

КОМПЛЕКСНИЙ ПІДХІД ДО ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИКО-РЕПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ КНУРІВ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ

*Л. І. Остаповець, кандидат біологічних наук
Л. Ф. Стародуб, кандидат сільськогосподарських наук
Інститут розведення і генетики тварин НААН*

*Наведено дані щодо дослідження запліднювальної здатності сперматозоїдів кнурів різних порід на основі моделювання процесу взаємодії гамет в умовах *in vitro* та цитогенетичної оцінки хромосомного поліморфізму соматичних клітин плідників.*

*Ооцит, сперматозоїд, *in vitro*, запліднення, ембріон, каріотип, хромосомні аберації, свині.*

Інтенсифікація галузі тваринництва суттєво залежить від правильної системи формування стада, інтенсивності використання маточного поголів'я та плідників. Контроль і оцінка відтворювальних якостей кнурів загальноприйнятими методами за якістю потомства не дає повних даних про морфофункціональний стан організму, ступінь впливу нестабільності каріотипу на відтворювальну здатність плідників, формування величини багатоплідності у спарованих ними свиноматок та виходу поросят. Загальноприйняті методи оцінки ускладнюються ще й тим, що ряд успадкованих хромосомних аномалій фенотипово проявляються лише у дорослих тварин, одержаних від батьків-носіїв із прихованими генетичними дефектами [3]. Тому для повної характеристики генетико-репродуктивного потенціалу плідників доцільно проводити комплексний моніторинг, складовою частиною якого є аналіз каріотипу тварини та перевірка запліднювальної здатності сперматозоїдів за допомогою методу запліднення яйцеклітин *in vitro*.

Проведення запобіжної діагностики генетичного потенціалу кнурів комерційних порід із застосуванням цитогенетичних методів дає можливість оцінити мутабільність факторів зовнішнього середовища, визначити ступінь впливу хромосомних аномалій на продуктивні та репродуктивні властивості тварин, їх життєздатність, вірогідність генетичного ризику на основі обліку частоти і спектру хромосомних мутацій у соматичних клітинах [8]. Згідно з «Інструкцією із штучного осіменіння свиней», запліднювальну здатність сперми кнура слід перевіряти не менше, ніж за п'ятьма еякулятами та осіменінням двадцяти свиноматок [9], що пов'язано з великими витратами коштів і часу. Моделювання процесів взаємодії жіночих та чоловічих гамет в умовах *in vitro* дозволяє швидко, об'єктивно, з меншими витратами оцінити запліднювальну здатність сперматозоїдів плідників порівняно із застосуванням штучного осіменіння [1, 10]. Так, в одному досліді можна осіменити до 100 дозрілих *in vitro* ооцитів сперматозоїдами

від одного кнура та через шість днів мати результати запліднювальної здатності сперматозоїдів.

Таким чином, впровадження в практику тваринництва комплексного підходу щодо визначення та прогнозування генетико-репродуктивного потенціалу плідників, який базується на проведенні пролонгованого цитогенетичного скринінгу тварин продуктивних комерційних порід із прихованим нестабільним каріотипом, мутаційна мінливість яких проявиться у потомстві наступних поколінь або під час перебування тварини в умовах з підвищеним рівнем генотоксичних факторів та перевірки запліднювальної здатності сперматозоїдів за допомогою методу запліднення яйцеклітин *in vitro*, дасть можливість у короткий термін об'єктивно оцінити племінну цінність тварин.

Мета досліджень – оцінка відтворювальних якостей кнурів різних порід із використанням цитогенетичних та біотехнологічних методів.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктом досліджень були три кнури віком 2 роки породи велика біла, п'єтрен та PIC 337 м'ясної синтетичної лінії L-65, які утримувались у типових умовах ТОВ "Прилуцьке племпідприємство".

Методика одержання цитогенетичних препаратів із лімфоцитів периферійної крові передбачала таку послідовність етапів: взяття крові, її транспортування, підготовку стерильних флаконів із живильним середовищем, приготування препаратів, забарвлення, аналіз метафазних пластинок, фотографування [11]. У процесі досліджень визначали відсоток метафазних пластинок із кількісними порушеннями (анеуплоїдія), клітини із асинхронністю розщеплення центромірних районів хромосом (АРЦРХ) та структурними порушеннями – розривами хромосом. У кожній тварини аналізували 100 метафазних пластинок.

Мікроядерне тестування проводили на цих самих препаратах, підраховуючи двоядерні лімфоцити (ДЯ), одноклітинні лімфоцити з мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (МІ).

Ооцит-кумулясні комплекси одержували з яєчників забитих свиней великої білої породи. Ооцити дозрівали *in vitro* в середовищі ТС 199 з додаванням 20% еструсної сироватки крові корів і $3-5 \times 10^6$ клітин гранульози/мл (клітини гранульози одержували із фолікулів діаметром 3–4 мм без атретичних змін та з морфологічно нормальним ооцитом). Культивували ооцит-кумулясні комплекси свиней упродовж 45 годин за температури $+38,8$ °C і 4% CO_2 у повітрі. Для запліднення *in vitro* використовували еякульовані сперматозоїди кнурів. Рухливі сперматозоїди відбирали методом спливання (swim-up) у середовищі TALP без іонів кальцію [12]. Спільну інкубацію дозрілих *in vitro* ооцитів та відібраних методом swim-up сперматозоїдів проводили протягом 20 годин у модифікованому середовищі Тіроде (TALP) із додаванням 10 $\mu\text{g/ml}$ гепарину, 20 μM пеніциламіну, 10 μM гіпотаурину та 1 μM епінефрину. Відмиті від сперматозоїдів передбачувані зиготи культивували *in vitro* у середовищі NCSU-23. Цитогенетичні препарати ооцитів та ядер ембріонів готували за модифікованим нами методом А. К. Тарковського [13]. Препарати фарбували з

використанням 2%-го розчину барвника Гімза та аналізували їх під світловим мікроскопом при збільшенні ок.10×, об.100×. Морфологічний аналіз сперматозоїдів на наявність патологічних форм здійснювали під мікроскопом за загальноприйнятою методикою.

Статистичне опрацювання отриманих даних здійснювали стандартними методами [5] із використанням комп'ютерної програми «Microsoft Excel».

Результати досліджень. З метою розробки способу комплексної оцінки плідників із застосуванням біотехнологічних та цитогенетичних методів у системі біотехнологічної репродукції сільськогосподарських тварин, було проведено оцінку запліднювальної здатності сперматозоїдів трьох кнурів порід велика біла, п'єтрен та РІС 337 м'ясної синтетичної лінії L-65 на основі методу запліднення дозрілих *in vitro* ооцитів та цитогенетичної оцінки хромосомного поліморфізму соматичних клітин плідників. За результатами перевірки запліднювальної здатності сперматозоїдів кнурів порід велика біла (№77376), п'єтрен (№70858), РІС 337-гібрид в умовах *in vitro* встановлено, що рівень дроблення ембріонів свиней з використанням для осіменіння дозрілих *in vitro* ооцитів еякульованих сперматозоїдів кнура РІС 337 гібрид був найвищим (62,0 %) і перевищував на 6,0 % та 1,2 % відповідні показники плідників порід велика біла і п'єтрен, проте вірогідної різниці між запліднювальною здатністю гамет кнурів після осіменіння дозрілих *in vitro* ооцитів не було виявлено (табл. 1, рис. 1).

1. Кількісні показники відтворювальної здатності сперматозоїдів кнурів

Порода, індивід № кнура	Об'єм еякуляту, мл	Концентрація сперматозоїдів, млрд/мл	% патологічних форм	Всього осіменених яйцеклітин, n (%)	Рівень дроблення ембріонів <i>in vitro</i> , n (%)
П'єтрен (77376)	273	1,49	2,2	51	31 ^a (60,8±6,84)
Велика біла (70858)	215	1,12	2,4	50	28 ^a (56,0±7,02)
РІС 337-гібрид	168	1,09	1,4	50	31 ^a (62,0±6,86)

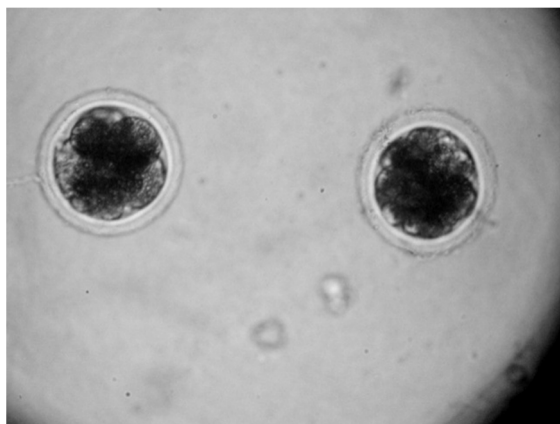


Рис. 1. Ембріони свиней, сформовані після запліднення еякульованими сперматозоїдами дозрілих поза організмом ооцитів, ок.10×, об.40×

Результативність штучного осіменіння самок залежить від якості сперми, яку отримано від плідника. Оцінка сперми дає можливість, насамперед, визначити її біологічну повноцінність, тобто забезпечувати запліднення й отримання здорового потомства. Проте, за загальноприйнятою характеристикою сперми (об'єм еякуляту, рухливість спермій, концентрація сперматозоїдів) не завжди можна пояснити причину її низької запліднювальної здатності. Проведено морфологічний аналіз еякуляту досліджуваних плідників на наявність патологічних форм сперматозоїдів та виявлено у різному співвідношенні наявність таких морфологічних аномалій сперматозоїдів як патологічна акросома, з дистальною цитоплазматичною краплею, вільна голівка та закручений джгутик (рис. 2) [4]. Так, у плідника породи п'єтрен, велика біла та РІС 337-гібрид патологічні спермії становили 2,2 %, 2,4 % та 1,4 %, відповідно, що не перевищує допустимих норм [2] (табл. 2).

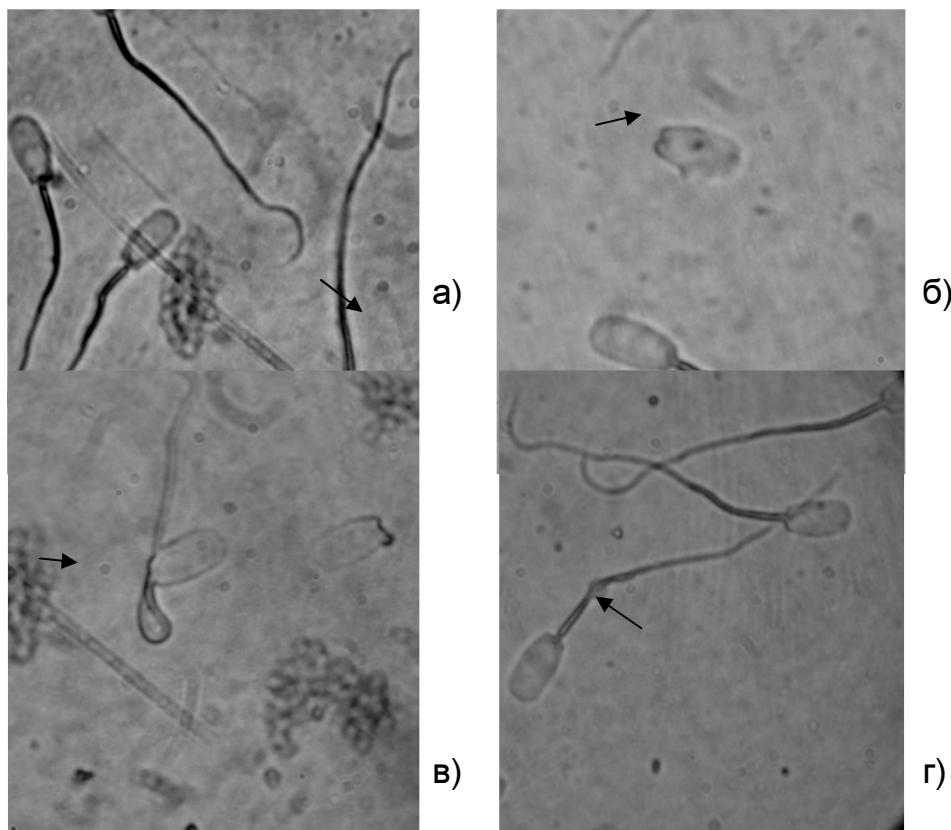


Рис. 2. Патологічні форми сперматозоїдів в еякулятах плідників:
 а) розбухла акросома; б) вільна голівка; в) закручений джгутик;
 г) дистальна цитоплазматична крапля, ок. 10х, об. 100х

Відомо, що в еякулятах тварин, крім сперматозоїдів, зустрічаються незрілі статеві клітини. Встановлено, що в особин із порушеннями сперматогенезу різко зростає кількість незрілих статевих клітин що призводить до зниження запліднювальної здатності плідника [7]. Аналіз результатів проведених досліджень свідчить про відсутність незрілих статевих клітин в еякуляті досліджуваних плідників.

2. Розподіл патологічних форм сперматозоїдів кнурів

Порода	Всього проаналізовано сперміїв, n	З дистальною цитоплазматичною краплею, n	Патологічна акросома, n	Вільна голівка, n	Закручений джгутик, n	Всього патологічних форм, %
П'єтрен	500	2	1	4	4	2,2
Велика біла	500	3	-	3	6	2,4
РІС 337 гібрид	500	1	1	-	5	1,4

Для більш повної характеристики репродуктивних властивостей плідника доцільно проводити цитогенетичний моніторинг каріотипу тварини (рис. 3). Результати цитогенетичного аналізу лімфоцитів периферійної крові у досліджених тварин показали наявність геномної та структурної мінливості каріотипу (табл. 3). Кількісні порушення хромосом проявилися у вигляді анеуплоїдії. Найнижчий показник цієї мінливості був характерний для кнура селекції РІС 337 гібрид і становив 2,3 %, а найвищий – у кнура породи велика біла, що зустрічався із частотою 4,0 %.

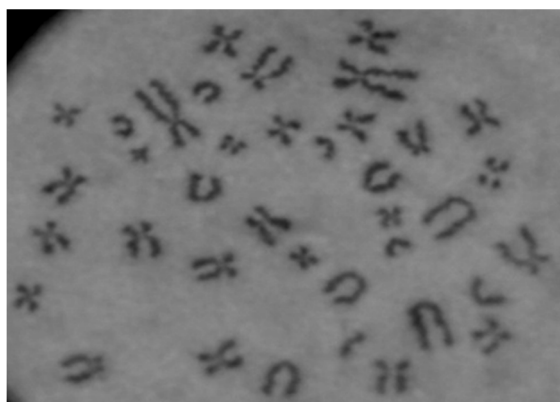


Рис. 3. Каріотип кнура породи велика біла ($2n=38$), ок.10х, об.100х

3. Оцінка хромосомного поліморфізму соматичних клітин кнурів

Порода	Вік, роки	Анеуплоїдія, %	АРЦРХ, %	Хромосомні розриви, %	Хроматидні розриви, %	МЯ, ‰	МІ, ‰
Петрен	1,5	3,3	2,7	2,05	0,9	3	6,3
Велика біла	1,5	4,0	2,3	1,6	1,0	2	1,9
РІС 337 гібрид	1,5	2,31	2,05	1,3	0,63	-	4,4

Частота анеуплоїдії становила 2,3–4,0 % і відповідала спонтанному рівню, характерному для виду *Sus scrofa* [6]. Передумовою виникнення числових порушень хромосом є асинхронне розщеплення їх центромірних районів. Згідно з отриманими результатами встановлено, що частота асинхронного розщеплення центромірних районів хромосом у досліджених

кнурів становила 2,05–2,7 %. Структурні порушення хромосом були представлені хромосомними та хроматидними розривами і коливалися у межах 1,3–2,05 % та 0,63–1,0 %, відповідно. Різниця середніх величин за кількісними порушеннями хромосом (анеуплоїдією), асинхронним розщепленням центромірних районів хромосом і структурними порушеннями (хромосомними та хроматидними розривами) між породами була не достовірною та не перевищувала спонтанного рівня, характерного для кнурів даних порід [11].

Для повнішої оцінки соматичного мутагенезу у досліджуваних кнурів використовували мікроядерний тест. У плідників частота лімфоцитів із мікроядрами (МЯ) становила 2–3 ‰, що не перевищувало параметрів цитогенетичних показників свині свійської за спонтанного мутагенезу. Двоядерні лімфоцити у крові досліджених кнурів були відсутні. Одержані результати підтвердили прояв низького рівня спонтанних мутацій та не виявили міжпородної відмінності.

Для встановлення асоційованого зв'язку між нестабільністю каріотипу та репродуктивними функціями кнурів провели кореляційний аналіз. Отримані результати показали від'ємні кореляційні зв'язки між анеуплоїдією, асинхронним розходженням центромірних районів хромосом, хроматидними розривами та запліднювальною здатністю (табл. 4).

4. Кореляційний зв'язок між нестабільністю каріотипу та репродуктивними функціями кнурів

Корелюючі ознаки	Хромосомні порушення			
	анеуплоїдія, %	АРЦРХ, %	розриви хромосом, %	хроматидні розриви, %
Об'єм еякуляту	0,5328	0,9974	-0,6657	0,6613
Концентрація сперматозоїдів	0,1654	0,9480	-0,3266	-0,1822
Відсоток патологічних форм	0,9726	0,6628	-0,9977***	0,9973
Запліднювальна здатність	-0,9080*	-0,0576	0,8260	-0,8294

*Примітка: -P>0,95;***-P>0,99.

Виявлений від'ємний вірогідний кореляційний зв'язок між анеуплоїдією та запліднювальною здатністю сперматозоїдів плідників (P>0,95). Також встановлений від'ємний кореляційний зв'язок між запліднювальною здатністю сперміїв та АРЦРХ і хроматидними розривами хромосом. Це означає, що з підвищенням частоти клітин із хроматидними розривами та АРЦРХ спостерігається тенденція до зниження запліднювальної здатності у тварин. Хромосомні розриви від'ємно корелюють із об'ємом еякуляту, концентрацією сперматозоїдів та з вірогідною достовірністю відсотка їх патологічних форм (P>0,999).

Висновки

Отже, аналіз одержаних результатів свідчить про недостовірність різниці середніх величин між кількісними та структурними порушеннями

хромосом у кнурів різних порід. Виявлено асоціативний зв'язок між нестабільністю каріотипу плідників та відсотком патологічних форм сперматозоїдів і запліднювальною здатністю кнурів.

Подальші дослідження будуть спрямовані на визначення впливу хромосомного поліформізму статевих клітин на запліднювальну здатність сперматозоїдів плідників *in vitro*.

Список літератури

1. Буркат В. П. Биотехнологические методы оценки и прогнозирования оплодотворяющей способности сперматозоидов быков / В. П. Буркат, В. Е. Кузнецов, И. Б. Елизарова // Вісник аграрної науки. – 1992. – № 11. – С. 22–26.
2. ГОСТ Р 54638-2011. 14. Сперма хряков свежеполученная разбавленная. Технические условия. – Издание офиц. – М., Стандартинформ, 2013. – С. 2.
3. Гусев Д. И. Оценка воспроизводительных качеств свиней в зависимости от уровня каріотипической изменчивости : автореф. дис. на соискание учен. степени канд. биол. наук : спец. 06.02.01 / Д. И. Гусев. – М., 2009. – 21 с.
4. Милованов В. К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных / В. К. Милованов. – М. : Изд-во сельскохозяйственной литературы, журналов и плакатов, 1962. – 695 с.
5. Меркурьева Е. К. Генетика с основами биометрии : учеб. / Е. К. Меркурьева, Г. Н. Шангин-Березовский. – М. : Колос, 1983. – 400 с.
6. Джус П. П. Видоспецифічність дестабілізації каріотипів сільськогосподарських тварин за радіаційного та інфекційного впливу : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.15 / П. П. Джус. – К., 2012. – 20 с.
7. Дзіцюк В. В. Хромосомний поліморфізм окремих видів і порід сільськогосподарських тварин : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра с.-г. наук : спец. 03.00.15 / В. В. Дзіцюк. – Чубинське, 2009. – 30 с.
8. Дзіцюк В. В. Використання цитогенетичних методів у селекції плідників / В. В. Дзіцюк. – К. : Аграрна наука, 2009. – 60 с.
9. Інструкція із штучного осіменіння свиней / відп. за вип. Ю. Ф. Мельник. – К. : Аграрна наука, 2003. – 56 с.
10. Ковтун С. І. Одержання зародків свиней *in vitro*: стан та перспективи використання / С. І. Ковтун // Вісник аграрної науки. – 2004. – № 5. – С. 52–54.
11. Шельов А. В. Методика приготування метафазних хромосом лімфоцитів периферійної крові тварин / А. В. Шельов, В. В. Дзіцюк // Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві. – К. : Аграрна наука, 2005. – С. 210–213.
12. Katska L. Instrukcja wdrozeniowa nr 2/93. Produkcja zarodkow bydlcych metodami *in vitro* / L. Katska, Z. Smorag, B. Rynska. – Krakow, 1993. – 18 s.
13. Tarkowski A. K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A. K. Tarkowski // Cytogenetics. – 1966. – Vol. 5, № 3. – P. 394–400.

*Исследована оплодотворяющая способность сперматозоидов хряков различных пород с помощью моделирования процесса взаимодействия гамет в условиях *in vitro*, а также цитогенетическая оценка хромосомного полиморфизма соматических клеток хряков.*

Ооцит, сперматозоид, оплодотворение, эмбрион, каріотип, хромосомные аберрації, свиньи.

The article presents data on research fertilizing ability of boar spermatozoa of different breeds based on modeling the process of gametes interaction in terms in vitro and cytogenetic evaluation of chromosomal polymorphism of somatic cell producers.

Oocytes, sperm, fertilization, embryo, karyotype, chromosome aberrations, pigs.