведення додаткових експериментів у цьому напрямі.

На першому етапі визначили величини приживлюваності та життєздатності, а також їхнє середньоквадратичне відхилення ембріонів корови у залежності від вихідної

якості ембріонів і від стадії їхнього розвитку (рис. 1). Для встановлення переваги кількісного способу статистичної обробки проводили співставлення представлених результатів із літературними даними, отриманими з використанням якісного методу [1, 8].

За попередніми даними встановлено, що величина середньоквадратичного відхилення приживлюваності ембріонів, у залежності від різної якості, практично не змінюється і становить близько 45 %, а життєздатності - 8-15 %. Рівень приживлюваності варіює від 22 до 51%, життєздатності - від 5 до 25 % (див. рис. 1а).

Розрахунок величини життєздатності та її середньоквадратичного відхилення за допомогою кількісного методу оцінки наведемо на прикладі для ембріонів корови відмінної, доброї і задовільної якості на стадії розвитку пізня морула.

Для цього випишемо значення $H_{\text{відм}}=51,7$ %, $H_{\text{добр}}=39,3$ %, $H_{\text{задов}}=21,7$ %, що відповідають даному випадку, а також загальну (456) кількість свіжоотриманих ембріонів і ту кількість, що прижилася (89 - відмінно, 79 - добре, 18 - задовільно).

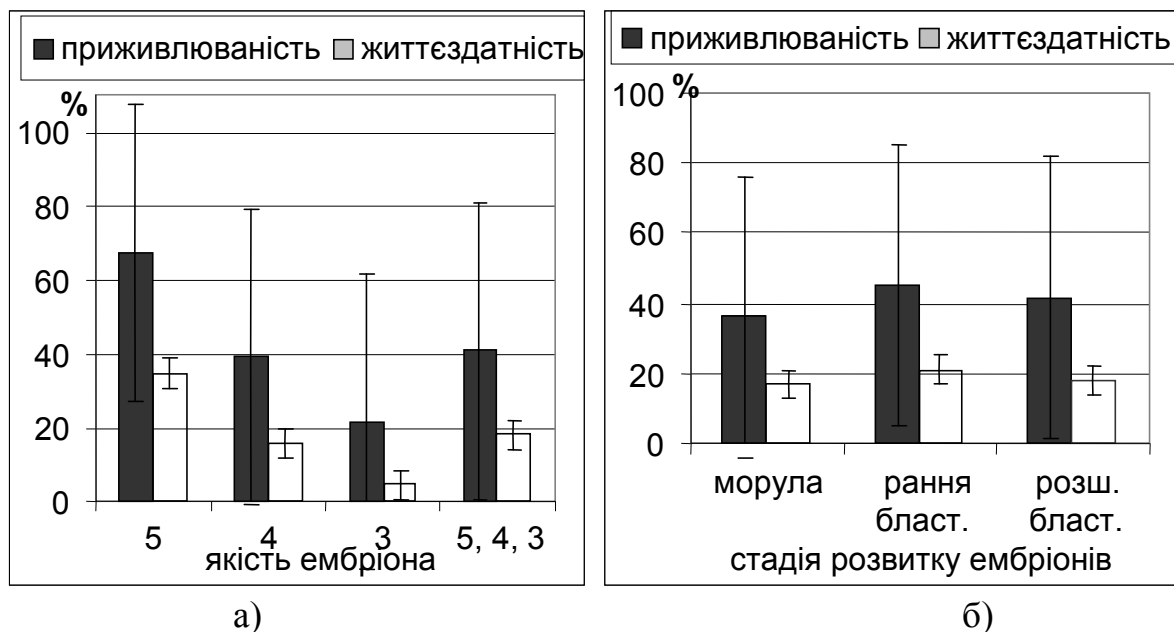


Рис. 1. Величини приживлюваності, життєздатності та їх середньоквадратичне відхилення ембріонів корови в залежності від вихідної якості (а) (пізня морула) і від їхньої стадії розвитку (б)

Використовуючи формулу 2, одержимо:

$$V = \frac{89 \cdot 0,52 + 79 \cdot 0,39 + 18 \cdot 0,22}{456} \cdot 100\% = 17,8\%$$

Середньоквадратичне відхилення величини життєздатності розраховували у такий спосіб:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(17,8 - 51,7)^2 \cdot 89 + (17,8 - 39,3)^2 \cdot 79 + (17,8 - 21,7)^2 \cdot 18}{455}} = 15,2\%$$

На другому етапі нашої роботи кількісно оцінили вплив стадії розвитку ембріону на величину середньоквадратичного відхилення схоронності і життєздатності деконсервованих ембріонів миші (рис. 2а) і корови (рис. 2б).

Середньоквадратичне відхилення σ розглянутих показників при якісному методі оцінки коливається від 11,8 до 52,2 %, а при кількісному - від 5,5 до 11,6 %. Слід зазначити, що після деконсервації (див. рис. 2) середньоквадратичне відхилення досліджуваних параметрів значно змінює свою величину в порівнянні з її варіабельністю після культивування у вищезгаданому прикладі (див. рис. 1).

При використанні кількісного статистичного аналізу величини середньоквадратичного відхилення σ у 5÷10 разів нижче, ніж при якісному.

Тому, застосування кількісного методу оцінки життєздатності дозволяє проводити багатофакторний дисперсійний аналіз, що дає можливість визначити кількісний внесок кожного фактора, що обумовлює різноякісність ембріонів, на аналізовані величини схоронності і життєздатності біооб'єкта.

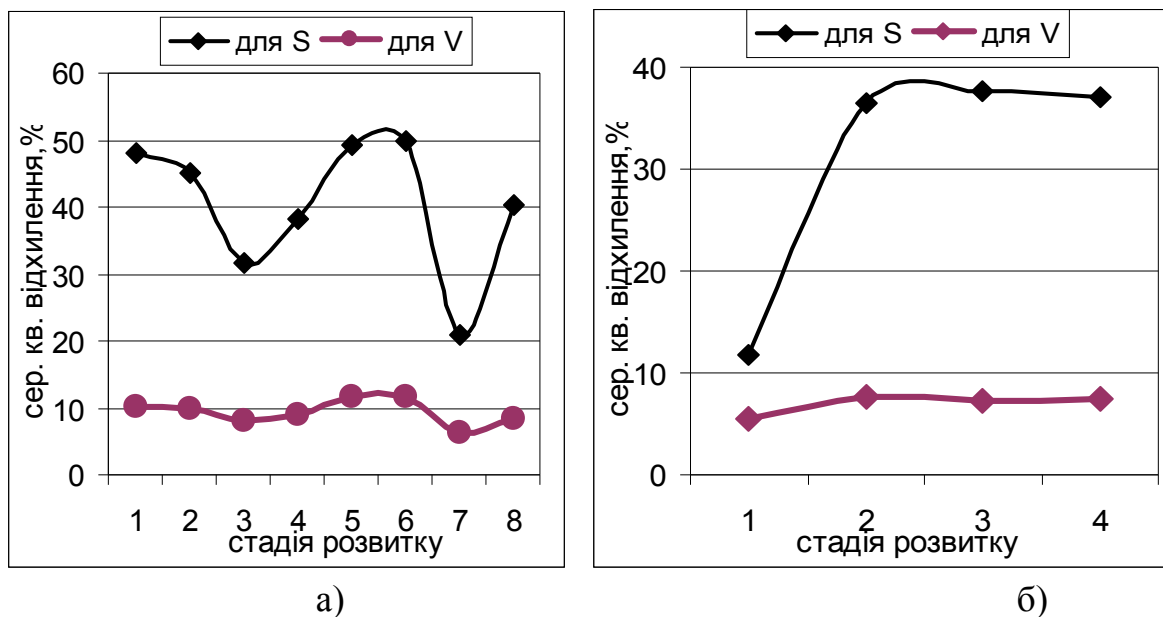


Рис. 2. Величини середньоквадратичного відхилення σ схоронності і життєздатності ембріонів миші (а) і корови (б), в залежності від їхньої стадії розвитку:

для миші: 1- одноклітинні, 2 - двоклітинні, 3 - восьмиклітинні ранні,
4 - восьмиклітинні компактизовані, 5 - морула рання,
6 - компактна морула, 7- рання бластоциста, 8 - розширена бластоциста;
для корови: 1- восьмиклітинні, 2 - компактна морула, 3 - рання бластоциста,
4 - розширена бластоциста).

Висновки:

1. Визначено умови застосовності кількісного методу оцінки життєздатності ембріонів корови, якими є величини приживлюваності - імовірність розвитку в культурі *in vivo* H_i в залежності від якості ембріона (відмінна, добра, задовільна): пізня морула - 40,9; 32,9; 21,7 %, бластоциста рання - 53,6; 45,0; 17,5 %, бластоциста розширена 57,5; 39,7; 23,4 %.

2. Встановлено варіацію величин середньоквадратичного відхилення життєздатності культивованих *in vivo* ембріонів корови різної якості і стадії розвитку, що становлять відповідно 8 % і 15 %. Рівень життєздатності при цьому змінюється від 5 % до 25 %.

3. Кількісно визначений вплив стадії розвитку деконсервованих ембріонів миші і корови на величину середньоквадратичного відхилення життєздатності, що варіює від 5,5 % до 11,6 %.

4. Запропонований методологічний підхід до оцінки життєздатності ембріонів миші та корови дає змогу значно знизити кількість біооб'єкта, необхідного для тримання достовірного результату, що, у свою чергу, зменшує витрати часу та коштів при проведенні досліджень у цьому напрямі.

Бібліографічний список

1. Горбунов Л.В., Бучацкий Л.П. Крיוконсервация половых клеток и эмбрионов / Монографія. – К., 2005. – 325 с.

2. Горбунов Л.В. Кількісний спосіб оцінки життєздатності ембріонів ссавців // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. – Біла Церква. - 2001. - №17. – С. 30-34.

3. Манк М. Биология развития млекопитающих.- Москва:Мир,1990.– 406 с.

4. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота: Руководство для пересадки эмбрионов /Кауффольд П., Тамм И., Шихов И.Я. и др. – М.: Агропромиздат. – 1990. -56 с.

5. Горбунов Л.В., Салина А.С. Оценка эффективности технологии криоконсервации ооцитов и эмбрионов млекопитающих //Проблемы криобиологии. - Х.-2005.- №3.- С. 255-262.

6. Лакин Б.Ф. Биометрия.- Москва: Высшая школа, 1990. - 254 с.

7. Бугров А.Д., Невинный Н.А. Приживляемость эмбрионов в зависимости от качества эмбрионов и желтого тела реципиента //Трансплантація ембріонів. – Жоди́но, 1989. - С. 101-102.

8. Бугров А.Д., Тарасенко Н.В., Ткачева И.В. Влияние качества развития эмбрионов на их приживляемость //Матер. Межд. науч.-произв. конф., "Интенсификация производства продуктов животноводства". – Жоди́но, 2002. - С. 16.

9. Кот В.С. Влияние длительности и температуры хранения до и после замораживания на приживляемость эмбрионов крупного рогатого скота: Дис. ... канд. с/х наук. – Х. – 1996.- С. 111.

10. Бугров О.Д., Тарасенко М.В., Субота О.В. Вплив стадії розвитку ембріонів на їх приживлюваність //НТБ. - №53. – Х.: ІТ УААН. – 2003. - С. 24-30.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСЛОВИЙ ПРИМЕНИМОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО МЕТОДА ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Ю.Г. Мищенко, Л. В. Горбунов, Институт животноводства УААН

Определены условия применимости количественной оценки жизнеспособности эмбрионов коровы, которыми являются показатели приживляемости - вероятность развития в культуре in vivo - Н_г. Они принимают следующие значения в зависимости от качества эмбриона (отличное, хорошее, удовлетворительное) и стадии его развития: поздняя морула – 40,9; 32,9; 21,7 %, blastocysta ранняя – 53,6; 45,0; 17,5 %, blastocysta расширенная – 57,5; 39,7; 23,4 %, соответственно. Установленные величины среднеквадратического отклонения жизнеспособности эмбрионов мыши и коровы, характеризующие их биологическую разнокачественность, обусловленную качеством и стадией развития эмбриона, составляют от 6 до 11,6 %.

THE MAMMAL EMBRYO VIABILITY EVALUATION TECHNIQUE

J.G. Myshchenko , L.V.Gorbunov, The institute of animal science, UAAS

This article highlights the cow embryo viability assessment & the prognosis of their development in-vivo H_g medium. Embryogeny is rated by choice, high, low & poor grades. The embryo development comprises 3 stages. Morulation ranges 40,9; 32,9; 21,7 %. Blastocyte at the early stage of development ranges 53,6; 45,0; 17,5 % & blastocyte at the late stage of development constitutes 57,5; 39,7; 23,4 % respectively. Error mean square of cow & mouse embryo viability constitutes 6-11,6 %. Their viability is conditioned by the embryo development stage.