

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 чорнорябої породи. Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко, виловлювали 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-кумулясні комплекси корів культивували в чотирьохлункових планшетах протягом 27 год при температурі 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub> 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 A.K. [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) установлено, 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-кумуляюсних комплексів корів**

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

*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-кумуляюсних 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

Варианти дослідів	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 <sup>a</sup>	13	16,2	29	36,3 <sup>e</sup>
Б	91	82	90,1	40	48,8 <sup>a</sup>	14	17,1	28	34,1 <sup>e</sup>
В	94	85	90,4	46	54,1 <sup>ca</sup>	14	16,5	25	29,4 <sup>eh</sup>
Г	90	79	87,8	46	58,2 <sup>ca</sup>	13	16,5	20	25,3 <sup>eg</sup>
Д	96	88	91,7	56	63,6 <sup>cb</sup>	12	13,7	20	22,7 <sup>eg</sup>
К	88	—	—	73	82,9 <sup>d</sup>	5	5,7	10	11,4 <sup>f</sup>

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, 1. 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-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ КОРОВ. П.А. Троцкий**

*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 EKUILIBRATION 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.*