Нормативная себестоимость, приплод, корова-мать, реципиент, молочные и молочно-мясные породы

THE NEW METHODIC DIRECTIONS TO THE PRIME COST CALCULATION OF A CALF RECEIVED FROM DAIRY AND DUAL PROPOSES PRODUCTIVITY BREEDS' CALVES-DAM AND RECIPIENTS.

P. Sharan, G. Kravchenko

The prime cost of a calf received from dairy and dual proposes productivity breeds calves-dam and recipients is calculated in accordance with adduced basic methodic directions.

The prime cost, a calf-dam, a recipient, diary and dual proposes productivity breeds

УДК 636.2.082.591.15.16

І.М. ЯРЕМЧУК, С.Г. ШАЛОВИЛО
Інститут біології тварин УААН

ВПЛИВ КОМПОЗИЦІЙНИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ДІЇ НА ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ЕМБРІОНІВ КОРІВ ПРИ НАДШВИДКОМУ ЗАМОРОЖУВАННІ

Висвітлено результати досліджень із застосування фосфоліпідів у вітрифікаційному середовищі при надшвидкому заморожуванні ембріонів корів. Установлено, що збереження репродуктивних клітин залежить від оптимального поєднання надшвидкого охолодження та складу поліфункціонального кріоконсерванту.

Композиційні кріопротектори, ембріони, фосфоліпіди, цитоплазматична мембрана, вітрифікаційне середовище

© І.М. Яремчук, С.Г. Шаловило, 2007

Новим підходом у технології кріоконсервування ембріонів великої рогатої худоби є їхнє надшвидке заморожування — найбільш ефективний метод, який активно розробляється у світовій практиці [1, 2, 7]. В основі даного способу лежить попередня (безпосередньо перед зануренням у рідкий азот) еквілібрація ембріонів у середовищі з кріопротекторами ендо- та екзоцелюлярної дії, яка забезпечує необхідне незводнення і насичення клітин кріозахисними речовинами.

Вітрифікаційне середовище має бути достатньо концентроване, щоб у ньому не відбувалася кристалізація при охолодженні і водночас не повинно бути хімічно-токсичне, аби спричиняти осмотичне пошкодження клітин при еквілібрації [3, 10]. Важливим фактором, який забезпечує захист клітин від пошкоджувальної дії низьких температур, є склад і властивості кріозахисного середовища. Але поряд із позитивними, захисними функціями кріопротектори проявляють цитотоксичну дію на всіх етапах кріоконсервування [4–6]. Під впливом низьких температур відбувається порушення білково-ліпідних взаємодій на мембранному рівні. Зокрема, майже до нуля у період кристалізації знижується вміст лецитину, який є основним фосфоліпідом у ліпопротеїнових комплексах цитоплазматичних мембран [4].

Враховуючи велике значення цілісності цитоплазматичних мембран для нормальної життєдіяльності ембріонів [6, 11] та з метою зниження негативного впливу на них фізико-хімічних факторів, що реалізуються на етапах кріоконсервування ембріонів при надшвидкому охолодженні, нами розроблено вітрифікаційне середовище з композиційним кріопротектором поліфукнкціональної дії. Водночас вивчено вплив біологічноактивних та мембраностабілізуючих речовин, включених у склад кріоконсервантів, на збереження ембріонів при надшвидкому заморожуванні.

Введення у склад кріоконсерванту гліцерину та сахарози у високій концентрації дало змогу нам досягти підвищення виходу нормально розвинених деконсервованих ембріонів до 77,2%. Відомо, що поряд із дією гіперконцентрованих розчинів і можливим розвитком внутріклітинної кристалізації при надшвидкому заморожуванні ембріонів місцем прикладання осмотичного фактора є цитоплазматична мембрана [5]. Для того щоб

отримати максимальну збереженість розморожених ембріонів, у середовище для заморожування було введено мембраностабілізуючий препарат.

Матеріал і методика досліджень. Об'єктом дослідження були ембріони корів-донорів на стадії морули та бластоцисти до і після кріоконсервування. Їхню морфологічну оцінку проводили за допомогою бінокулярної лупи МБС-10 та мікроскопа "Біолам". Для заморожування надшвидким методом відбирали свіжоодержані ембріони за морфологічною оцінкою відмінної та доброї якості. Усі ембріони було поділено на дві групи — дослідну і контрольну. Після промивання у культуральному середовищі від механічного забруднення ембріони поміщали на 7–10 хв у еквілібраційне середовище із вмістом 10% гліцерину (1,4 М) на середовищі для тканинних культур із 20%-ю фетальною сироваткою теляти.

Від складу вітрифікаційного середовища залежить збереженість ембріоном життєдіяльності після виходу з анабіозу [4, 6, 9]. Тому нами був проведений пошук ефективних добавок біологічно активних компонентів, які б підвищували стійкість ембріонів до температурного шоку. З метою вивчення ефективності використання мембраностабілізуючих речовин у складі кріоконсервантів при надшвидкому заморожуванні до вітрифікаційного середовища було додано препарат Філомек. Його кріозахисна ефективність зумовлена вмістом фосфатидилхоліну (70% лецитину), а також вільних жирних кислот.

Ембріони контрольної групи переносили у вітрифікаційне середовище із вмістом гліцерину і сахарози, а дослідної групи — у те саме вітрифікаційне середовище, до складу якого було додано мембраностабілізуючий препарат Філомек. Потім ембріони поміщали у пайєти, попередньо заповнені вітрифікаційним середовищем. Після запаювання пайєти переносили у рідкий азот. Між внесенням ембріона у вітрифікаційне середовище й охолодженням до температури -196°С проходило не більше 90 с.

Ембріони розморожували при кімнатній температурі. Виведення кріопротекторів із деконсервованих ембріонів проводили у двох розчинах: 0,5М та 0,25М сахарози з експозицією 5 хв у кожному. Надалі ембріони промивали у культуральному середовищі, яке складалося з ФСБ Дюльбекко та 20% фетальної сироватки теляти і поміщали у пайєти для пересадки. Життєздатність декон-

сервованих ембріонів визначали за результатами їхнього приживлення у телиць-реципієнтів на 60-й день після пересадки шляхом ректальної діагностики на тільність.

Результати досліджень. Ступінь морфофункціонального збереження репродуктивних клітин залежить від оптимального поєднання надшвидкого охолодження та складу поліфункціонального кріоконсерванту. Його кріозахисна дія є необхідною передумовою запобігання розвитку ендоцелюлярної, летальної для клітин кристалізації. Склад кріоконсерванту, зокрема його колигативні властивості, повинні бути спрямовані на нейтралізацію "ефекту розчину", який виникає у даних умовах, а мембраностабілізуюча дія компонентів кріоконсерванту підтримує нативні властивості мембрани в процесі дегідратації клітин [5, 8].

У результаті досліджень встановлено, що кріозахисний ефект підвищується при введенні до складу кріоконсерванту мембраностабілізуючих речовин. Після виходу із стану глибокого холодового анабіозу ембріонів, заморожених за допомогою надшвидкого охолодження, було проведено їхню морфологічну оцінку і детальний аналіз кріопошкоджень. Так у ембріонів контрольної групи частіше зустрічалися такі морфологічні зміни, як тріщини прозорої оболонки, сильне стиснення клітинного комплексу, лізис бластомерів, наявність щільних темних ділянок, вакуолізація та грануляція цитоплазми.

Життєздатність ембріонів, заморожених у вітрифікаційному середовищі з кріопротекторами поліфункціональної дії

Показники	Групи	
	контрольна	дослідна
Заморожено і розморожено ембріонів, шт.	17	17
Нормально розвинених після розмороження, шт.	13	15
Виживання ембріонів, %	76,4	88,2
Пересаджено ембріонів, шт.	13	15
Тільних реципієнтів, шт.	5	8
Приживлення ембріонів, %	38,4	53,3

Ембріони дослідної групи виявились більш стійкими до надшвидкого заморожування і після деконсервації нормально розвинених ембріонів було на 11,8% більше, ніж на контролі (таблиця). На нашу думку, це може бути пов'язано із більш швидким включенням репараційних механізмів після розморожування, що сприяло нормалізації розвитку ембріонів. Аналогічний результат отримано за рівнем приживлення дослідних ембріонів. Він був значно вищий і становив 53,3%, що на 14,9% більше, ніж у контрольній групі. Це дає нам підставу стверджувати, що поряд із дією проникаючих і непроникаючих кріопротекторів введення у кріоконсервант мембраностабілізуючих речовин дає позитивні результати.

Висновок. З метою максимального зниження негативного впливу на мембрани ембріонів фізико-хімічних факторів, які реалізуються на етапах кріоконсервування при надшвидкому охолодженні, до складу кріоконсерванту бажано вводити мембраностабілізуючі речовини, зокрема фосфоліпіди.

1. *Кривохарченко А.С., Вильянович Л.И., Серобян Г.А.* Выживаемость эмбрионов мыши после сверхбыстрого замораживания различными способами с использованием различных криопротекторов // Проблемы репродукции. — 1995. — № 4. — С. 13–17.

2. *Кузнєцова І.Б., Кузнєцов В.Є., Ковтун С.І.* Особливості кріоконсервування ембріонів та ооцитів методом вітрифікації // Вісн. аграр. науки. — 1999. — № 2. — С. 42–45.

3. *Гузєватий О., Ясинський В.В.* Кріоконсервація ооцитів та ембріонів великої рогатої худоби методом вітрифікації // Тваринництво України. — 1996. — № 11. — С. 26–28.

4. *Белоус А.М., Кравченко Л.П.* Актуальные вопросы фармакологический защиты органов при консервации // Проблемы криобиологии. — 1995. — № 3. — С. 3–9.

5. *Исаченко В.В.* Сверхбыстрое насыщение и выведение проникающих криопротекторов при витрификации эмбрионов крыс // Проблемы криобиологии. — 1998. — № 4. — С.67–68.

6. *Лучко Н.И.* Достижения и перспективы развития криоконсервирования эмбрионов млекопитающих // Вестн. проблем биологии и медицины. — 1997. — Вып. 12. — С. 90–98.

7. *Rall W.F., Fahy G.M.* Ice-free cryopreservation of mouse embryos at −196°C by vitrification // Nature. — 1985. — 313. — P. 573–575.

8. *S. Kasas, G. Dums, A. Dietler, S.* Catsicas & M. Adrian. Vitrification of cryoelectron microscopy specimens revealed by high-speed photographic imaging // J. of Microscopy. — 2003. — V. 211, I. 1. — P. 48.

9. *Смолянинова Е.И., Хроменкова О.В., Жерноклев Г.В.* Влияние различных этапов криоконсервирования на осмотическую устойчивость и морфофункциональную сохранность эмбрионов мыши // Проблемы криобиологии. — 2001. — № 2. — С. 49–55.

10. *Горбунов Л.В., Морозова И.А., Безуглый Н.Д.* Определение оптимальной концентрации криопротектора, обеспечивающей высокую сохранность эмбрионов мыши, замороженных при сверхвысоких скоростях теплообмена // Проблемы криобиологии. — 2000. — № 4. — С. 8–14.

11. *Effekt* of various crioprotectants on survial of mouse embryos cryopreserved by the guick freezing method / A. Maznio, Y. Tarahashi, C. Valdes et.al // Vet. Res. — 1989. — **37**, № 2. — P. 29–39.

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИОННЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ НА СОХРАННОСТЬ ЭМБРИОНОВ КОРОВ ПРИ СВЕРХБЫСТРОМ ЗАМОРАЖИВАНИИ.

И.М. Яремчук, С.Г. Шаловило

Освещены результаты исследований по применению фосфолипидов в витрификационной среде при сверхбыстром замораживании эмбрионов коров. Установлено, что сохранение репродуктивных клеток зависит от оптимального объединения сверхбыстрого охлаждения и состава полифункционального криоконсерванта.

Композиционные криопротекторы, эмбрионы, фосфолипиды, цитоплазматическая мембрана, витрификационная среда

MULTIFUNCTIONAL ACTION ON SAVING EMBRYOS OF COWS AT SUPERFAST FREEZING.

I.M. Jaremchuk, S.G. Shalovilo

The articles results of researches on applications fosfolipids in vitrification environment are covered at superfast freezing embryos of cows. It is established, that preservation of reproductive cells depends on optimum association superfast cooling and structure multifunctional krioconserver.

Composite krioprotectors, embryos, fosfolipids, cytoplasmatic membrane, vitrification environment