

INVESTIGATION OF KARYOTYPE OF FOALS UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS DURING CULTIVATION *IN VITRO*

Mazurkevych A.I., Maliuk M.O.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev

Starodub L.F., Kopilov K.V.

Institute of Animal Breeding and Genetics of NAAS of Ukraine, Brovary

Shown the results of cytogenetic analysis of foals' umbilical cord mesenchymal stem cells depending on the duration of its cultivation in vitro. Found that when cultured MSCs with the increasing number of passages, the number of cells with changed genome are increased, which are characterized by increased proportion of metaphase plates with aneuploidy and the presence of tetraploid cell karyotype. Also found increased limits of micronucleus test parameters. The received results testify the necessity of genetic monitoring of mesenchymal stem cells that are used in recovery cell therapy.

Keywords: in vitro, cytogenetic analysis, genetic monitoring.

УДК 636.2.082.453.5

НОВІ ПІДХОДИ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ НАЦІОНАЛЬНОЇ ХАРКІВСЬКОЇ ТЕХНОЛОГІЇ АСЕПТИЧНОГО ОТРИМАННЯ, КРІОКОНСЕРВУВАННЯ І ВИКОРИСТАННЯ СПЕРМИ БУГАЇВ-ПЛІДНИКІВ

Павленко М.П., Стегній Б.Т., Павленко Л.М., Данілова І.С., Болотін В.І., Павленко В.М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини, м. Харків, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Павленко Б.М.

Інститут тваринництва НААН, м. Харків

У статті наведені дані щодо використання способу кріоконсервації сперми бугаїв із застосуванням концентрованого розріджувача як за Харківською, так і за закордонними технологіями – IMV (Франція) та Nagase (Японія). Відмічені високі біологічні показники сперми після деконсервації, її запліднюючу здатність та водночас підвищення її санітарних показників. Запропонована робота є продовженням комплексу попередніх досліджень відносно способу кріоконсервації генетичних ресурсів, розробці та удосконаленню кріопротективних довозберігаючих середовищ для сперми тварин.

Ключові слова: концентрований кріоконсервант, спосіб кріоконсервації, заплідненість, сперма ВРХ.

Вимоги до санітарної якості сперми плідників за ГОСТом № 27777-88 ставлять на меті профілактику контамінації ендометрія вірус-бактерійними агентами при штучному осіменінні корів глибоко-замороженою спермою бугаїв. Ця проблема набуває особливого значення у зв'язку з інтенсивним впровадженням у виробничу практику новітніх біотехнологій відтворення тварин і широким міжнародним обміном генетичними ресурсами.

Багаточисельними дослідженнями доведено, що сперма плідників, яка оброблена без застосування спеціальних засобів асептики і антисептики, у значній мірі може бути забруднена вірусами і бактеріями [1, 2, 3, 5]. Вони потрапляють у сперму із шкіряного покриву та препуція бугая, нестерильного повітря, посуду, інструментів, приладів, кріопротективних середовищ, рідкого азоту, а також з оточуючого середовища тваринницьких приміщень при штучному осіменінні ВРХ [4, 6, 8]. Застосування інфікованої сперми призводить до виникнення змішаних вірус-бактерійних інфекцій у тварин, які супроводжуються гінекологічними патологіями і проявляються у вигляді ембріональної смертності, абортів, загибелі телят у перші години і дні їх життя та спричиняють післяродові ускладнення, що призводить до безпліддя та яловості корів. У зв'язку з цим, технологія роботи сучасного племінного підприємства повинна забезпечувати відповідний санітарний рівень та високу запліднювальну здатність замороженої сперми, незалежно від терміну її зберігання у рідкому азоті [3].

У світовій практиці розроблені та використовуються Харківська [7], Французька [9] і Німецька [10] технології консервування сперми у герметичних упаковках та Японська [11] у відкритих гранулах. Загальним недоліком усіх без винятку технологій є відсутність гарантованого захисту сперми від контамінації мікроорганізмами при її одержанні, технологічній обробці та використанні для осіменіння корів і телиць.

В основу наших досліджень покладено удосконалення вітчизняної Харківської технології кріоконсервування сперми бугаїв в облицьованих гранулах [7], яка ґрунтується на принципі поточної закритої системи обробки сперми, за якою усі процеси, починаючи з моменту одержання сперми від бугая здійснюються за закритою системою, що забезпечує більш високі показники санітарної якості

заморожено – відталі сперми у порівнянні із відомими аналогами. Подальше вдосконалення викликано необхідністю адаптації технології до міжнародних вимог ASTM та ISO щодо санітарної якості замороженої сперми. При цьому залишаються актуальними питання розробки технології санації препуція бугаїв, виготовлення стерильних кріопротективних середовищ для розбавлення та заморожування сперми та асептичних засобів штучного осіменіння корів спермою, замороженою за регламентованими технологіями.

Мета досліджень. Випробувати новий концентрований розріджувач сперми бугаїв-плідників за Харківською, Французькою та Японською технологіями кріоконсервації.

Матеріали та методи. Об'єктом досліджень були: стерильний концентрований кріоконсервант, бугаї та отримана від них сперма, самиці великої рогатої худоби, що належать сільськогосподарському кооперативу «Восток» Ізюмського району Харківської області. В якості контролю використовували стандартне лактозо-жовтково-гліцеринове середовище, яке застосовують за різних технологій заморожування сперми бугаїв.

Осмотичний тиск середовищ вимірювали кріоскопічним методом з використанням термометра Бекмана, концентрацію водневих іонів визначали на іономері EB-74. Стерилізацію концентрованого середовища проводили термічним способом на водяній бані за температури 75 °С протягом 30 хв.

Одержання, оцінювання, розбавлення, розфасування, заморожування, зберігання та використання сперми здійснювали за Харківською технологією. Рухливість, виживаність у годинах і показник абсолютної виживаності визначали відповідно до діючих стандартів на нативну і заморожену сперму [ДСТУ 3535-97, ГОСТ 26030-83, ГОСТ 27777-88].

При заморожуванні сперми бугаїв за імпорними технологіями застосовували спосіб її розбавлення за Харківською технологією [13], який відрізняється тим, що спермії спочатку обробляють середовищем, що містить жовток, який виконує фортифікацію цитоплазматичної мембрани спермія ліпопротеїдами жовтка, а через 5–7 хвилин додатково розбавляли безжовтковим розріджувачем до концентрації згідно показників ФЕК (фотоелектроколометра). Дослідження зразків концентрованого кріоконсерванту на бактеріальну забрудненість проводили за методикою Балашова Н. Г. [1].

У дослідах при вивченні запліднювальної здатності до порівняльних груп підбирали тварин за принципом пар аналогів. Самиць осіменяли інтрацервікально однократно або двократно в одну охоту mano- та ректоцервікальним способом.

Запліднюваність визначали за результатами ректальних досліджень. Отримані результати піддавали опрацюванню за методом варіаційної статистики з використанням критеріїв Ст'юдента. Різниця вважалась вірогідною при $p < 0,05$.

Результати роботи. З метою уніфікації способу кріоконсервації сперми за Харківською технологією [7] і концентрованого довгозбереженого кріоконсерванту [14], для імпорних технологій кріоконсервації сперми [9-11] визначили ефективність їх застосування.

Дослідження проводили на розділених еякулятах в ідентичних умовах для дослідних і контрольних проб. За контроль приймали кріоконсервацію за Харківською технологією. Результати досліджень фізіологічних показників сперми після заморожування – відтавання представлені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Фізіологічні показники сперми бугаїв після її деконсервації (n=9), (M±m)

Технологія кріоконсервування	Зразки	Фізіологічні показники сперміїв				Достовірність (P)
		Рухливість перед заморожуванням	Рухливість після відтавання	Показник абсолютної виживаності	Виживаність в годинах	
Харківська (облицьовані гранули)	Дослід	7,0±0,2	4,7±0,02	18,2±1,2	9,1±0,3	<0,05
	Контроль	7,0±0,2	4,2±0,1	17,1±1,5	8,0±0,5	
Французька (пасти)	Дослід	7,0±0,2	4,3±0,1	17,2±1,2	8,3±0,3	<0,05
	Контроль	7,0±0,2	4,1±0,1	15,7±1,3	7,9±0,4	
Японська (відкриті гранули)	Дослід	7,0±0,2	4,5±0,3	16,2±1,1	7,5±0,3	<0,05
	Контроль	7,0 ±0,2	4,2±0,2	14,3±1,2	6,2±0,2	

Згідно отриманих даних фізіологічні показники сперміїв бугаїв-плідників у досліді після відтавання були вище у порівнянні з контрольним середовищем.

У наступному досліді визначали вплив строків зберігання концентрованого середовища на фізіологічні показники сперми після заморожування-відтавання. При бактеріологічних дослідженнях

Розділ 8. Біотехнологія

визначали в середовищах загальне бактеріальне забруднення та колі-титр. Отримані результати досліджень наведені в таблиці 2.

Таблиця 2 – Вплив строків зберігання концентрованого середовища на його санітарні і кріозахисні властивості при заморожуванні сперми бугая (n=20), (M+m)

Фізіологічні показники сперми	Місяці								Достовірність (P)
	0		3		6		12		
	К	Д	К	Д	К	Д	К	Д	
a	4,3± 1,2	4,2± 1,2	4,2± 1,2	4,5± 0,1	4,1± 0,1	4,7± 0,1	4,2± 0,1	4,6± 0,1	-
Sa	15,8± 0,02	23,8± 0,02	16,8± 1,2	16,6± 1,3	16,6± 1,5	21,3± 1,3	16,6± 1,3	19,5± 1,1	<0,001
t	7,5± 0,5	9,3± 0,5	7,6± 0,2	7,6± 0,2	7,4± 0,3	8,6± 0,3	7,5± 0,2	8,1± 0,3	<0,001
MT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
КТ	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітки: 1. a- рухливість після заморожування-відтавання, 2. Sa – показник абсолютної виживаності, 3. t – виживаність в годинах, 4. MT - кількість мікробних тіл в 1 см³, 5. КТ - колі-титр, 6. К – контроль, 7. Д - дослід

Дані таблиці 2 свідчать про те, що зберігання протягом 12 місяців концентрованого середовища, підданого додатковому термічному обробленню, забезпечило його стерильність і зберігання біологічних властивостей сперми бугаїв. Дослідні зразки були достовірно кращими за контроль, що дало підставу для наших подальших досліджень щодо запліднювальної здатності сперми, обробленої і замороженої в дослідному консерванті за різними технологіями кріоконсервації сперми (Французька, Японська), Харківська приймалась за контроль.

На заключному етапі значний інтерес представляли дослідження щодо впливу строків зберігання, виготовлених за нашою методикою середовищ на збереженість її санітарно-гігієнічного рівня та кріозахисних властивостей. Під час вивчення строків зберігання концентрованого жовткового середовища встановлено, що воно зберігає свої початкові санітарні і біологічні властивості впродовж 12 місяців (період досліджу).

Надалі нами вивчалась запліднювальна здатність корів, їх осіменяли в кінці охоти манометричним або ректоцервікальним способом. Заплідненість визначали через 2 місяці після осіменіння за результатами ректальних досліджень та отелень. Результати представлені в таблиці 3.

Таблиця 3 – Запліднювальна здатність сперми залежно від застосованих для її кріоконсервації технологій (n=60)

Вид технології кріоконсервації сперми	Осіменено корів, гол.	Заплідненість після першого осіменіння, гол.	Заплідненість, %
Харківська – облицьовані гранули (контроль)	31	24	77,4
Французька – пайети	15	11	73,3
Японська – відкриті гранули	14	10	71,4

З даних таблиці 3 видно, що заплідненість самиць спермою законсервованою у дослідному середовищі за різними технологіями була нижче на 0,05 одиниць (у пайетах) у порівнянні з контролем, але ця різниця недостовірна, а при осіменінні корів спермою у відкритих гранулах заплідненість у порівнянні з контролем була достовірно нижчою за контроль на 0,05.

Висновки. У результаті досліджень встановлено, що запропонований концентрований розріджувач може застосовуватися за Харківською, Французькою та Японською технологіями кріоконсервації сперми бугаїв-плідників. При цьому відмічено підвищення показників біологічної активності спермій після деконсервації у порівнянні зі стандартним лактозо-жовтково-гліцеринним середовищем. Зберігання впродовж 12 місяців не впливає на якість та стерильність розробленого розріджувача.

Список літератури

- 1 Балашов, Н. Г. Ветеринарный контроль при искусственном осеменении животных [Текст] / Н. Г. Балашов — М., 1980. — 272 с.
- 2 Балашов, Н. Г. Ветеринарно-санитарный контроль при международном обмене спермой [Текст] / Н. Г. Балашов // Доклады сов. ученых к XIX Всемир. конгр. — М., 1971. — С. 6–8.
- 3 Ветеринарно-санитарные требования к сперме при искусственном осеменении животных [Текст] / Н. Г. Балашов [и др.]. — М. : Колос, 1977. — 16 с.
- 4 Гавриков, А. М. О микробной загрязненности семени быков [Текст] / А. М. Гавриков, А. А. Шевченко, А. С. Филиппов // Животноводство. — 1971. — № 10. — С. 84–85.
- 5 Инструкция по организации и технологии работы станций и предприятий по искусственному осеменению сельск'охозяйственных животных [Текст]. — М. : Колос, 1981. — 170 с.
- 6 Стегний Б.Т. Обнаружение вирусов и бактерий в замороженной сперме племенных быков [Текст] /Стегний Б.Т., Стеценко В.И., Кучерявенко Р.А., Герилович А.П., Болотин В.И., Павленко Л.Н., Кучерявенко В.В., Данилова И.С., Тузан И.В.// Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб. - X., 2013. - Вип. 97. - С.240-241.
- 7 Осташко, Ф. И. Харьковская технология асептического взятия и криоконсервации спермы быков-производителей [Текст] : метод. рек. / Ф. И. Осташко, М. П. Павленко, Г. Н. Кузнецов. — X., 1990. — 47 с.
- 8 Третьяков, А. Д. Задачи ветеринарной службы по воспроизводству скота [Текст] / А. Д. Третьяков // Ветеринария. — 1974. — № 4. — С. 86–90.
- 9 Ветеринарное законодательство [Текст] : вет. устав СССР, положения, указания, инструкции, наставления, правила по вет. делу / ред. А. Д. Третьяков. — М. : Колос, 1972. — Т. 2. — 719 с.
- 10 Cassou, R. La methode des Paillettes en plastique adoptee a la generalization de la coagulation [Text] / R. Cassou // V Congresso Internazionale per la Riproduzione Animale e la Fecondazione Artificiale. — Trento, 1964. — Vol. 6. — P. 450–456.
- 11 Nagase, N. Studies on deep freezing technique for bull semen. Deep freezing of bull semen in tablet form [Text] / N. Nagase, T. Niwa // Jap. J. Anim. Reprod. — 1963. — P. 162–168.
- 12 Simmit, L. Konfektionierung von Bullensperma in Kunststoffrohren nach der Landshuter Methode [Text] / L. Simmit // Tierartzl. Uaschau. 7 Intern. Congr. — Munchen, 1972. — P. 207–209.
- 13 А. с. 523693 СССР. МКИ А61D 7/02. Способ консервирования спермы животных [Текст] / М. П. Павленко. — №2049021/15 ; заявл. 26.07.74; опубл. 05.08.76, Бюл. №27. — 4 с.
- 14 Деклараційний патент на корисну модель № 66039 Україна, МПК 2004 61D 7/00. Кріопротективне середовище і спосіб його виготовлення [Текст] / Павленко М.П., Павленко Б.М., Павленко Л.М. (Україна); заявник та правовласник Нац. наук. центр «Ін т експерим. і клініч. вет. медицини». — № u200714142 ; заявл. 15.07.03 ; опубл. 15.04.04, Бюл. № 4. — 2 с.

NEW APPROACHES FOR USING OF NATIONAL KHARKOV TECHNOLOGY OF ASEPTIC SAMPLING, CRYOPRESERVATION AND USAGE OF BULL SEMEN

Pavlenko M.P., Stegny B.T., Pavlenko L.M., Danilova I.S., Bolotin V.I., Pavlenko V.M.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkiv

Pavlenko B.M.

Institute of Animal NAAS, Kharkiv

***Objective.** To test concentrated diluent of bull semen using Kharkiv, French and Japanese technologies of cryoconservation.*

***Materials and Methods.** Preparation, evaluation, dilution, packaging, freezing, storage and use of bovine sperm were performed according to the Kharkov technology. Motility, survival in hours and absolute survival rate was determined in accordance with the applicable national standards for native and frozen sperm. Cows were inseminated once (intracervical) or twice (mano- and rectocervical). The study of concentrated cryoprotectant samples for bacterial contamination was performed as described by Balashov N. G.*

***Results.** The effectiveness of the developed cryopreservation in various technologies of semen freezing using nine measured was estimated by such indicators: the mobility of sperm (a) after freezing and thawing in the coated pellets, straws and open granules was 4.7 ± 0.02 ; 4.3 ± 0.1 ; 4.5 ± 0.3 (points); at the control: 4.2 ± 0.1 ; 4.1 ± 0.1 ; 4.2 ± 0.2 respectively. Absolute survival of sperm (Sa) was — 18.2 ± 1.2 ; 17.5 ± 1.2 ; 16.2 ± 1.1 units; at the control 17.1 ± 1.5 ; 15.7 ± 1.3 ; 14.3 ± 1.2 . Survival (t) — 9.1 ± 0.3 ; 8.3 ± 0.3 ; 7.5 ± 0.3 hours; at the control 8.0 ± 0.5 ; 7.9 ± 0.4 ; 6.2 ± 0.2 respectively.*

Fertilizing capacity of sperm that was frozen using developed cryopreservation after the first insemination (in %) 75.9 ± 0.01 – in Kharkiv technology; 74.4 ± 0.01 – French; 72.1 ± 0.01 – in Japanese.

***Conclusions.** It was found that the proposed concentrated cryopreservation can be used in Kharkiv, French and Japanese cryoconservation technologies of bovine sperm. There is increase of indicators of biological activity of spermatozoa after deconcentration compared to the standard lactose-yolk-glycerol medium. Storage for 12 months did not affect the quality and sterility of developed diluent.*

Keywords: concentrated cryopreservation, the method of cryopreservation, fertilization, bovine sperm.