

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ СВИНОК РІЗНИХ ПОРІД

Т. В. Галицька, С. І. Ковтун, П. А. Троцький

Інститут розведення і генетики тварин НААН, с. Чубинське

*Наведено результати експериментальних досліджень із оцінки життєздатності деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи велика біла та ландрас з використанням сучасних біотехнологічних методів. Проведено порівняльний аналіз запліднювальної здатності деконсервованих гамет свинок обох порід та морфологічна і цитогенетична оцінка отриманих *in vitro* ембріонів свиней. Встановлено, що запліднення деконсервованих яйцеклітин свинок породи велика біла нативною спермою кнурів породи ландрас призводить до зменшення на 12,3 % кількості отриманих зародків порівняно із заплідненням гамет свинок породи ландрас. Визначено динаміку формування *in vitro* ембріонів свиней порід велика біла та ландрас, які отримані з деконсервованих яйцеклітин після запліднення спермою кнурів породи ландрас.*

Ключові слова: БІОТЕХНОЛОГІЯ, КРІОКОНСЕРВУВАННЯ, ООЦИТ-КУМУЛЮСНІ КОМПЛЕКСИ, ВІТРИФІКАЦІЙНИЙ РОЗЧИН, КРІОПРОТЕКТОРИ, ДОЗРІВАННЯ *IN VITRO*, ЕМБРІОНИ

На сучасному етапі винятково гостро стоїть питання створення банків гамет і ембріонів, які могли б ефективно використовуватись для одержання потомства. Актуальним питанням у галузі свинарства є проблема збереження репродуктивних клітин. Вирішення цієї проблеми забезпечить більш інтенсивне використання тварин із бажаним генотипом та одержувати від них більше потомства з визначеним комплексом генів. Розробка методу кріоконсервування, зберігання та використання деконсервованих гамет сільськогосподарських тварин, особливо свиней, значно розширює можливості збереження та відтворення тварин, підвищення рівня їх відтворення. Аналіз світового досвіду з цієї проблеми засвідчує, що застосування низьких температур забезпечило необмежено в часі зберігання та транспортування біооб'єктів та використання їх як джерело біологічного матеріалу у галузі репродуктивної біотехнології [1, 2, 3]. Однією з найважливіших ланок технології збереження та раціонального використання репродуктивних клітин є розробка методики запліднення деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок. Вітчизняними та зарубіжними вченими розроблено основні методичні прийоми одержання ембріонів: отримання ооцитів свинок, їх дозрівання поза організмом, запліднення *in vitro* яйцеклітин, культивування зигот і ембріонів. Проте наразі ще немає повної розробки біотехнологічних прийомів відтворення свиней із використанням деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин, тому подальше удосконалення їх є актуальним завданням [4–6].

Метою досліджень було провести порівняльний аналіз кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас і велика біла на життєздатність деконсервованих гамет і подальший розвиток ембріонів *in vitro*.

Матеріали і методи

Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулюсні комплекси свинок порід велика біла і ландрас (СВАТ «Агрокомбінат «Калита»). Для заморожування використовували ооцити свинок із гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом. Перед заморожуванням гамети обробляли 10 хв еквілібраційним розчином (10 % гліцерин + 20 % пропандіол) потім

переносили у вітрифікаційний розчин (25 % гліцерин + 25 % пропандіол). Група К, в якій ооцит-кумулюсні комплекси свинок не заморожували, була контрольною. Після розморожування гамет свинок виведення кріопротекторів проводили шляхом перенесення їх на 10 хв у розчин 1,0 М сахарози. Ооцит-кумулюсні комплекси свинок культивували в чотирьохлункових планшетах протягом 44 год при температурі +38,5 °С, 5 % CO₂ у повітрі, в краплях середовища 199 з 20 % попередньо інактивованою еструсною сироваткою крові корів, 40 мкг/мл гентаміцину. Деконсервовані гамети свинок після культивування поза організмом підлягали заплідненню *in vitro*. Для запліднення *in vitro* яйцеклітин свинок використовували нативну сперму плідників (Лал №3246, Лал №1021, СВАТ «Агрокомбінат «Калита»). Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J. J. et al. [7]. Після 12–18 год спільного інкубування яйцеклітини і зиготи відмивали від залишків сперматозоїдів і переносили в краплі середовища CDM для подальшого культивування. Цитогенетичні препарати гамет свинок після запліднення *in vitro* та зародків свиней готували за методом Ushijima M. et al. [8], забарвлювали 2,0 % розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

Результати й обговорення

Проведено порівняльний аналіз кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів свинок різних порід та запліднення деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин спермою кнурів. У таблиці наведено результати розвитку отриманих *in vitro* ембріонів свиней порід велика біла (ВБ) і ландрас (Л) з деконсервованих і дозрілих яйцеклітин свинок, за умови запліднення нативною спермою кнурів породи ландрас.

Таблиця

Результати запліднення деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок різних порід спермою кнурів породи ландрас

Варіанти досліджу		Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадіях					
			2 клітин		3–4 клітин		5–8 клітин	
			n	%	n	%	n	%
ВБ	Двб	158	17	10,8 ^a ± 2,5	13	8,2 ± 2,2	7	4,4 ± 1,6
	Квб	67	32	47,8 ^b ± 6,1	24	35,8 ± 5,9	14	20,9 ± 5,0
Л	Дл	108	25	23,1 ^c ± 4,1	14	12,9 ± 3,2	9	8,3 ± 2,7
	Кл	48	21	43,8 ^{bd} ± 7,2	18	37,5 ± 7,0	11	22,9 ± 6,1

Примітка: у цій таблиці різні суперскріпти вказують на вірогідну різницю між показниками, c : d — P < 0,05; a : c — P < 0,01; a : b, a : d, b : c — P < 0,001, критерій Ст'юдента

За результатами експериментальних досліджень встановлено взаємозв'язок між кріоконсервуванням ооцит-кумулюсних комплексів свинок різних порід на життєздатність деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин. Доведено, що породні особливості по різному впливають на рівень формування ембріонів *in vitro* деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин. Встановлено, що запліднення *in vitro* деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок породи ландрас (гр. Дл) спермою кнурів породи ландрас і подальше 72-годинне культивування призводить до збільшення на 12,3 % кількості отриманих зародків, порівняно з яйцеклітинами свинок породи велика біла (гр. Двб). У контрольній групі (без заморожування) показники *in vitro* отримання ембріонів свиней порід велика біла (гр. Квб) та ландрас (гр. Кл) становили відповідно 47,8 і 43,8 %.

При дослідженні динаміки дроблення ембріонів свиней великої білої породи (рис. 1) встановлено, що через 24 год культивування коефіцієнт дроблення ембріонів був найвищий як у дослідній, так і в контрольній групі показники були майже на одному рівні. Подальше

культивування ембріонів до 48 год призводить до зменшення коефіцієнта дроблення в дослідній і контрольній групах. На третю добу культивування ембріонів отриманих з деконсервованих, дозрілих та запліднених поза організмом яйцеклітин свинок коефіцієнт дроблення зменшився більш як в два рази і становив 18,9 та 20,0 % відповідно в дослідній і контрольній групах.

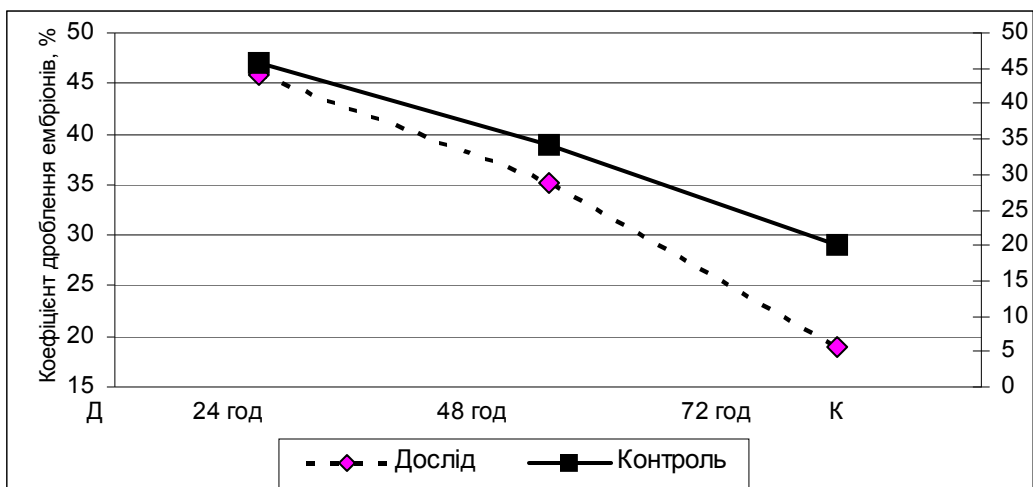


Рис. 1. Динаміка дроблення ембріонів свиной великої білої породи

Аналізуючи зміни динаміки дроблення ембріонів свиной породи ландрас (рис. 2), встановлено значні коливання коефіцієнта дроблення.

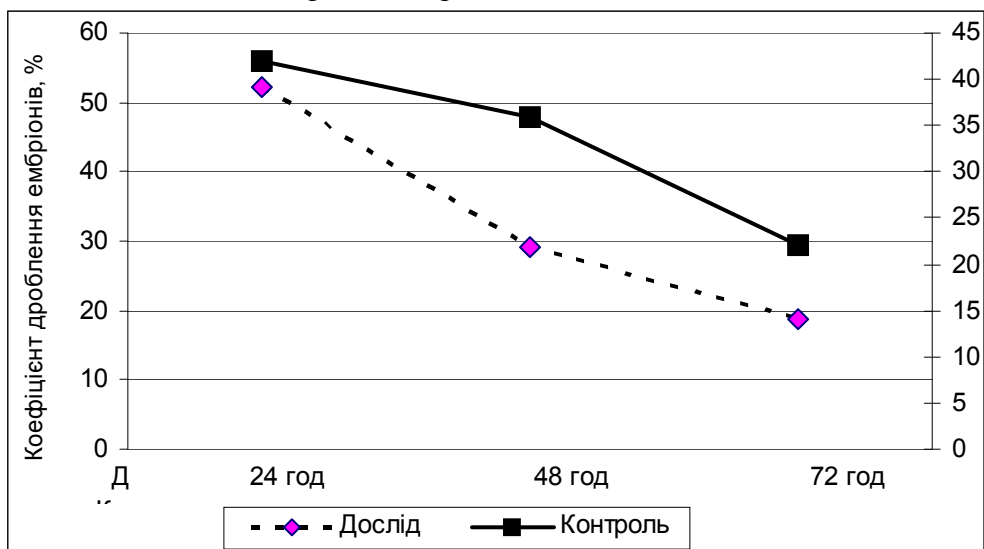


Рис. 2. Динаміка дроблення ембріонів свиной породи ландрас

На першу добу культивування ембріонів отриманих з деконсервованих, дозрілих і запліднених поза організмом яйцеклітин свинок спостерігали збільшення коефіцієнта дроблення у дослідній групі на 10,1 % порівняно з контрольною групою. Зменшення коефіцієнта дроблення ембріонів у дослідній групі на 9,8 %, порівняно з контрольною групою, спостерігали через 48 год культивування ембріонів. При збільшенні терміну культивування ембріонів до 72 год спостерігали зменшення коефіцієнта дроблення в дослідній і контрольній групах відповідно до 18,8 та 22,0 %.

Таким чином, результати наших експериментальних досліджень дозволяють констатувати той факт, що порівняльний аналіз кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів свинок порід велика біла і ландрас виявив різну їх ефективність. За результатами

експериментальних досліджень доведено наявність взаємозв'язку між кріорезистентними властивостями ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас та велика біла за таких показників як кількість отриманих зародків та динаміка дроблення ембріонів. Встановлено, що використання для кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас призводить до збільшення кількості життєздатних гамет порівняно із гаметами свинок породи велика біла.

Висновки

Життєздатність деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок порід велика біла і ландрас залежить від породних особливостей кріорезистентності гамет. Встановлено, що кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас і подальше 72-годинне культивування, після запліднення *in vitro* деконсервованих і дозрілих яйцеклітин призводить до збільшення на 12,3 % кількості отриманих зародків порівняно з яйцеклітинами свинок породи велика біла.

Перспективи подальших досліджень. Розробляючи методи отримання ембріонів тварин, слід відмітити, що проблема запліднення деконсервованих і дозрілих поза організмом деконсервованих яйцеклітин недостатньо вивчене і потребує значної уваги. Забезпечення необхідної кількості ембріонів потребує удосконалення способів запліднення на основі глибокого розуміння всіх процесів, які відбуваються в гаметах на кожному етапі їх культивування. Разом з тим, отримані результати потребують більш глибокого вивчення процесів, враховуючи функціональний стан яєчників, при отриманні ембріонів з деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок.

T. B. Galicka, S. I. Kovtun, P. A. Trotskiy

COMPARATIVE ANALYSIS OF CRYOPRESERVATION OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES PIGGY-WIGGIES OF DIFFERENT BREEDS

S u m m a r y

The results of experimental researches are demonstrated from the estimation of viability frozen-thawed oocyte-cumulus complexes piggy-wiggies of breed large white and landrace with the use of modern biotechnological methods. The comparative analysis of impregnating ability frozen-thawed gametes piggy-wiggies of both breeds and morphological and cytogenetic estimation of got in vitro embryos pigs is conducted. It is set that fertilization frozen-thawed ovules of piggy-wiggies of breed large white native sperm of hogs of breed landrace results in diminishing on 12,3 % the amounts of the got embryos are compared to the fertilization of gamete piggy-wiggies of breed landrace. Certainly dynamics of forming in vitro embryos pigs breeds large white and landrace, which are got from frozen-thawed ovules after the impregnation hogs of breed landrace sperm.

T. B. Галицкая, С. И. Ковтун, П. А. Троцкий

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ СВИНОК РАЗНЫХ ПОРОД

А н н о т а ц и я

Приведены результаты экспериментальных исследований по оценке жизнеспособности деконсервированных ооцит-кумулюсных комплексов свинок пород большая белая и ландрас с использованием современных биотехнологических методов. Проведен сравнительный анализ оплодотворяющей способности деконсервированных гамет свинок обеих пород, морфологическая и цитогенетическая оценка полученных *in vitro* эмбрионов свиней. Установлено, что оплодотворение деконсервированных яйцеклеток свинок породы большая белая нативной спермой хряка породы ландрас приводит к уменьшению на 12,3 % количества полученных зародышей по сравнению с оплодотворением гамет свинок породы ландрас. Определенно динамику формирования эмбрионов свиней пород большая белая и ландрас, которые получены из деконсервированных яйцеклеток после оплодотворения спермой хряка породы ландрас.

1. Seidel G. E. Jr. Modifyng oocytes and embryos to improve their cryopreservation / G. E. Seidel // *Theriogenology*. — 2006. — Vol. 65, I. 1. — P. 228–235.
2. Diez C. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability / C. Diez, P. Dugue, E. Gomez et al. // *Theriogenology*. — 2005. — Vol. 64, I. 2. — P. 317–333.
3. Rexroad C. E. Regulation of animal biotechnology: Research needs / C. E. Rexroad, R. D. Green, R. J. Wall // *Theriogenology*. — 2007. — Vol. 68, Suppl. 1. — P. S3–S8.
4. Ковтун С. І. Вплив часу сумісної інкубації гамет на ембріональний розвиток свиней *in vitro* / С. І. Ковтун, Ю. В. Куновський // *Наук.-техн. бюл.* — Харків, 2008. — № 96. — С. 195–198.
5. Gilchrist R. B. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro* / R. B. Gilchrist, J. G. Thompson // *Theriogenology*. — 2007. — Vol. 67, I. 1. — P. 6–15.
6. Щербак О. В. Використання репродуктивного потенціалу свинок в технології формування ембріонів *in vitro* / О. В. Щербак, А. Б. Зюзюн // *Розведення і генетика тварин*. — К.: Аграрна наука, 2011. — Вип. 45 — С. 325–330.
7. Parrish J. J. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid / J. J. Parrish, J. L. Susko-Parrish, R. R. Handron et al. // *Biol.Reprod.* — 1989. — V. 40. — P. 1020–1025.
8. Ushijima M. Relationship between the cell number and Quality of Day-8 bovine blastocysts / M. Ushijima, M. Okuda, T. Nakajama et al. // *Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans.* — 1988. — № 9. — P. 37–38.

Рецензент: кандидат сільськогосподарських наук, завідувач лабораторії біотехнології Щербак О. В., Інститут розведення і генетики тварин НААН.