

ОСТАПОВЕЦЬ Л.І., ТРОЦЬКИЙ П.А.

Інститут розведення і генетики тварин НААН України,

Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,

e-mail:ostlara@online.ua

ВИКОРИСТАННЯ ГЕНЕТИКО-БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ОЦІНКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ООЦИТІВ КОРІВ І СВИНЕЙ *IN VITRO*

Інтенсифікація тваринництва привела до підвищеного попиту на більш продуктивні спеціалізовані породи сільськогосподарських тварин, які стали поширюватись за рахунок витіснення місцевих, локальних порід. В той же час створення нових порід, типів і ліній тварин неможливо без успадкованої різноманітності ознак, які залучаються до селекційного процесу. Переважна більшість місцевих порід у ході еволюції придбала і в теперішній час має спадкові ознаки, які потребує сучасне тваринництво. Унікальні гени і комплекси генів популяцій місцевих порід підвищують ефективність селекції при використанні їх в удосконаленні існуючих і виведенні нових порід, типів і ліній. Тому гени, що зникають при селекції, можуть бути втрачені назавжди. Виходом із цього є використання сучасних генетико-біотехнологічних методів відтворення в тваринництві. В результаті успішного впровадження біотехнологічних розробок в практику є можливість прискорення добору бажаних генотипів сільськогосподарських тварин з врахуванням широкого спектру критеріїв їх племінної цінності [1–3].

Успішність проведення біотехнологічних досліджень обумовлена синхронізацією великої кількості ооцитів на певних стадіях мейозу. Метод кріоконсервування і культивування деконсервованих гамет *in vitro* є основним джерелом одержання необхідного біологічного матеріалу для розробки методів зберігання та практичного використання генетичного потенціалу у тваринництві. Переважно більшістю дослідників при одержанні *in vitro* ембріонів, як вихідний біологічний матеріал для дозрівання поза організмом, використовують ооцит-кумулюсні комплекси, вилученні із антральних фолікулів яєчників тварин. Проте, розбіжності в результатах досліджень з культивування ооцит-кумулюсних комплексів свідчать про необхідність подальшого дослідження морфологічних та цитогенетичних особливостей дозрівання ооцитів корів і свиней в умовах *in vitro* та їх компетентність до ембріонального розвитку після партеногенетичної активації або запліднення поза організмом. Ці біотехнологічні дослідження будуть сприяти вивченню кількісних та якісних показників змін стану хромосом на різних стадіях мейозу і раннього ембріогенезу [4–6].

Метою досліджень була цитогенетична оцінка дозрівання *in vitro* деконсервованих ооцитів корів та вивчення закономірності перебігу мейозу у ооцитах свиней при культивуванні.

Матеріал і методи

Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулюсні комплекси корів чорно-рябої породи та свиней великої білої породи. Ооцити корів

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 [7]. Перед заморожуванням гамет обробляли еквілібраційним розчином (10 хв.) потім переносили у вітрифікаційний розчин (30 с). Виведення криопротекторів після розморожування гамет корів і свиноматок проводили шляхом перенесення їх на 10 хвилин у розчин 1,0 М сахарози. Збереженість гамет корів після деконсервування оцінювали за морфологічними і цитогенетичними показниками та культивування. Дозрівання ооцит-кумулясних комплексів поза організмом проводили в присутності клітин гранульози, концентрація якої складала $3\text{--}6 \times 10^6$ клітин у 1 мл культурального середовища, в чотирилуноквих планшетах ("Costar") протягом 27 год. при температурі $38,5\text{ }^\circ\text{C}$ та 5%-ному вмісті CO_2 в повітрі, у краплях середовища 199 з 10%-ною попередньо інактивованою сироваткою корів, 1,0 мкг/мл естрадіолу ("Serva"), 2,5 МОд/мл лютеїнізуючого гормону ("Serva"), 2,0 мМ натрію пірувату ("Sigma"), 2,92 мМ кальцію лактату ("Sigma"), 40 мкг/мл гентаміцину.

З метою оцінки стадії мейотичного дозрівання поза організмом деконсервованих і нативних (контрольна група) ооцит-кумулясних комплексів корів та виявлення хромосомних порушень у гамет протягом дозрівання, частина клітин із загальної кількості, поставлених на культивування, підлягала цитогенетичному аналізу. Для приготування сухоповітряних препаратів за методом А.К. Tarkowski [8], ооцит-кумулясні комплекси спочатку механічно (піпетуванням) звільняли від клітин кумулюса, потім на 10 хв при кімнатній температурі переносили у 0,9%-ний гіпотонічний розчин 3-х заміщеного цитрату натрію і фіксували на попередньо знежиреному сухому склі фіксатором Карнуа (метанол : льодяна оцтова кислота = 3:1). Препарати забарвлювали 2,0%-ним розчином барвника Гімза.

Вилучення ооцит-кумулясних комплексів свиней проводили шляхом розрізання антральних фолікулів у середовищі 199 з 25 мМ Hepes ("Sigma"), яке містило 10% сироватки крові корів. Відібрані за морфологічними ознаками ооцит-кумулясні комплекси культивували в середовищі 199 на розчині Ерла ("Sigma"), яке містило 20% еструсної сироватки крові корів та клітин гранульози в концентрації $3\text{--}5 \times 10^6$ клітин на 1 мл культурального середовища. Дозрівання ооцитів свиней здійснювали при температурі $+38,8\text{ }^\circ\text{C}$ в атмосфері повітря з 4% CO_2 та при максимальній вологості. Для дослідження стану мейотичних хромосом під час дозрівання ооцитів поза організмом готували сухоповітряні препарати за модифікованим нами методом А.К. Tarkowski [8]. Ооцити свиней переносили на 10 хвилин у краплю 0,26%-го гіпотонічного розчину цитрату натрію з подальшою фіксацією сумішшю метанол-оцтової кислоти в співвідношенні 2:1. Фарбування препаратів проводили з використанням 2,0%-го розчину барвника Гімза.

Результати та обговорення

Проведено дослідження з вивчення впливу гліцерину, пропандіолу, етиленгліколю в еквілібраційному розчині на життєздатність і подальший розвиток *in vitro* деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів корів.

Заморожували ооцит-кумулясні комплекси корів з використанням трьох різних еквілібраційних розчинів: гліцерин — група А, пропандіол — група Б, етиленгліколь — група В. В контрольній групі гамети не заморожували. Результати наших досліджень показали наявність взаємозв'язку між різними кріопротекторами у еквілібраційному розчині та рівнем мейотичного дозрівання деконсервованих ооцитів корів в умовах *in vitro*. За результатами експериментальних досліджень встановлено, що рівень дозрівання деконсервованих ооцитів, заморожених з використанням гліцерину різниться, порівняно із етиленгліколем у еквілібраційному розчині за такими показниками як кількість дозрілих до метафази II мейозу (51,7% (гр. А) проти 63,4% (гр. В), ($p < 0,05$)) та кількість клітин з хромосомними порушеннями (35,6% проти 23,2%, ($p < 0,05$) відповідно). Позитивні результати отримані нами при кріоконсервуванні ооцит-кумулясних комплексів корів при застосуванні пропандіолу (гр. Б) у еквілібраційному розчині. Рівень дозрівання поза організмом гамет корів становить 57,1% та порушень хромосомного матеріалу 30,4%.

Таким чином, нашими дослідженнями встановлена різна чутливість ооцит-кумулясних комплексів корів до кріопротекторів та різна властивість дозрівання поза організмом деконсервованих ооцитів до метафази II мейозу *in vitro*. Ця нерівномірність корегує з морфологічним та цитогенетичними властивостями і в загальному характерна для всіх досліджених ооцит-кумулясних комплексів корів. Виходячи із одержаних нами даних цитогенетичної оцінки кріоконсервованих ооцит-кумулясних комплексів корів з різними кріопротекторами у еквілібраційному розчині, вважаємо, що застосування етиленгліколю забезпечить при високих кріопротекторних властивостях меншу токсичність еквілібраційного розчину, що в свою чергу, сприяє більш повноцінному дозріванню деконсервованих ооцитів і цим зумовлює перевагу.

Застосування морфологічного та цитогенетичного методу, тобто проведення візуальної оцінки ооцитів за станом кумулюсу та ооплазми і подальшого цитогенетичного аналізу хроматину таких гамет дозволило встановити, що ооцити оточені клітинами кумулюсу без ознак дегенерації та із гомогенною ооплазмою є найбільш придатними для дозрівання *in vitro* [9]. Відомо, що перебування ооцитів на певних стадіях мейотичного дозрівання *in vitro* залежить від часу культивування. Проведені дослідження з вивчення мейотичного стану хромосом ооцитів свиней на 18, 32 та 46 годину дозрівання *in vitro*. За результатами цитогенетичного аналізу ооцитів свиней встановлено, що на 18, 32 та 46 годину культивування незначна кількість гамет не відновила мейотичного дозрівання і перебувала на стадії диплотени (відповідно 2,9; 7,1 та 5,7%). В ооцитах свиней, які культивували 32 години,

спостерігали найбільшу та однакову кількість гамет на стадії метафази I та анафази I, що становило 28,6%. Проте, зі збільшенням часу дозрівання до 46 годин спостерігали поступове зменшення кількості гамет на стадії метафази I, що достовірно менше, порівняно із 18 та 32 годинами (9,4% проти 28,6% ($p < 0,01$) та 44,2% ($p < 0,001$), відповідно). Зниження кількості ооцитів на стадії метафази I відбувалося внаслідок переходу частини клітин на більш просунуті стадії мейозу. Так для стадії метафази II цей показник становив 60,4% клітин, що достовірно більше, порівняно з 18 та 32 годинами культивування (8,8% ($p < 0,01$) та 10,7% ($p < 0,001$), відповідно). Рівень дегенерації хромосом між часовими параметрами суттєво не відрізнявся і знаходився в межах 2,9–15,9%. Таким чином, на 46 годину більше половини гамет завершили мейотичне дозрівання *in vitro*, що узгоджуються з даними інших авторів, про більш тривалий термін культивування ооцит-кумулясних комплексів свиней, порівняно з іншими видами сільськогосподарських тварин [10, 11].

Висновки

1. Проведені дослідження морфологічного і цитогенетичного аналізу гамет корів і свиней спрямовані на комплексну оцінку кількісних та якісних показників стану хромосом та рівня хромосомних аберацій в мейозі при культивуванні.

2. Використання при оцінці якості деконсервованих і прокультивованих *in vitro* ооцитів корів цитогенетичного аналізу дозволяє встановити, що 63,4% з них після розморожування і культивування поза організмом досягали метафази-2 мейозу, а 23,2% мали хромосомні порушення.

3. Проведений порівняльний цитогенетичний аналіз ооцитів свиней за різних термінів культивування виявив, що подовження терміну культивування до 46 годин дозволило одержати більшу кількість ооцитів на стадії метафази II, порівняно з 18 та 32 годинами (60,4% проти 8,8% та 10,7%, відповідно).

Література

1. Руденко С.В. Роль і перспективи сучасних методів біотехнології в умовах інтенсифікації тваринництва / С.В. Руденко, О.Є. Гузеватий // Науково-технічний бюлетень.— Харків, 2008.— №96.— С. 44–49.

2. Яблонський В.А. Біотехнологія відтворення тварин: Підручник.— К.: Арістей, 2005.— 296 с.

3. Bazer F.W. Reproductive biology in the era of genomics biology / F.W. Bazer, T.E. Spencer // Theriogenology.— 2005.— Vol.64, №3.— P. 442–456.

4. Получение клонированных эмбрионов крупного рогатого скота при использовании в качестве цитопластов ооцитов, созревающих *in vitro* / К.В. Кириенко, А.Г. Логвинов, И.Г. Сметанина [и др.] // Актуальные проблемы биологии в животноводстве: четвертая междунар. конф.— Боровск, 2006.— С. 238–239.

5. Keefer C.L. Lessons learned from nuclear transfer (cloning) / C.L. Keefer // Theriogenology.— 2008.— Vol.69, №1.— P. 48–54.

6. Funahashi H. Advances in *in vitro* production of pig embryos / H. Funahashi, B.N. Day // Journal of reproduction and fertility. Supplement.— 1997.— Vol.52.— P. 271–283.

7. Гузеватий О.С. Методики оцінки якості ооцит-кумулясних комплексів корів для кріоконсервування / О.С. Гузеватий, П.А. Троцький, Ю.М. Собко // Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві.— К.: Аграрна наука, 2005.— С. 180–187.

8. Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A.K. Tarkowski // Cytogenetics.— 1966.— Vol.5, №3.— P. 394–400.

9. Остаповець Л.І. Морфологічна та цитогенетична оцінка незрілих ооцитів свиней / Л.І. Остаповець // Вісник проблем біології і медицини.— 2008.— №1.— С. 42–47.

10. Cytogenetic evaluation of in vitro matured bovine oocytes collected from ovaries of individual donors / J. Sosnowski, M. ZwitoDski, D. Lechniak [et al.] // Theriogenology.— 1996.— Vol.45, №4.— P. 865–872.

11. Prather R.S. Practical considerations for the in vitro production of pig embryos / R.S. Prather, B.N. Day // Theriogenology.— 1998.— Vol.49, №1.— P. 23–32.

Резюме

Наведено результати експериментальних досліджень використання сучасних генетико-біотехнологічних методів оцінки якості гамет. Встановлено, що використання цитогенетичного методу оцінки дозволяє встановити ступінь мейотичної зрілості деконсервованих і прокультивованих гамет корів та закономірності перебігу мейозу в ооцитах свиней при дозріванні *in vitro*.

Приведены результаты экспериментальных исследований использования современных генетико-биотехнологических методов оценки качества гамет. Установлено, что использование цитогенетического метода оценки позволяет установить степень мейотического созревания деконсервированных и прокультивированных гамет коров и закономірности прохождения мейоза в ооцитах свиней при созревании *in vitro*.

The results of experimental researches the use of modern genetic-biotechnological methods estimation of quality gamets are resulted. It is set that the use of cytogenetics method estimation allows to set the degree of meiotic maturing of frozen-thawed and maturation gamets cows and mechanism passing of meiosis of porcine oocytes during maturation *in vitro*.

САВЕНКО Е.Г., ГЛАЗЫРИНА В.А., ШУНДРИНА Л.А.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт риса
Россия, г. Краснодар, 350921, п/о Белозерное, E-mail: arrri_kub@mail.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ КУЛЬТУРЫ ПЫЛЬНИКОВ РИСА *IN VITRO*

При длительном культивировании каллусов (более 50 дней) на искусственных питательных средах в условиях *in vitro* у них теряется способность к регенерации растений [16]. В опытах использовали янтарную кислоту (ЯК) (бутандиовая — двухосновная предельная карбоновая кислота), которая в настоящее время рассматривается как эффективный, дешевый и экологи-