

«Сейфуллин оқулары – 18: « Жастар және ғылым – болашаққа көзқарас» халықаралық ғылыми -практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: « Молодежь и наука – взгляд в будущее» - 2022.- Т.II, Ч.I. – Б.163-167

БҰҚАЛАРДЫҢ ШӘУЕТІН КРИОКОНСЕРВАЦИЯЛАУ САЛАСЫНДАҒЫ ЖЕТІСТІКТЕР

*Құмархан Ұ., 4 курс студенті С.Сейфуллин атындағы Қазақ
агротехникалық университеті, Нұр-Сұлтан қ.*

Бүгінгі күні жануарлардың тұқымын мұздатудың бірнеше жолы бар. Осы әдістердің бірі – криоконсервация, яғни төмен градустан мұздатып сақтау. Бұл ғылыми ресурс жануарлардың биотехнологиясында маңызды, өйткені ұрықтың құнарлылық маркерлерін ашудағы жетістіктермен, жаһандық масштабта азық-түлік қауіпсіздігін қамтамасыз ету үшін азық-түлік жануарларын өндіру үшін криоконсервацияны жақсарту арқылы ерігеннен кейін ұрықтың өміршеңдігі мен құнарлылығын жақсартудың шұғыл қажеттілігі бар. Жануарлардың жыныс мүшелерінен оқшауланған сперматозоидты криоконсервациялау биологиялық әртүрлілікті қолдайтын криоколлекциялар үшін генетикалық материалдың маңызды көзі және олар күтпеген жерден қайтыс болған кезде құнды генетикалық материалды сақтаудың соңғы мүмкіндігі болып табылады. Жануарлардың биологиялық әртүрлілігін сақтау қазіргі биология ғылымының өзекті мәселелерінің бірі болып табылады. Өзірленген технология криоконсервациядан кейін сперматозоидтардың жоғары өмір сүруін және олардың функционалды пайдалылығын сенімді бағалауды қамтамасыз етеді және көбеюде жоғары құнды, сирек кездесетін және жойылып кету қаупі төнген жануарлар түрлерін тиімді пайдалану арқылы іріктеу қарқынын едәуір жылдамдатады. Криобанктің генетикалық материалын жасау аталық өндірушілерінің гендік қорларының бірегей коллекциясын шексіз уақыт сақтауға мүмкіндік береді. Осы проблемаларды шешу биоалуантүрлілікті сақтау және жануарлардың сирек кездесетін және жойылып бара жатқан түрлері геномының құрылымы мен эволюциясын анықтау үшін іргелі маңызға ие. Сондай-ақ, қашықтан будандастыру, гетероздың әсері, интрапопуляциялық генетикалық әртүрлілік және шығу тегі туралы мәселелерді шешу. Бұл тәсіл ауыл шаруашылығы бағытындағы іргелі зерттеулерге сәйкес келеді: жануарлардың жаңа селекциялық формаларын құрудың молекулалық-генетикалық негіздері. Сперматозоидты криоконсервациялау және жасанды ұрықтандыру ірі қара мал өндірісі мен өнім сапасына маңызды оң әсер етеді. Криоконсервіленген сперматозоидты қолдану және жасанды ұрықтандыру арқылы әлемдегі мыңдаған сиырларды ұрықтандыру үшін ең жақсы асыл тұқымды бұқалардың ұрықтарын қолдануға болады. Бұқа ұрығын криоконсервациялау басқа түрлерге

қарағанда алға жылжығанына қарамастан, білім мен технологиялар базаларында әлі де елеулі олқылықтар бар. Ерігеннен кейінгі ұрықтың өміршеңдігі әлі де төмен және асыл тұқымды бұқаларда айтарлықтай өзгереді. Бұл кемшіліктер маңызды, өйткені олар сүтқоректілердің гаметалары туралы іргелі ғылымда да, репродуктивті биотехнологияда да ілгерілеуге кедергі келтіреді. Әр түрлі кеңейткіштер жасалынған және химиялық заттармен толықтырылған, олар әр түрлі дәрежеде криопрессияны не- месе тотығу стрессін азайтады. Сперматозоидтардың морфологиясы мен қызметі туралы толығырақ ақпарат қазіргі заманғы молекулалық және жасушалық биологияның алдыңғы қатарлы құралдарын қолдану арқылы алынды [1].

Үнемі өсіп келе жатқан әлем халқы жағдайында жануарлардың тамақ өндірісінің тиімділігі мен тұрақтылығын арттырудың шұғыл қажеттілігі бар. Бұл мәселені шешу үшін бүкіл әлемде малдың, әсіресе ірі қара малдың құнарлылығын арттыру қажет. Репродуктивті технологиялардың механизмдері мен проблемаларын тереңірек түсіну мал шаруашылығының өміршеңдігін арттыру үшін өте маңызды. Осындай репродуктивті технологиялардың ішінде жасанды ұрықтандыру (ЖҰ) мал шаруашылығын дамыту үшін қолданылған маңызды технология болып табылады, бұл генетикалық прогресті және селекцияны жеделдетуге мүмкіндік береді, онда ұрықтың сәтті криоконсервация- сы ЖҰ тиімділігі мен сәттілігін арттырады. Сперматозоидты криоконсервациялау про- цедуралары әрдайым тиімді бола бермейді, өйткені сперматозоидтардың көп мөлшері физиологиялық зақымға ұшырайды, бұл мұздату мен ерігеннен кейін құнарлылықтың жоғалуына әкеледі. Кешенді әр түрлі әдістерді қолдана отырып, сперматозоидты жан- жақты талдау жасуша функциясымен байланысты молекулалық және жасушалық деңгейлердегі жасуша морфологиясын бағалау үшін қажет [2].

Жарық микроскопиясы. Шәует сапасының негізгі параметрлерін, соның ішінде сперматозоидтардың қозғалғыштығын, морфологиясын, мембрананың тұтастығын және концентрациясын бағалау үшін кеңінен қолданылатын құрал болды. Флуоресцентті микроскопия флуорохромдардың кең спектріне байланысты биология мен репродуктивті ғылымдарда маңызды құрал болды. Флуоресцентті таңбалауды қолдану субмикроскопиялық жасуша компоненттерін анықтауға мүмкіндік береді. Флуоресцентті микроскопия сперматозоидтардың өміршеңдігін, шәует мембраналарын, акросома мен хроматинді талдау үшін кеңінен қолданылды. Микроскопияның бұл әдісінде шәует функциясының жасушалық компоненттері ДНҚ, мембраналар немесе лектиндерді зерттеу үшін флуоресцентті зондтармен боялады. Сперматозоидтардың өміршеңдігін талдауды флуоресцентті микроскопия арқылы ДНҚ байланыстыратын флуоресцентті бояғыштар (SYBR-14) және мембраналық өткізгіш бояғыштар (PI) болып табылатын "тірі/өлі" коммерциялық жиынтықтарды қолдана отырып талдауға болады [3].

Электронды микроскопия (ЭМ) үлгіні алу үшін жеделдетілген электрондардың сәулесін пайдалану құралы ретінде электронды қолданады. Бұл әдіс жарық микроскопиясына қарағанда жоғары үлкейту мен ажыратымдылықты қамтамасыз етеді. Жарық микроскопиясында көрінетін жарық 10-1000 есе үлкейтетін оптикалық линзалармен үлгіні үлкейту үшін қолданылады. ЭМ вакуумда орындалады және электронды сәулені объектіге тікелей бағыттайды, ал суреттер электромагниттік линзалар арқылы үлкейтіледі. Бұл микроскопия әдісінің артықшылығы-үдеткіш кернеуде қысқа толқын ұзындығы бар электрондарды қолдану. ЭМ сперматозоидтың ультра құрылымы мен морфологиялық сипаттамалары туралы түсінігімізді едәуір кеңейтеді. Ең көп таралған екі электронды микроскоп-бұл электронды (ТЕМ) және сканерлейтін электронды (СЭМ). Бұл жетілдірілген микроскоптарда суретте электронды сәулені фокустау үшін электромагниттік линзалар қолданылады [4].

Ағынды цитометрия. Ағынды цитометрия (FC) - бұл қысқа уақыт ішінде мыңдаған жеке жасушаларды талдауға мүмкіндік беретін көрнекті жүйе. Ағынды цитометрия сперматозоидтардың көп мөлшерін, сондай-ақ флуоресцентті қосылыс арқылы өлшенетін бір сперматозоидтың физикалық сипаттамалары бар жеке жасушаларды талдауға мүмкіндік береді. Ол сұйық, оптикалық және электронды жүйелерден тұрады, олар лазер көзі арқылы өтетін сұйықтықтағы бөлшектердің флуоресценциясының физикалық оптикалық және химиялық сипаттамаларын өлшеуді қолданады. Қысқаша айтқанда, бұл әдіс сперматозоидтардың аз мөлшерін және суспензиядағы флуоресцентті маркерлермен белгіленген бөлшектердің үлгілерін қажет етеді, оларды құрылғыдағы ағындық жасушаға енгізуге болады. Кейіннен флуоресценция сіңіп, бөлшектердің сәулеленуінен флуоресценция толқын ұзындығын флуоресцентті жолақтарды өлшеуді тудыратын екі оптикалық линза анықтайды. Деректерді жинау кезінде сперматозоидтардың сипаттамаларын ескере отырып, спермаға жатпайтын шашырау ескеріледі және флуоресценция флуоресценцияның жалпы қарқындылығынан алынады. Ағынды цитометрия жүйелерінің екі түрі бар, олардың біреуі сұрыптау қабілетіне ие (флуоресцентті активтендірілген ағынды цитометрия-FACS) жасушаларды физикалық түрде бөлуге және тазартуға мүмкіндік береді. Екіншісі-флуоресцентті сәулеленуді жоғары қайталанғыштықпен, дәлдікпен және сезімталдықпен өлшейтін сұрыптаусыз. Ол субпопуляциялар туралы жоғары өткізу қабілеті бар деректерді шығарады, сонымен қатар шауәтсіз гетерогенді популяциялардың өлшемдерін тіркейді. Бірнеше сперматозоидты органеллалардың құрылымын бір уақытта цитометрия арқылы бағалауға болады. Жасушалардың өміршеңдігін талдау мембраналардың молекулалық анатомиясы мен физиологиясымен байланысты өміршең және өміршең емес сперматозоидтарды анықтауға көмектеседі. Нақтырақ айтсақ, криоконсервация процесінде температураның

өзгеруі және осмотикалық стресс плазмалық мембрананың зақымдалуына байланысты сперматозоидтардың өміршеңдігін төмендетеді. Бұл әдіс гомодимер этидия (EH), пропи- дия йодиді (PI), уо-Pro-1 бояғыштары және Hoechst 33258 бизбензимидазол сияқты зонд- тарды лазерлерді қоздыру үшін бөлек немесе басқа бояғыштармен бірге қолданады [5].

Тотығу стрессін талдау. Тотығу стресс ұрыққа зиянды әсер етеді, ұрықтандыру қабілетін нашарлатады. Бұл гидроксил радикалы (OH), супероксидті анион (O₂) және радикалды емес сутегі асқын тотығы (H₂O₂) сияқты радикалдардан тұратын АФК түзілуіне байланысты. Криоконсервация және еріту кезінде сперматозоидтар суық соққыға ұшырайды, содан кейін АФК-ның артық мөлшері мен липидтердің асқын тотығуына әкеледі. АФК және тотығу формаларын басқа тәсілдермен салыстырғанда ағынды цито- метрия арқылы дәлірек және репродуктивтілікпен анықтауға болады. 2,7' - дихлордиги- дрофлуоресцеин диацетаты (H₂DCFDA) әдетте жасушааралық H₂O₂ өлшеу үшін АФК индикаторы ретінде пайдаланылады. Неф-флуоресцентті H₂DCFDA жасуша мембранасына еніп, жасушаішілік эстеразалармен бөлінгеннен кейін жасушааралық кеңістікте тұрақты болады. Тотығу кезінде ол ~517-527 нм жасыл флуоресценцияны флуоресцентті 2',7'-дихлорфлуоресцеин (DCF) формасына айналдыру арқылы шығарады. Дигидроэ- тидий (гидроэтидин) - супероксидтің түзілуін анықтау үшін қолдануға болатын белгілі бір АФС зонд-индикаторы. Азайтылған форма супероксидпен тотығады және ДНҚ-да интеркалирленгеннен кейін 610 нм қызыл флуоресценцияны шығарады. Бұл зонд тірі жасушаларда АФК түзілуін жақсы анықтау үшін өміршеңдік маркерлерімен біріктірілуі мүмкін және ұрықтағы жасушаішілік АФК-ны зерттеу үшін қолданылуы мүмкін. 5-хлор- метил-20, 70-дихлоргидрофлуоресцеин диацетаты (CM-H₂DCFDA), тотығу стресс зонд, H₂DCFDA-ға қарағанда жақсы ұстауды көрсетеді және зақымдалмаған жасушалардағы сутегі асқын тотығын өлшейді.

Шәует хроматинінің құрылымы сперматозоидтардың жұмыртқаны ұрықтандыру қабілетін көрсетеді және шәует сапасының көрсеткіші болып табылады. Шәует хроматинінің құрылымын талдау (SCSA) ДНҚ денатурациясын талдауға негізделген, со- дан кейін шәует үлгілері акридин оранж (АО) араласады, нәтижесінде жасыл флуорес- ценциядан қызыл флуоресценцияға метахроматикалық ауысу пайда болады. Бұл талдауда АО екі тізбекті ДНҚ-мен (dsDNA) араласқанда, ол жасыл түс береді, бірақ бір тізбекті ДНҚ- мен (ssDNA) араласқанда қызыл болады. Толқын ұзындығы 488 нм лазермен әр сперма- тозоид үшін жасыл және қызыл флуоресценция қоспасынан ағынды цитометрия әдісімен қатынасын анықтау ДНҚ фрагментациясының күйін (ДНҚ фрагментация индексі) және хроматин құрылымын көрсетеді. Сонымен қатар, Dutp Nick-End-Labeling (TUNEL) тер- миналды трансферазасын сперматозоидтардың ДНҚ фрагментациясын

ағынды цито- метрия әдісімен бағалау үшін де қолдануға болады. Бұл талдау ферментті, терминалды дезоксинуклеотидилтрансферазды, дезоксиуридин трифосфат нуклеотидтері ДНҚ-ның 3'гидроксил ұштарындағы үзілістеріне енетін диетаны катализдеуді талап етеді. Ағынды цитометриямен бірге TUNEL және SCSA үйлесімділікке ие және сперматозоидтардың бөлінуіне байланысты нақты ақпарат береді [6].

Бұл ғылыми ізденіс «Мал шаруашылығы өнімдерін өндіру және өңдеу технологи- ясы» кафедрасының аға оқытушысы, а.ш.ғ.к. Омарова Қарлығаш Мирамбековнаның жетекшілігімен орындалды.

Пайдаланылған әдебиеттер тізімі

1. C M O Medeiros. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? / C M O Medeiros. F Forell, A T D Oliveira, J L Rodrigues. [electronic resource] Theriogenology. 2002 Jan 1;57(1):327-44. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00674-4.
2. PH Phillips et al. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. [electronic resource] Journal of Dairy Science. Volume 23, Issue 5, May 1940, Pages 399-404 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(40\)95541-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(40)95541-2)
3. J L Bailey. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. / J L Bailey , J F Bilodeau, N Cormier. // [electronic resource] J Androl. Jan-Feb 2000;21(1):1-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10670514/>
4. J K Sherman. Low temperature research on spermatozoa and eggs. [electronic resource] Cryobiology. Nov-Dec 1964;1(2):103-29. doi: 10.1016/0011-2240(64)90002-1.
5. R Perez-Pe et al. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. [electronic resource] Theriogenology. Volume 56, Issue 3, August 2001, Pages 425-434. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00574-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00574-X)
6. LJ Pérez et al. Evidence that frozen-thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. Theriogenology. [electronic resource] Volume 46, Issue 1, July 1996, Pages 131-140 [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00148-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00148-3)