



УДК 576.316:636.1.082

ХРОСОМНЫЕ ПАТОЛОГИИ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ НАРУШЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ СПОСОБНОСТИ ЛОШАДЕЙ

Добродеева Л.Т., н. с.

Институт животноводства НААН

С целью контроля хромосомных нарушений в половых клетках жеребцов цитогенетически исследовали сперму 8 животных. Препараты для анализа готовили из замороженной спермы. Изучение хромосомных аномалий в спермиях проводили с применением молекулярного FISH метода. Для определения анеуплоидии использовали специфические зонды для гетеросом. Для контроля плоидности клеток использовали зонд для аутосомного гена EGFR. Применение FISH метода позволило определить частоту встречаемости хромосомных аномалий в сперматозоидах жеребцов.

Ключевые слова: цитогенетика, хромосома, сперматозоид, бесплодие, анеуплоидия.

В коневодстве основным показателем, обеспечивающим развитие и реализацию селекционного процесса, является репродукция поголовья. На сегодняшний день в коневодстве стоит проблема прохолостов и абортот. Каждый прохолост кобылы определенным образом снижает экономическую эффективность коневодства [1,2]. Негативное влияние на репродуктивную функцию лошадей могут оказывать: спортивные нагрузки, стрессы, снижение иммунитета, гормональные нарушения, инфекционные факторы, хромосомные нарушения, возраст. Отмечено, что после пяти лет использования конематок в условиях конного завода значительно увеличивается уровень прохолостов (более 57%). Установлено, что наиболее вероятной причиной этого является ранняя эмбриональная смертность на начальных стадиях беременности [3]. Детальный анализ показателей воспроизводства коней на конных заводах и племрепродукторах выявил, что процент зажеребляемости составляет в среднем 65,3%. Одновременно на конных заводах зарегистрирован довольно высокий процент абортот, мертворожденных и слабо-рожденных жеребят – 10,7% [4].

К прохолостам приводит не только физиологическое состояние конематок, но и так называемый мужской фактор. Не менее чем в 50% случаев беременность не наступает в связи с нарушением сперматогенеза и эякуляции. Морфологический анализ сперматозоидов не дает информации о наличии хромосомных или генных отклонений в ядрах сперматозоидов, а одной из причин нарушения репродуктивной функции может являться наследственная патология, связанная либо с аномалиями хромосом (как числовыми, так и структурными), либо с генными мутациями. Причиной невынашивания беременности могут являться хромосомные нарушения у плода. Не следует забывать, что половину генетического материала зародыш получает от отца. Тем самым и хромосомные нарушения могут иметь отцовское происхождение. В связи с этим, существует большая вероятность того, что мужской фактор может повлиять на потерю беременности. Носительство подобных аномалий как самцом, так и самкой могут явиться причиной хромосомных нарушений у зародыша и если эти нарушения несовместимы с его нормальным развитием, то беременность может замереть, спонтанно прерваться.



Различные хромосомные нарушения могут выявляться как в сперматозоидах, так и в яйцеклетке. Нарушения числа хромосом в половых клетках родителей возникают достаточно часто, и хромосомный дисбаланс, вызванный нехваткой или удвоением хромосом, как правило, приводит к нарушениям развития эмбриона на любом этапе: отсутствию имплантации, самопроизвольному прерыванию беременности или рождению плода с тяжелым наследственным заболеванием.

При цитогенетическом обследовании лиц с мужским бесплодием у 5–15 % из них обнаруживают нарушения кариотипа при анализе лимфоцитов периферической крови [5]. В то же время, в ряде случаев при нормальном кариотипе в соматических клетках могут определяться значительные нарушения числа и структуры хромосом половых клеток. Хромосомная патология часто сопровождается глубоким нарушением сперматогенеза.

С помощью стандартных критериев, таких, например, как концентрация гамет, их подвижность и морфология, не всегда возможна точная оценка оплодотворяющей способности сперматозоидов. Даже, несмотря на значительные отклонения от нормативов, фертильность может сохраняться, и, наоборот, при нормозооспермии и исключенном женском факторе беременность не наступает [6].

Причины, вызывающие хромосомные нарушения при образовании гамет (яйцеклеток и сперматозоидов), остаются недостаточно изученными.

Поэтому, исследование кариотипа (визуальная оценка хромосомного набора) на сегодняшний день является неотъемлемой частью при выяснении причин бесплодия, повторных самопроизвольных выкидышей. Применение цитогенетических методов может способствовать распознаванию некоторых причин снижения плодовитости или полного бесплодия и прогнозу в отношении потенциального использования в воспроизводстве. Традиционный спермиологический анализ позволяет судить о количестве сперматозоидов, их подвижности, жизнеспособности и морфологии, наличии незрелых половых клеток [7]. Однако, данный метод не дает полной картины состояния каждой из стадий гаметогенеза.

Цитогенетические исследования, проведенные на других видах сельскохозяйственных животных, показали, что для каждого вида характерны только определенные хромосомные нарушения. Так, для крупного рогатого скота характерной является робертсоновская транслокация. В ее создании могут принимать участие все акроцентрические хромосомы, но чаще всего отмечено соединение между 1 и 29 парой. Наличие транслокации 1;29 зарегистрировано более чем у 50 пород, прежде всего, мясных [8].

Для свиньи домашней из нарушений кариотипа характерны взаимные транслокации. Большинство этих транслокаций возникают *de novo*. Носители сбалансированных взаимных транслокаций являются фенотипически нормальными, но характеризуются пониженной плодовитостью и передают это нарушение кариотипа потомкам, способствуя быстрому распространению этого генетического дефекта в популяции.

У лошадей чаще всего встречается анеуплоидия половых хромосом в форме простой моносомии (63,X), либо в виде двух клеточных линий (63,X/64,XX) [9]. В связи с имеющейся информацией, необходимо исследовать хромосомный набор половых клеток для исключения гонадного мозаицизма.



В настоящее время одним из информативных подходов к анализу хромосомных нарушений в половых клетках является метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с применением специфических зондов (фото 1).

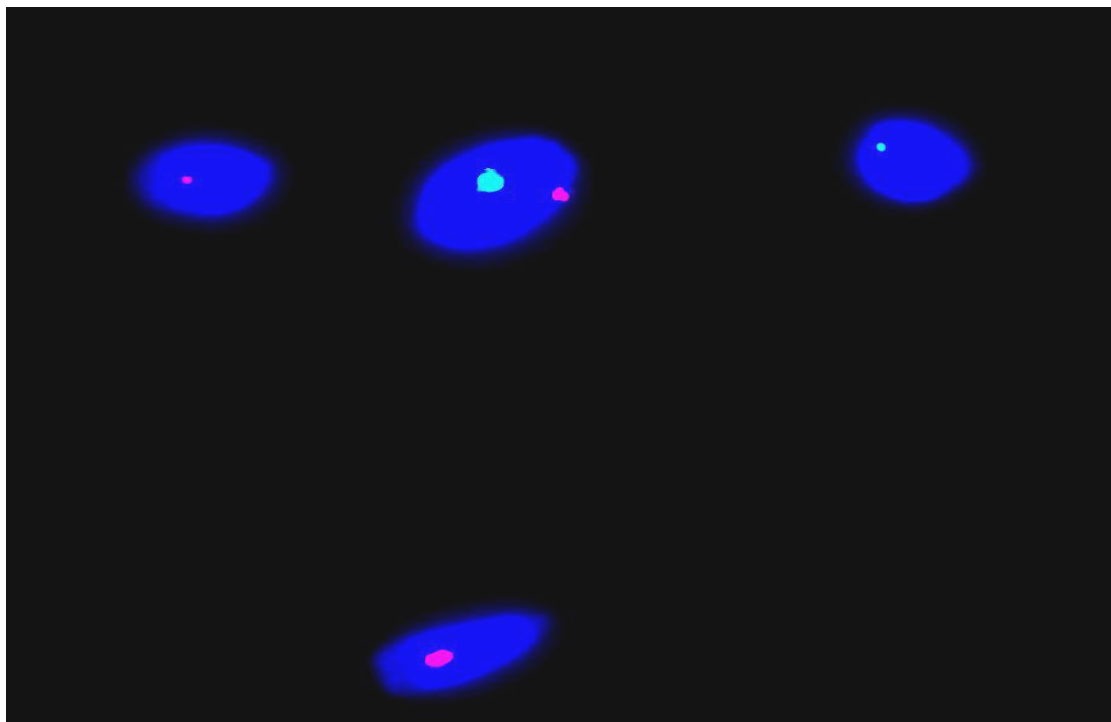


Фото 1. FISH исследование сперматозоидов. Представлены нормальные сперматозоиды с одиночным цветовым сигналом, т.е. с X или Y хромосомой и сперматозоид с патологией (одновременно содержит сигналы разных цветов X и Y хромосомы).

Целью настоящего исследования явилось определение частоты нарушений сегрегации гоносом в половых клетках жеребцов методом FISH.

Материалы и методы исследований. Исследованы образцы спермы от 8 жеребцов. Анализ проводили молекулярно-цитогенетическим методом FISH. На деконденсированных сперматозоидах была выполнена многоцветная FISH с зондами для гетеросом и зондом для аутосомного гена EGFR.

Сперматозоиды сохранялись в замороженном состоянии при -20°C . Размораживали при комнатной температуре. Каждый образец 5-кратно разводили физиологическим раствором (0,9% NaCl) и тщательно перемешивали. После 5 минут центрифугирования надосадочную жидкость удаляли, добавляли 50 μl 0,9% NaCl и перемешивали при помощи пипетки.

На охлажденное предметное стекло наносили одну каплю (около 10 μl) отмытого семени, накрывали покровным стеклом и путем надавливания на него распределяли суспензию по всей поверхности предметного стекла. Приготовленные таким образом препараты сушили при комнатной температуре. Концентрацию клеток контролировали под фазово-контрастным микроскопом. Препараты обезвоживали в этиловом спирте не менее 12 часов при 4°C . После чего, вновь сушили при комнатной температуре.

Подготовленные таким способом препараты далее подвергались процедуре флуоресцентной гибридизации *in situ*: деконденсации, мечению генов, гибридизации хромосом с последующей постгибридизацией. Препараты половых клеток эякулята для FISH-анализа готовили по M. Guttenbach и соавт. [10,11]. Использо-



вали ДНК-пробы, специфичные для гомосом X и Y. Для контроля ploидности метили ген EGFR, который находится у лошади на хромосоме 4 (4p12).

Результаты исследований. Молекулярно-цитогенетическим методом FISH было исследовано 17540 половых клеток. С целью выявления аномальных наборов хромосом в клетках спермы жеребцов методом гибридизации *in situ* использовали три различных зонда: два зонда, метящие целиком половые хромосомы X и Y, и специфический зонд для гена EGFR, локализованного на 4-й хромосоме. Зонд вместе с геном EGFR, который находится на аутосоме, позволил оценивать ploидность изучаемых клеток. Нормальные сперматозоиды после гибридизации содержали в себе одиночный флуоресцирующий сигнал, в то время как сперматозоиды, несущие в себе аномалию, содержали иное количество сигналов (фото 2). Применение зонда для гена EGFR способствовало толкованию тех случаев, когда отсутствовал сигнал половой хромосомы.

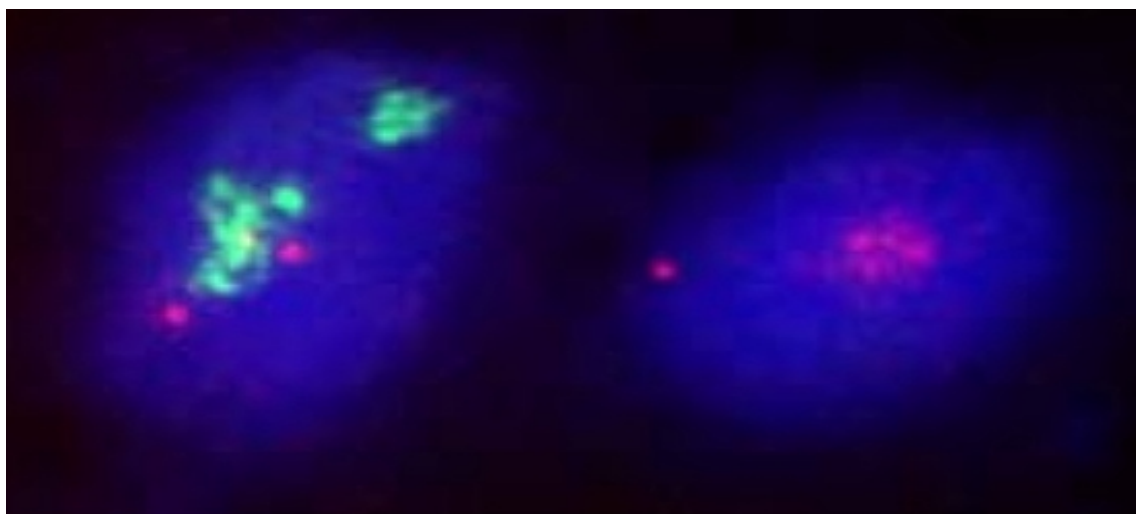


Фото 2. Диплоидный сперматозоид, содержащий две X хромосомы – зеленые сигналы и два гена EGFR – маленькие красные сигналы. Справа нормальный сперматозоид с Y хромосомой и одним геном EGFR.

Доля клеток, отягощенных хромосомными нарушениями, составила 0,56% (98/17540) (рис.).

Выявлен уровень дисомии хромосом X, Y в половых клетках жеребцов. Так, 0-0,05% сперматозоидов содержали диплоидный набор хромосом (фото 3). Доля клеток, имеющих дисомию по хромосоме X, составила 0,05-0,22% (фото 3); по хромосоме Y - 0-0,09% (фото 4). Определен уровень XY-несущих сперматозоидов в данной группе животных: от 0 до 0,28% (фото 1). Среди нарушений были выявлены такие, как анеуплоидия X (0-0,1%) (фото 4) и Y (0-0,09%) хромосом, XXY (0-0,05%), XYY (0-0,05%). Были отмечены клетки, которые содержали ген EGFR, но при этом отсутствовали сигналы половых хромосом. Дисомия хромосомы X встречалась чаще всех остальных аномалий.

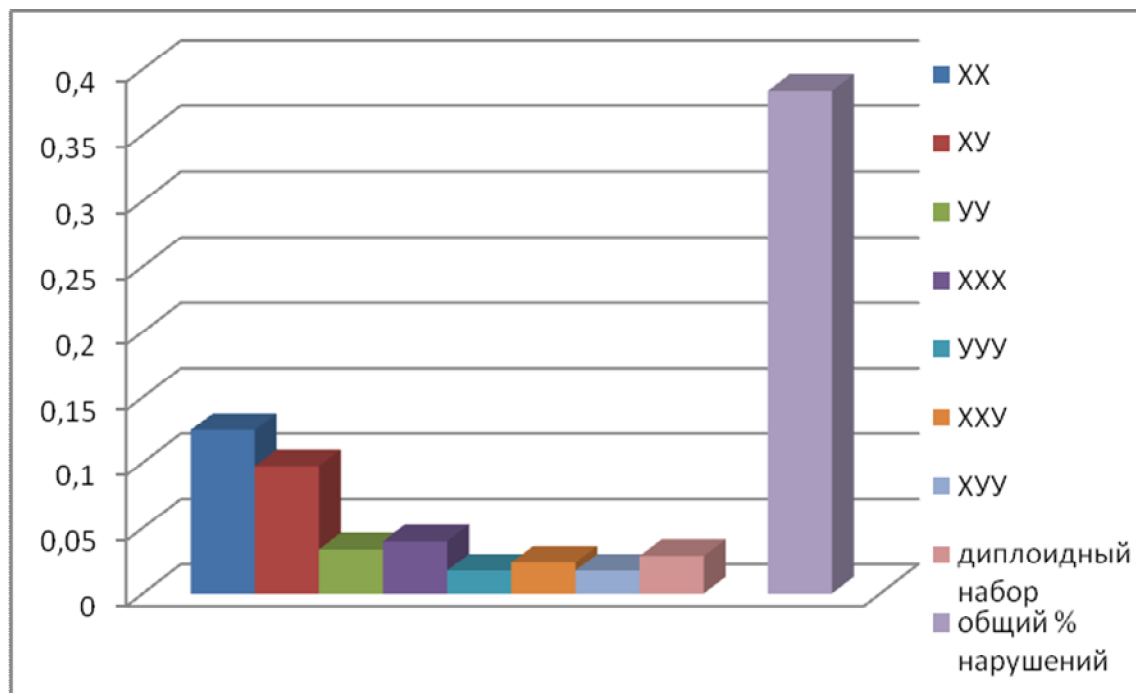


Рис. Хромосомные аномалии, обнаруженные в препаратах половых клетках жеребцов (%).

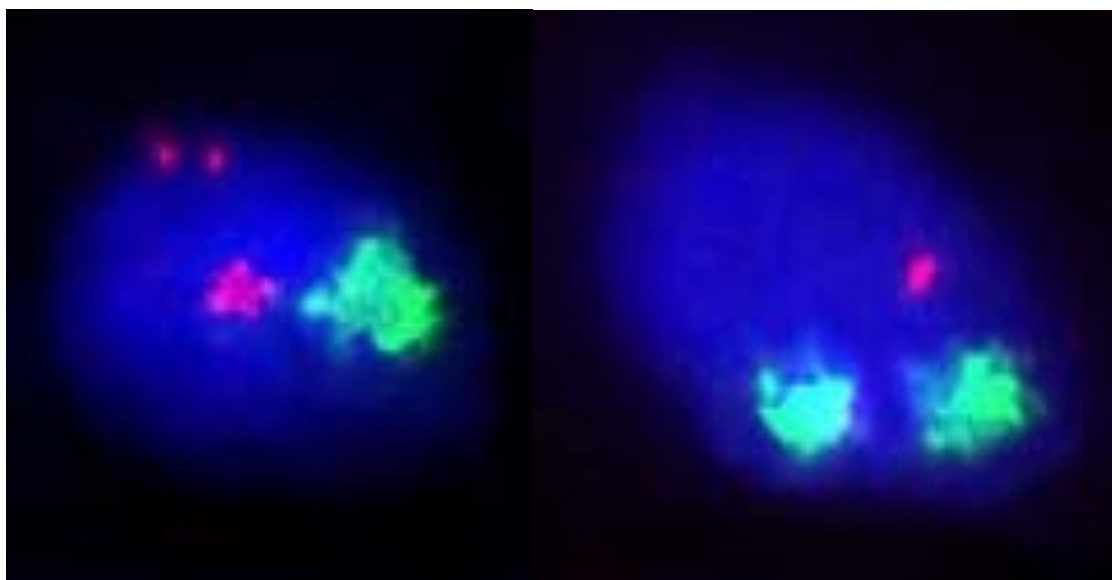
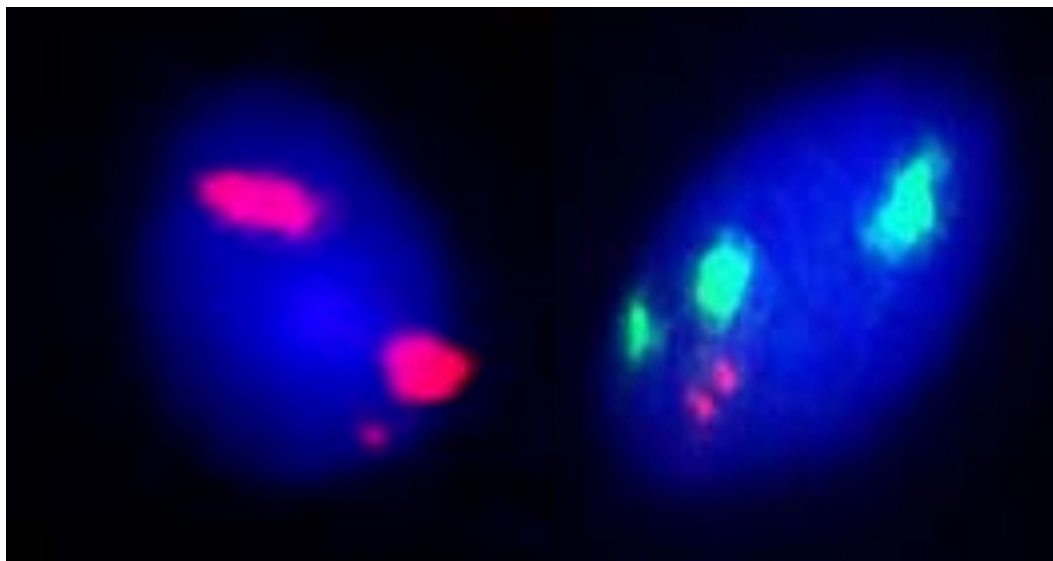


Фото 3. Слева - диплоидный набор хромосом – две половые хромосомы и два гена EGFR – маленькие красные сигналы. Справа - гаплоидный сперматозоид с анеупloidией X хромосомы.



**Фото 4. Слева – гаплоидный сперматозоид с двумя Y хромосомами.
Справа – диплоидный сперматозоид с тремя X хромосомами.**

Классические цитогенетические исследования основываются, прежде всего, на изучении хромосом, которые во время деления ядра клетки становятся заметными, принимая характерный для них размер и морфологию.

Развитие новых технологий в области молекулярной биологии способствует более глубокому пониманию механизмов хромосомных aberrаций и молекулярных аномалий, вызывающих бесплодие, и, в частности, нарушения в воспроизводстве. Благодаря применению флуоресцентной гибридизации *in situ* цитогенетический анализ может охватывать кроме метафазного еще и интерфазный хроматин, что показано на примере семени жеребцов. Исследование хромосом имеет практическое значение. Цитогенетическая диагностика является важным инструментом в выявлении и идентификации врожденных дефектов, а также, в изучении причин неудач разведения животных. В животноводстве цитогенетический анализ нашел применение при оценке производителей, используемых для искусственного осеменения. Все чаще ветеринары и заводчики лошадей, пытаясь понять причины нарушения воспроизводства, обращаются к помощи цитогенетических исследований. В исследованиях кариотипа сельскохозяйственных животных стали чаще применять флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), как точный и информативный метод.

Выводы:

1. В исследуемых образцах семени жеребцов были обнаружены половые клетки со следующими аномалиями хромосомного набора: дисомия хромосом X и Y, диплоидный набор хромосом, анеуплоидия X и Y хромосом, клетки с набором хромосом XXU и XYU, отсутствие половых хромосом.

2. Метод FISH является эффективным, точным и быстрым методом для обнаружения хромосомной патологии в половых клетках жеребцов.



Библиографический список

1. Пономаренко М.М. Конярство: навч. посібник / М.М. Пономаренко, М.В. Чорний// Харків. - 2001. – С. 250.
2. Пономаренко М.М. Вивчення впливу інтенсивності тренінгу та жвавості кобил на їх відтворювальну здатність та якість приплоду / М.М. Пономаренко // Дис...канд. с.-г.н. – Харків, 1971, - С. 180.
3. Жувак К.І. Рівень прохолостів у рисистих кобил в залежності від породи та строку заводського використання / К.І. Жувак, О.Б. Сушко, А.С. Лабунець // НТБ Інститут тваринництва. – Харків. – 2008. - № 96.– С. 163.
4. Ткачова І.В. Ефективність відтворення коней української верхової породи / І.В.Ткачова // НТБ Інститут тваринництва. - Харків – 2013. - № 109. - Ч. 1. - С. 283.
5. Савельева А.П. Структура хромосомной патологии среди пациентов с мужским бесплодием и патозооспермией / Анна Петровна Савельева // Дис...канд. биол. наук: 03.00.15, 03.00.25. — М., 2002. — С.167.
6. Трещенков Э.А. Исследование фрагментации ДНК сперматозоидов у мужчин в бесплодных браках / Э.А. Трещенков, С.Г. Жабин, И.И. Павленко // Мат-лы XX ежегодной междунар. конф. РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра». — 2010. — С. 64-65
7. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction // Cambridge University press – 1992. – P. 107.
8. Rejduch B. Cytogenetic analysis of beef cattle / B. Rejduch, E. Slota, M. Switonski // Genet. Pol. – 1994. - № 35, 4. – P. 323-332
9. Power M.M. Chromosomes of the horse / M.M. Power // Adv. Vet. Sci., Comp. Med. - 1990. - № 34. – P. 131-167
10. Guttenbach M. Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations / M. Guttenbach, V. Engel, M. Schmid // A review. Hum Genet. – 1997. - № 100, 1. – P. 1-21.
11. Guttenbach M. Incidence of chromosome 3, 7, 10, 11, 17 and X disomy in mature human sperm nuclei as determined by nonradioactive in situ hybridization / M. Guttenbach, R. Schakowski, M. Schmid // Hum Genet. – 1994. - № 93, 1. – P. 7-12.

ХРОМОСОМНІ ПАТОЛОГІЇ, ЯКІ ВИКЛИКАЮТЬ ПОРУШЕННЯ РЕПРОДУКТИВНОЇ ЗДАТНОСТІ КОНЕЙ

Добродєєва Л. Т., Інститут тваринництва НААН

Із метою контролю хромосомних порушень у статевих клітинах жеребців було цитогенетично досліджено сперму 8 тварин. Препарати для аналізу готували з замороженої сперми. Вивчення хромосомних аномалій в сперміях проводили з застосуванням молекулярного методу FISH. Для визначення анеуплоїдії використовували специфічні зонди для гетеросом. Контроль плідності клітин проводили за використання зонду аутосомного гену EGFR. Застосування FISH методу дозволило визначити частоту зустрічальності хромосомних аномалій у сперматозоїдах жеребців.

Ключові слова: цитогенетика, хромосома, сперматозоїд, безпліддя, анеуплоїдія.



CHROMOSOMAL PATHOLOGIES, WHICH CAUSE THE DISORDERS IN REPRODUCTIVE ABILITIES OF HORSES

L.T.Dobrodeeva, research scientist, Institute of Animal Sciences UAAS

For the purpose to control the chromosomal disorders in germinal cells of stallions, sperm obtained from 8 animals was studied. The preparations for analysis were made from frozen sperm. Studying chromosomal anomalies in sperm cells was realized using molecular FISH method. To determine aneuploidy specific probes were applied for heterosome. The probe was used for autosomal gene EGFR to control cells ploidy. Practice of FISH method gave possibility to determine the incidence of chromosomal anomalies in stallions' spermatozoons.

Keywords: cytogenetics, chromosome, spermatozoon, infertility, aneuploidy.

УДК 619:616.995.132:636.2

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ПРИ СПОНТАННОЙ ЭЗОФАГОСТОМОЗНОЙ ИНВАЗИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Долгая М.Н., с. н. с., к. б. н.,

Институт животноводства НААН, г. Харьков

Братушкина Е.Л.*, к. в. н., Минич А.В*., асп.

УО* «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, г. Витебск, Республика Беларусь»

В статье приведены данные об изменении морфологических и биохимических показателей крови при эзофагостомозной инвазии крупного рогатого скота. При этом выяснено, что паразитирование в организме молодняка крупного рогатого скота эзофагостом вызывает снижение количества эритроцитов и гемоглобина, повышение количества лейкоцитов и процента эозинофилов. Эзофагостомозная инвазия приводит к нарушениям функций печени, сопровождающиеся повышением уровня ферментов в крови, а также нарушениям со стороны энергетического обмена.

Ключевые слова. эзофагостомоз, инвазия, крупный рогатый скот, гематология, обмен веществ.

Среди гельминтов крупного рогатого скота первое место по распространению в Республике Беларусь занимают стронгилята желудочно-кишечного тракта. Поражение животных паразитами этой группы доходит до 100 %. Из подотряда Strongylata в пищеварительном тракте у крупного рогатого скота выявлены паразиты, относящиеся к четырём семействам (Strongylidae, Ancylostomatidae, Trichonematidae, Trichostrongylidae). Из родового состава выявленных стронгилят большой процент экстенсивности инвазии приходится на эзофагостомы.

Эзофагостомоз – это гельминтозное заболевание, вызываемое нематодами рода *Oesophagostomum* сем. Trichonematidae, характеризующееся поражением тонкого и толстого отделов кишечника и нарушением функций желудочно-кишечного тракта. Обнаружение у крупного рогатого скота преимущественно *Oe. radiatum* говорит о её специфичности. В 1972 и 1973 гг. Р.Г. Баширов и И.С. Жариков зарегистрировали в Беларуси впервые у крупного рогатого скота *Oe. veni-*