

УДК 636.2:591.3:576.316.7

© 2017

В.В. Дзіцюк,*доктор сільсько-господарських наук**Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН***М.М. Передрій***ДП ДГ «Христинівське» Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН*

ОСОБЛИВОСТІ КАРІОТИПОВОЇ МІНЛИВОСТІ ДОЧОК БУГАЇВ-ЕМБРІОТРАНСПЛАНТАНТІВ

Мета. Дослідити цитогенетичні характеристики корів, які походять від бугаїв-плідників, отриманих методом ембріопересадок і корів-потомків бугаїв, народжених від штучного осіменіння. **Методи.** Культивування лімфоцитів, приготування цитогенетичних препаратів, класифікацію та облік аберацій хромосом здійснювали за загальноприйнятими методиками. **Результати.** За результатами аналізу виявлено аномалії каріотипу геномного типу (анеуплоїдію і поліплоїдію) та структурні аберації хромосом (фрагменти, розриви, нестачі і асоціації хромосом). Загальна частота каріотипових порушень у корів-дочок бугаїв від ембріопересадок виявилася вищою приблизно на 10% порівняно з показником у корів-дочок бугаїв від штучного осіменіння. У корів, які мали хоча б один випадок мертвонароджень або спонтанних абортів, частота хромосомних порушень була значно вищою, ніж у тварин без грубих репродуктивних порушень. **Висновки.** Для попередження накопичення генетичних дефектів у стадах великої рогатої худоби слід проводити систематичний цитогенетичний контроль тварин.

Ключові слова: велика рогата худоба, трансплантація ембріонів, каріотип, аберації хромосом.

Прогресивний напрям прискореного відтворення поголів'я великої рогатої худоби (трансплантація ембріонів) дає змогу інтенсивно використовувати генетичний потенціал високопродуктивних корів, одержувати двійнят пересадкою двох ембріонів одному реципієнту, зберегти генофонд локальних і вимираючих видів тварин, створити банк ембріонів від видатних тварин способом глибокого їх заморожування, спростити транспортування генетичного матеріалу у різні регіони світу.

Ідея трансплантації ембріонів ґрунтується на здатності доімплантаційного ембріона певний час зберігати життєздатність поза організмом матері, а також на явищі толерантності організму реципієнта до пересадженого зародка.

Багаточисленні дані отримання тварин-трансплантантів, які не відрізняються за розвитком і продуктивністю від їх однолітків, отриманих від штучного осіменіння, свідчать про можливість і дієздатність цього біотехнологічного методу. Незважаючи на очевидність того, що тварини, отримані від пересадок, живуть, продукують і народжують потомків, переконливо не доведено, що в їх фізіології, метаболізмі і експресії генів немає дефектів або принаймні особливостей. У літературі є лише окремі повідомлення щодо можливих біологічних ризиків цієї технології, зокрема про накопичення генетичного вантажу в потомстві тварин, отриманих у результаті ембріопересадок, і про негативні наслідки біотехнологічних маніпуляцій з ембріонами [1–3].

Очевидно, що на життєздатність і розвиток пересаджених ембріонів не можуть не впливати супутні пересадці маніпуляції, зокрема, гормональне стимулювання овогенезу корів-донорів, тобто багаторазове введення простагландинів і фолікулостимулювального гормону (ФСГ), що спричиняють незворотні зміни у донорів [4, 5].

Можна припустити, що далеко не всі ембріони залишаються неушкодженими після біотехнологічних маніпуляцій.

Дослідженнями Ф.Р. Черневої доведено, що у каріотипах корів-донорів ембріонів чорно-рябої породи після введення ФСГ, який викликає суперовуляцію, виявлено міжхромосомні асоціації як наслідок штучної зміни гормонального статусу [6].

Серед двійнят, отриманих методом трансплантації, збільшується кількість мертворождалих і тварин з різними патологіями і ризики їхньої загибелі набагато частіші, ніж природно народжених потомків [7].

У літературі немає повідомлень про дослідження щодо впливу процедур вимивання, оцінки і пересадки ембріонів на цілісність каріотипу самих тварин-трансплантантів і їх потомків хоча б у першому поколінні.

Т.Т. Глазко та ін. повідомляють, що у корів з цитогенетичними аномаліями відмічено вищий рівень реакції на введення гонадотропінів, що виражається у збільшенні кількості ембріонів з цитогенетичними порушеннями, що за успішної трансплантації призведе до накопичення генетичного вантажу в наступних поколіннях [5]. Це означає, що потомки бугаїв-трансплантантів можуть мати небажані хромосомні аберації і каріотипову нестабільність, а це впливатиме на їх життєздатність і продуктивність. Отже, питання щодо наслідків втручання в процес розвитку телят-ембріотрансплантантів маловивчене і зовсім немає науково обґрунтованих даних про біологічну повноцінність потомків тварин, отриманих завдяки ембріотрансплантації, зокрема дочок бугаїв-трансплантантів.

Мета досліджень — порівняння каріотипової мінливості, а також мінливості продуктивних ознак і показників відтворної здатності корів-дочок, які походять від бугаїв-плідників, отриманих методом ембріопересадок, і корів-дочок від бугаїв, народжених від штучного осіменіння.

Матеріали і методи. Матеріалом для досліджень були результати індивідуальної оцінки тварин української червоно-рябої молочної породи ДП ДГ «Христинівське» за матеріалами зоотехнічного обліку і експериментальними цитогенетичними даними. Для аналізу даних зоотехнічного обліку використовували пакет програм СУМС «Інтесел Орсек».

Цитогенетичні дослідження корів української червоно-рябої породи, яких розводять у ДП ДГ «Христинівське», проведено в лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН. Групи корів сформовані з корів, отриманих від бугаїв-ембріотрансплантантів і бугаїв від штучного осіменіння. Для досліджень вибрані корови після 1–2-ї лактацій.

Для проведення цитогенетичних досліджень у корів з хвостової вени відбирали кров у стерильні шприци з розчином гепарину. Короткострокову культуру готували за відомим методом [8]. Культивування клітин проводили протягом 72 год у термостаті за 37°C. Далі суспензію центрифугували (1000 об./хв, 10 хв), інкубували в гіпотонічному розчині КСІ (0,54%) протягом 50 хв, фіксували сумішшю етилового спирту з льодяною оцтовою кислотою (3:1) у такій послідовності: додавали нашаруванням фіксатор до клітинної суспензії, звільненої від гіпотонічного розчину, і витримували 90 хв за температури 4°C. Потім суспензію центрифугували за 1000 об./хв протягом 7 хв, відбирали супернатант, додавали фіксатор і ще раз центрифугували за тих самих умов. Знову відбирали супернатант, додавали необхідну кількість свіжого фіксатора і розкапували суспензію на чисті охолоджені предметні скельця. Препарати фарбували фарбником Гімза (Gimza Merk).

До аналізу метафазних клітин включали цитогенетичні показники: частку анеуплоїдних і поліплоїдних клітин, частоту клітин зі структурними абераціями хромосом (хромосомні розриви, фрагменти хромосом, асинхронне розщеплення центромерних районів хромосом).

Для аналізу частоти мікроядер в еритроцитах краплю периферійної крові розводили фізіологічним розчином (1:1) і готували мазки. Підрахунок еритроцитів мікроядер проводили після їх фарбування фарбником Гімза. У кожній тварині аналізували по 500 клітин.

1. Значення продуктивних і відтворних якостей корів-дочок бугаїв, отриманих різними біотехнологічними способами

Група тварин	Дочки, n	Надій дочок за першу лактацію (M±m)	Сервіс-період	Вік під час першого осіменіння	Коефіцієнт відтворної здатності	Випадки мертвонароджень чи абортів, n/%
Дочки: бугаїв-ембріотрансплантантів	34	6495	164,8	819,8	0,86	13/38,2
бугаїв, отриманих традиційним способом	57	6349	168,1	667,9	0,92	4/7,01

Біометричну обробку результатів досліджень проводили методами варіаційної статистики відповідно до М.О. Плохинського [9], Г.Ф. Лакина [10] з використанням стандартного пакета прикладних статистичних програм.

Результати досліджень. Аналіз, проведений на основі даних зоотехнічного обліку, свідчить, що за першу лактацію надій дочок бугаїв, яких отримали внаслідок пересадки ембріонів, на 146 кг більший, ніж дочок бугаїв, отриманих традиційним методом штучного осіменіння (табл. 1). Аналогічні дані про вищу продуктивність корів-дочок бугаїв-трансплантантів порівняно з дочками бугаїв-не-трансплантантів наводять також інші вчені.

За відтворними властивостями кращі показники виявлено у корів, батьки яких отримані методом штучного осіменіння. Так, у групі корів потомків бугаїв-трансплантантів виявлено 13 (38,2%) випадків мертвонароджень і спонтанних абортів, тоді як серед досліджених корів-ровесниць від бугаїв, отриманих традиційно, — лише 4 (1%). Середнє значення сервіс-періоду корів I групи становить 164,8 дня, що на 4 дні менше, водночас вік першого осіменіння в них майже на 5 міс. (151,9 дня) вищий.

Для цитогенетичного дослідження за матеріалами зоотехнічного обліку сформували дві групи корів, залежно від способу, яким був отриманий їх батько, — способом ембріопересадки чи традиційним, від штучного осіменіння.

Багато авторів вважають, що цитогенетичний моніторинг ґрунтується на каріотиповій нормі і будь-які відхилення від норми слід вважати генетичним ризиком [11]. Для оцінки каріотипової мінливості нами розроблено алгоритм розрахунку узагальненого

цитогенетичного показника, названого «генетичний ризик». Показник розраховується на основі первинних даних про частоту анеуплоїдних, поліплоїдних клітин і клітин з асоціаціями й абераціями хромосом. У результаті розрахунку рівня генетичного ризику корів-дочок бугаїв-трансплантантів і бугаїв від штучного осіменіння розподілили на групи: з низьким рівнем генетичного ризику (Н), із середнім (С) та з високим рівнем генетичного ризику (В).

Основна частина всіх корів зосереджена в групі з середнім рівнем генетичного ризику (табл. 2). Водночас дочки бугаїв-ембріотрансплантантів частіше, ніж дочки бугаїв, отриманих традиційним способом, мають високий рівень генетичного ризику.

Для дослідження міжгрупових відмінностей за цитогенетичними характеристиками дослідні групи — корови-дочки бугаїв від ембріопересадок і корови-дочки від штучного осіменіння — розподілили ще на 3 групи кожну залежно від стану їх репродуктивної системи: I група — тварини з порушеною відтворною здатністю, наявністю мертвонароджень і спонтанних

2. Розподіл корів за групами генетичного ризику

Група тварин	Кількість тварин у групах, гол. (%)	
	дочки бугаїв-ембріотрансплантантів	дочки бугаїв, отриманих традиційним способом
Н	7 (22,5%)	11 (26,2%)
С	14 (45,2%)	25 (59,5%)
В	10 (32,3 %)	6 (14,3%)
Усього	31 (100%)	42 (100%)

3. Мінливість каріотипових характеристик дочок бугаїв-трансплантантів і бугаїв від штучного осіменіння

Група тварин	Дочки бугаїв-ембріотрансплантантів				Дочки бугаїв, отриманих традиційним способом			
	n	Анеуплоїдні клітини	Поліплоїди	Структурні аберації	n	Анеуплоїдні клітини	Поліплоїди	Структурні аберації
I	13	10,5±2,38	1,0±0,01	14,82±2,87	4	9,5±2,1	1,1±0,01	12,8±2,30
II	13	6,3±1,45	0,45±0,16	12,5±2,87	23	5,7±1,3	0,43±0,29	11,98±1,09
III	5	4,46±0,73	0,17±0,18	10,67±3,28	15	3,56±0,6	0,15±0,11	8,80±1,20

абортів; II група — корови з сервіс-періодом після першої лактації не менше 150 днів; III група — корови, у яких сервіс-період після першої лактації становив 51–90 днів (табл. 3).

У результаті аналізу препаратів хромосом у корів усіх груп виявлено аномалії каріотипу геномного типу і структурні аберації хромосом. Серед аберацій геномного типу переважали клітини з анеуплоїдією і в меншій кількості траплялися клітини з поліплоїдією. Серед мутацій хромосом виявляли фрагменти, розриви, нестачі і асоціації хромосом.

Загальна частота каріотипових порушень у корів-дочок бугаїв від ембріопересадок виявилася вищою приблизно на 10% порівняно з таким самим показником у корів-дочок бугаїв від штучного осіменіння. У корів, які мали хоча б один випадок мертвнонароджень або спонтанних абортів (I група) частота хромосомних порушень була значно вищою, ніж у тварин без грубих репродуктивних порушень (II і III групи).

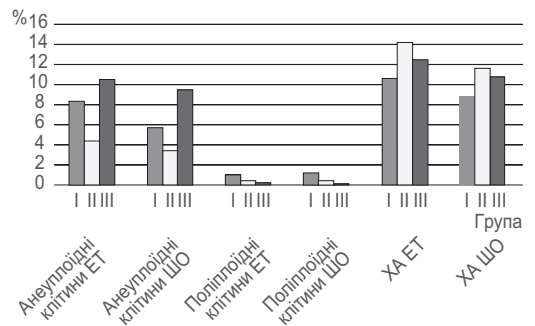
Анеуплоїдія представлена в основному гіпоплоїдними клітинами, аналіз яких встановив достовірну різницю між групами тварин з різною відтворною здатністю як серед дочок бугаїв від ембріопересадок, так і серед дочок бугаїв від штучного осіменіння.

Поліплоїдія — явище кратного збільшення гаплоїдної кількості хромосом в ядрі, трапляється у досліджених тварин у вигляді мозаїцизму, тобто поліплоїди є лише в частині досліджених метафаз. Їхня частка також більша у тварин з порушеною відтворною здатністю.

Рівень структурних аберацій у тварин I і II груп, які сформовані як з корів-дочок бугаїв від ембріопересадок, так і з дочок бугаїв від штучного осіменіння вищий, ніж у тварин з нормальною репродуктивною здатністю (III група) (рисунком).

Генетичні пошкодження є результатом хромосомних аберацій і призводять до утворення мікроядер, які, у свою чергу, є показником різних типів порушень [12]. За допомогою мікроядерного тесту вивчають мутагенну чутливість живих особин. Наявність еритроцитів з мікроядрами свідчить про індукцію хромосомних порушень і/або порушень мітотичного апарату клітин у досліджених тварин.

Проведений нами аналіз частоти еритроцитів з мікроядрами в периферійній крові дочок, бугаїв-батьки яких були отримані з використанням різних біотехнологічних методів, не виявив достовірної різниці і встановив відсутність перевищення рівня спонтанного мутагенезу. Спонтанний рівень еритроцитів з мікроядрами, за даними інших авторів, для ссавців становить близько



Частота цитогенетичних аномалій (% $M \pm m$) у корів української червоно-рябої породи, отриманих від бугаїв-трансплантантів і бугаїв методом штучного осіменіння : ET — корови-дочки бугаїв-трансплантантів; ШО — корови-дочки бугаїв, отриманих методом штучного осіменіння; ХА — сукупність числових і структурних аберацій; I група — тварини з порушеною відтворною здатністю; II група — сервіс-період не менше 150 днів; III група — сервіс-період 51–90 днів

4. Частота еритроцитів з мікроядрами в периферійній крові корів

Група тварин	Кількість		Частка клітин з мікроядрами, %	
	обстежених тварин	досліджених клітин	M±m, P<0,05	Інтервал варіювання
Дочки:				
бугаїв-ембріотрансплантантів	34	17000	0,056 ±0,003	3–16
бугаїв, отриманих традиційним способом	57	28500	0,052 ±0,002	2–20

0,3% [13]. Отримані результати в наших дослідженнях свідчать про відсутність

мутагенних чинників у регіоні розведення даної популяції тварин.

Висновки

У потомків бугаїв, отриманих від ембріо-пересадок, виявлено вищий рівень каріотипової нестабільності. Однак ця різниця менша, ніж між групами корів з різною відтворною здатністю. Отже, для запобігання накопиченню генетичних дефектів у стадах великої рогатої худоби під час

застосування біотехнологічних способів і проведення цілеспрямованої роботи з відтворення потрібно здійснювати систематичний цитогенетичний контроль. До племінної карточки тварини необхідно додати спеціальну графу, де має бути відображена її цитогенетична повноцінність.

Бібліографія

1. Бакай Ф.Р. Цитогенетический мониторинг коров-доноров эмбрионов/Ф.Р. Бакай, М.Д. Камачо Чаваррия, Д.М. Старостин//Современные проблемы в зоотехнии: сб. научн. тр. — Ч. 1/Моск. гос. акад. вет. мед. и биотехнол. — М., 2001. — С. 20–22.
2. Bovine embryo technologies/C. Galli, R. Duchi, G. Crotti et al.//Theriogenology. — 2003. — 59. — P. 599–616.
3. Hasler J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle/J.F. Hasler//Anim Reprod Sci. — 2003. — 79. — P. 245–264.
4. Глазко Т.Т. Геномная нестабильность и контроль коров доноров эмбрионов/ Т.Т. Глазко, Г.Ю. Косовский, В.И. Глазко//Аспекты репродуктивной биотехнологии. — Вып. 1. — М.: Изд-во ООО «ПРИЯТНАЯ КОМПАНИЯ», 2012. — С. 136–143.
5. Взаимосвязь геномной нестабильности и эмбриопродуктивности у коров-доноров эмбрионов/ Т.Т. Глазко, Г.Ю. Косовский, Д.В. Попов, А.В. Бригида// Ветеринария Кубани. — 2015. — № 6. — С. 9–11.
6. Чернева Ф.Р. Ассоциативная способность хромосом у коров-доноров эмбрионов/Ф.Р. Чернева// Актуальн. вопр. селекц.-племен. работы в животноводстве. — М., 1989. — С. 20–22.
7. Маменко О.М. Ризики негативного впливу індустріальних технологій тваринництва на благополуччя тварин (ретроспектива і...?)//О.М. Маменко// Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини:

зб. наук. пр. — Вип. 31, Ч. 1/Харк. держ. зоовет. акад. — Х., 2015. — С. 308–318.
8. Chromosome preparations of leucocytes cultured human peripheral blood/P. S Moorhead, P.C. Nowell, W.J. Mellman et al.//Exp. Cell Res. — 1960. — № 20. — P. 613–616.
9. Плохинский Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников/Н.А. Плохинский. — М.: Колос. — 1969. — 256 с.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов. — 4-е изд., перераб. и доп./Г.Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
11. Бакай А.В. Каріотипическая нестабильность у коров в норме и с нарушениями репродуктивных функций при различных вариантах подбора/А.В. Бакай, Ф.Р. Бакай, А.И. Бакай//Сб. науч. трудов БСХА. Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. — 2014. Вып. 17. — С. 3–12.
12. Водунон А.С. Цитогенетические изменения в эритроцитах больных атопической бронхиальной астмой/А.С. Водунон, Н.А. Пономарева, З.И. Абрамова//Ученые записки Казанского гос. ун-та. — 2008. — Т. 150. — С. 101–105.
13. Ильинских Н.Н. Использование микроядерного теста в скрининге и мониторинге мутагенов/ Н.Н. Ильинских, И.Н. Ильинских, В.Н. Некрасов//Цитология и генетика. — 1988. — Т. 22, № 1. — С. 67–72.

Надійшла 21.04.2017.