

GENETIC AND SELECTION PROSPECTS OF TRANSPLANTATION OF ZYGOTES AT AGRICULTURAL ANIMALS. O.L.Trofimenko, G.S. Taranenko

Information is examined that to a new ideology of transplantation as newest instrument of genetic and selection improvement of prospects, breeds and populations of agricultural animals.

УДК 636.2:591.453.5

П.А. ТРОЦЬКИЙ

Інститут розведення і генетики тварин УААН

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЗАСТОСУВАННЯ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ КРІОПРОТЕКТОРІВ У ЕКВІЛІБРАЦІЙНОМУ РОЗЧИНІ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ КОРІВ

Проведено дослідження з порівняння різних концентрацій етиленгліколю, пропандіолу і гліцерину у еквілібраційному розчині при заморожуванні ооцит-кумулясних комплексів корів.

Кріоконсервування, ооцит-кумулясні комплекси, кріопротектори, дозрівання і запліднення *in vitro*

Найважливішим фактором підвищення ефективності селекції сільськогосподарських тварин в останні роки стає агробіотехнологія і її головні напрями — клітинна та генна інженерія. Класична селекція при всьому багатстві її творчого арсеналу вже перестає давати відповідь на цілу низку питань, які породило вторгнення, по суті, механіко-технологічних методів у життя організму, клітини та її складових. Саме цим зумовлена поява нової для тваринництва науки — біотехно-

© П.А. Троцький, 2006

Розведення і генетика тварин. 2006. Вип. 40.

логічної селекції [2]. Проте всі відомі методи використання гамет і ембріонів для біотехнологічних цілей стикаються з однією й тією самою проблемою — ефективністю їхнього використання для одержання живого нащадка, що потребує запасу пластичного матеріалу на кожному з технологічних етапів. Єдиним надійним засобом створення таких запасів шляхом зворотного введення біооб'єктів в анабіоз є заморожування і зберігання їх при низьких температурах [1].

Причиною низької кріорезистентності гамет самиць ссавців (порівняно з гаметами самців) є їхні специфічні особливості: великий розмір (80—160 мкм), наявність прозорої оболонки, знижена проникність мембран до кріопротекторів, а також те, що ооцит-кумулясний комплекс являє собою сукупність клітин, а не окрему клітину [3, 4]. Нині велика кількість експериментальних робіт із заморожування ооцитів, яйцеклітин, зигот і ембріонів сільськогосподарських тварин, отриманих як *in vivo*, так і *in vitro*, проводиться з метою розробити простий і ефективний метод їхнього збереження, бо без цього прогрес у галузі сучасних біотехнологій відтворення неможливий [5, 6].

Мета роботи. Провести порівняльний аналіз застосування різних концентрацій кріопротекторів у еквілібраційному розчині при кріоконсервуванні ооцит-кумулясних комплексів корів.

Матеріал і методика досліджень. Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулясні комплекси корів чорно-рябої породи. Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко, вилувлювали пастерівською піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками під мікроскопом. Для заморожування використовували ооцити корів з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом. Перед заморожуванням гамети обробляли еквілібраційним розчином (10 хв), потім переносили у вітрифікаційний розчин (30 с). Усі еквілібраційні та вітрифікаційні розчини були приготовлені (об'ємне співвідношення) на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20% фетальної сироватки корів, яку попередньо інактиву-

вали при 56°C протягом 30 хв. Виведення кріопротекторів після розморожування гамет корів проводили шляхом перенесення їх на 10 хв у розчин 1,0 М сахарози. Потім клітини тричі відмивали середовищем М-199, оцінювали за морфологічними ознаками і переносили в середовище для культивування. Ооцит-кумуляні комплекси корів культивували в чотирьохлункових планшетах протягом 27 год при температурі 38,5°C, 5% CO₂ у повітрі, в краплях середовища 199 з 10%-ю 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. Частина гамет корів після культивування поза організмом підлягали цитогенетичному аналізу, цитогенетичні препарати готували за методом Tarkowski А.К. [7], забарвлювали 10%-м розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

Результати досліджень. Проведено порівняльний аналіз застосування різних концентрацій кріопротекторів етиленгліколю і пропандіолу у еквілібраційному розчині при кріоконсервуванні ооцит-кумулясних комплексів корів.

За результатами експериментальних досліджень (табл. 1) встановлено, що збільшення концентрації етиленгліколю від 5 до 25% (гр. А-Д) і відповідне зменшення концентрації пропандіолу від 25 до 5% (гр. А-Д) у загальному об'ємі еквілібраційного розчину (загальний об'єм кріопротекторів у еквілібраційному розчині становив 30%) та подальше 27-годинне культивування деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів корів сприяє підвищенню (від 49,4 до 66,3%) кількості дозрілих до метафази-2 мейозу гамет. Показник дегенерацій хромосомного матеріалу гамет у цих експериментальних групах зменшувався від 37,0 до 20,9%. У контрольній групі — К (без заморожування) показники кількості клітин, що досягли метафази-2 мейозу або мали порушення хромосомного апарату, становили відповідно 81,3 і 10,0%.

Аналогічну тенденцію виявлено й при порівнянні різних концентрацій етиленгліколю та гліцерину у еквілібраційному

1. Вплив різних концентрацій етиленгліколю і пропандіолу в еквілібраційному розчині при заморожуванні ооцит-кумулюсних комплексів корів

Варіанти дослідів	Кількість заморожених клітин	Кількість клітин, придатних для культивування після розморожування		Термін культивування, год	Кількість клітин					
					на метафазі-2		на інших стадіях мейозу		з хромосомними порушеннями	
		п	%		п	%	п	%	п	%
А	90	81	90,0	27	40	49,4 ^a	11	13,6	30	37,0 ^g
Б	93	85	91,4	27	44	51,8 ^{ad}	15	17,6	26	30,6 ^{gf}
В	88	79	89,8	27	45	57,0 ^{ad}	12	15,2	22	27,8 ^{gf}
Г	95	89	93,7	27	56	63,0 ^b	14	15,7	19	21,3 ^f
Д	91	86	94,5	27	57	66,3 ^b	11	12,8	18	20,9 ^f
К	80	—	—	27	65	81,3 ^c	7	8,7	8	10,0 ^c

Примітка. b : d ; f : g — $P < 0,05$; a : b — $P < 0,01$; a : c ; b : c ; d : c ; e : f ; e : g — $P < 0,001$.

розчині за аналогічних умов (табл. 2). Відповідне збільшення концентрації етиленгліколю і зменшення гліцерину в загальному об'ємі еквілібраційного розчину сприяли підвищенню виходу дозрілих яйцеклітин (гр. А-Д) від 47,5 до 63,6% після культивування поза організмом та зменшення гамет з хромосомними порушеннями від 36,3 до 22,7%.

Висновок. Встановлено, що застосування 25%-го етиленгліколю з 5% пропандіолу або 5% гліцерину в еквілібраційному розчині при заморожуванні ооцит-кумулюсних комплексів корів відповідно на 16,9 і 16,1% збільшує ($P < 0,01$) кількість деконсервованих клітин, дозрілих до метафази-2 мейозу.

2. Вплив різних концентрацій етиленгліколю і гліцерину у еквілібраційному розчині при заморожуванні ооцит-кумуляусних комплексів корів

Варіанти досліджу	Кількість заморожених	Кількість клітин придатних для культивування* після розморожування		Кількість клітин:					
				на метафазі-2		на інших стадіях мейозу		з хромосомними порушеннями	
		п	%	п	%	п	%	п	%
А	89	80	89,9	38	47,5 ^a	13	16,2	29	36,3 ^c
Б	91	82	90,1	40	48,8 ^a	14	17,1	28	34,1 ^c
В	94	85	90,4	46	54,1 ^{ca}	14	16,5	25	29,4 ^{ch}
Г	90	79	87,8	46	58,2 ^{ca}	13	16,5	20	25,3 ^{ce}
Д	96	88	91,7	56	63,6 ^{cb}	12	13,7	20	22,7 ^{ce}
К	88	—	—	73	82,9 ^d	5	5,7	10	11,4 ^f

Примітка. f : g — P<0,05; a : b; f : h — P<0,01; a : d; b : d; f : e — P<0,001.

*Термін культивування — 27 год.

1. Безуглий М.Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин. — Х., 2002. — 155 с.

2. Буркат В.П. Третє тисячоліття — ера біотехнологічної селекції // Вісн. аграр. науки. — 2000. — № 12. — С. 118–119.

3. Papis K., Shimizu M., Izake Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets // Theriogenology. — 2000. — V. 54, I. 5. — P. 651–658.

4. Le Gal F., Massip A. Cryopreservation of cattle oocytes: effect of meiotic stage, cycloheximide treatment and vitrification procedure // Cryobiology. — 1999. — V. 24, N 4. — P. 290–300.

5. Vitrification of bovine IVF blastocyst in an ethylene glycol/sucrose solution and heat-stable plant-extracted proteins / A.T. Palasz, H. Gustafsson,

H. Rodriguez-Martines et al. // Theriogenology. — 1997. — V. 47, I. 4. — P. 865–879.

6. Polge C. Freezing of gametes and development of embryo technologies in farm animals // Acta. Agr. Scandinavica. Section A, Animal Science. — 1998. — N 29. — P. 5–11.

7. Tarkowski A.K. An air drying method for chromosoma preparation from mouse eggs // Cytogenetics. — 1966. — V. 5. — P. 394–400.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ КРИОПРОТЕКТОРОВ В ЭКВИЛИБРАЦИОННОМ РАСТВОРЕ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ ООЦИТ-КУМУЛУСНЫХ КОМПЛЕКСОВ КОРОВ. П.А. Троицкий

Проведены исследования по сравнению различных концентраций этиленгликоля, пропандиола и глицерина в эквilibрационном растворе при замораживании ооцит-кумулясных комплексов коров.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE USE OF DIFFERENT CONCENTRATIONS CRYOPROTECTORS AT EKVILIBRATION SOLUTION AT CRYOPRESERVATION OF BOVINE OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES. P.A. Trotskiy

Researches on comparison of different concentrations of ethylenglykol, propandiol and glycerol in ekvilibration solution at freezing of bovine oosyt-cumulus complexes are conducted.