

## ОЦІНКА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ДЕКОНСЕРВОВАНИХ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ СВИНОК РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП

**Т. В. Галицька\***,  
**П. А. Троцький**

*Інститут розведення і генетики тварин НААН, с. Чубинське, Україна*  
Науковий керівник – д.с.-г.н., член-кореспондент НААН С. І. Ковтун

Наведено результати експериментальних досліджень із оцінки кріорезистентності ооцит-кумулюсних комплексів свинок різних вікових груп на життєздатність деконсервованих гамет і подальший розвиток ембріонів *in vitro*. Встановлено, що використання сучасних біотехнологічних методів дозволяє отримувати необхідну кількість незрілих ооцитів від свинок та свиноматок з високим генетичним потенціалом для більш широкого застосування репродуктивного потенціалу тварин. Визначено динаміку та індекс подальшого дроблення *in vitro* ембріонів свиней різних вікових груп, які отримані з деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок та свиноматок.

**Ключеві слова:** кріоконсервування, ооцит-кумулюсні комплекси, вітрифікаційний розчин, кріопротектори, дозрівання *in vitro*, ембріони.

На сучасному етапі з метою збереження генофонду зникаючих порід в багатьох країнах створенні заповідники, заказники, генофондні ферми. Важливість збереження генофонду локальних порід очевидна з ряду причин, зокрема тому, що в породоутворному процесі необхідне використання принципово нових генів та генних комплексів, які підвищують ефективність селекції і використовуються при створенні нових порід і удосконаленні існуючих. Такі заходи будуть сприяти ефективному використанню генетичного потенціалу тварин в практичній роботі селекціонерів. Для успішного вирішення стратегії збереження генетичних ресурсів була розроблена «Програма збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року» [1, 2].

Крім цього перспективним вважається створення кріобанку замороженої сперми, яйцеклітин та ембріони від високоцінних тварин зникаючих порід. Довготривале зберігання життєздатних статевих клітин в даний час можливе тільки при низьких температурах. Однак при заморожуванні біологічних об'єктів необхідно враховувати деякі чинники, наприклад, стан гамет перед кріоконсервуванням, насичення і виведення кріопротекторів, швидкість заморожування-розморожування, культивування деконсервованих гамет та інші фактори. Наразі розроблені методи кріоконсервування гамет тварин, однак вони недостатньо ефективні і постійно удосконалюються [3, 4, 5]. При цьому розробка технології низькотемпературного консервування неможлива без розуміння того, що різні біологічні об'єкти вимагають індивідуального підходу. В зв'язку з цим важливим є порівняльне вивчення життєздатності деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів свинок різних вікових груп.

Метою досліджень було провести оцінку кріорезистентності ооцит-кумулюсних комплексів свинок різних вікових груп на життєздатність декон-

сервованих гамет і подальший розвиток ембріонів *in vitro*.

**Матеріали і методи.** Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулюсні комплекси свинок різних вікових груп. Для заморожування використовували ооцити свинок із гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом. Перед заморожуванням гамет 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. Потім клітини тричі відмивали середовищем М-199, оцінювали за морфологічними ознаками і переносили в середовище для культивування. Ооцит-кумулюсні комплекси свинок культивували в чотирьохлункових планшетах протягом 44 год. при температурі +38,5°C, 5 % CO<sub>2</sub> у повітрі, в краплях середовища 199 з 20 % попередньо інактивованою еструсною сироваткою корів, 2,0 мМ натрію пірувату, 2,92 мМ кальцію лактату, 40 мкг/мл гентаміцину. Деконсервовані гамет свинок після культивування поза організмом підлягали заплідненню *in vitro*. Для запліднення *in vitro* яйцеклітин свинок використовували нативну сперму кнурів (Ла1 №3246, Роял-Турк №143). Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J.J. et al. [6]. Після 12-18 год. спільного інкубування яйцеклітини і зиготи відмивали від прилиплої сперми 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. [7], забарвлювали 2,0%-м розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

**Результати та обговорення.** Проведено

порівняльний аналіз кріорезистентних властивостей ооцит-кумулясних комплексів свинок різних вікових груп запліднення деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин нативною спермою кнурів (табл. 1). В дослідженнях використано ооцити від свинок віком до 10 місяців (група М) та свиноматок старше 2 років (група С). Для

оцінки розвитку ембріонів, отриманих з деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів свинок (група М) та свиноматок (група С) кожен варіант розподіляли на дві групи: дослідна (Д) – в якій ооцит-кумулясні комплекси підлягали кріоконсервуванню надшвидким методом і контрольна (К) – гамети не заморожували.

1. Вплив вікових особливостей на життєздатність і подальший розвиток деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок

Варіанти дослідів	Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадіях								
		2 клітин		3-4 клітин		5-8 клітин		9-16 клітин		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
М	Д	194	43	22,2 <sup>a</sup> ± 2,9	31	16,0 <sup>a</sup> ± 2,6	21	10,8 <sup>e</sup> ± 2,2	9	4,6 <sup>g</sup> ± 1,5
	К	63	34	53,9 <sup>b</sup> ± 6,3	27	42,9 <sup>b</sup> ± 6,2	19	30,2 <sup>f</sup> ± 5,8	10	15,9 <sup>h</sup> ± 4,6
С	Д	181	44	24,3 <sup>ac</sup> ± 3,2	32	17,7 <sup>ac</sup> ± 2,8	21	11,6 <sup>e</sup> ± 2,4	10	5,5 <sup>g</sup> ± 1,7
	К	76	34	44,7 <sup>bd</sup> ± 5,7	29	38,2 <sup>bd</sup> ± 5,6	21	27,6 <sup>f</sup> ± 5,1	11	14,5 <sup>h</sup> ± 4,0

g : h – P < 0,05; c : d, e : f – P < 0,01; a : b – P < 0,001, критерій Стьюдента.

За результатами експериментальних досліджень не встановлено взаємозв'язок між кріорезистентними властивостями ооцит-кумулясних комплексів свинок до 10 місяців (група Мд) та свиноматок старше 2 років (група Сд) на життєздатність деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин та розвиток *in vitro* отриманих ембріонів. На основі отриманих даних запліднення *in vitro* яйцеклітин свинок (група Мд) і свиноматок (група Сд) та подальше 24-годинне культивування не встановлено вірогідної різниці щодо кількості отриманих зародків. В контрольній групі (К) показники *in vitro* отримання ембріонів свинок (група Мк) та свиноматок (група Ск) також статистично не відрізнялися і становили відповідно 53,9 і 44,7 %. На протязі терміну культивування ембріонів до 96 год. також не встановлено різниці

між кількістю ембріонів отриманих із деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок та свиноматок як у дослідних так і контрольних групах.

При дослідженні динаміки дроблення 2-клітинних ембріонів свиней (рис. 1) встановлено, що коефіцієнт дроблення (кількість ембріонів на відповідній стадії розвитку від загальної кількості ембріонів) ембріонів був більший у дослідних групах порівняно з контрольними групами. Через 48 годин культивування було відмічено зменшення коефіцієнта дроблення в ембріонів отриманих із деконсервованих і дозрілих яйцеклітин свиноматок (група Ск). Подальше культивування ембріонів до 72 год. призводить до зменшення коефіцієнта дроблення ембріонів свинок (групи Мд, Мк) та свиноматок (група Сд).

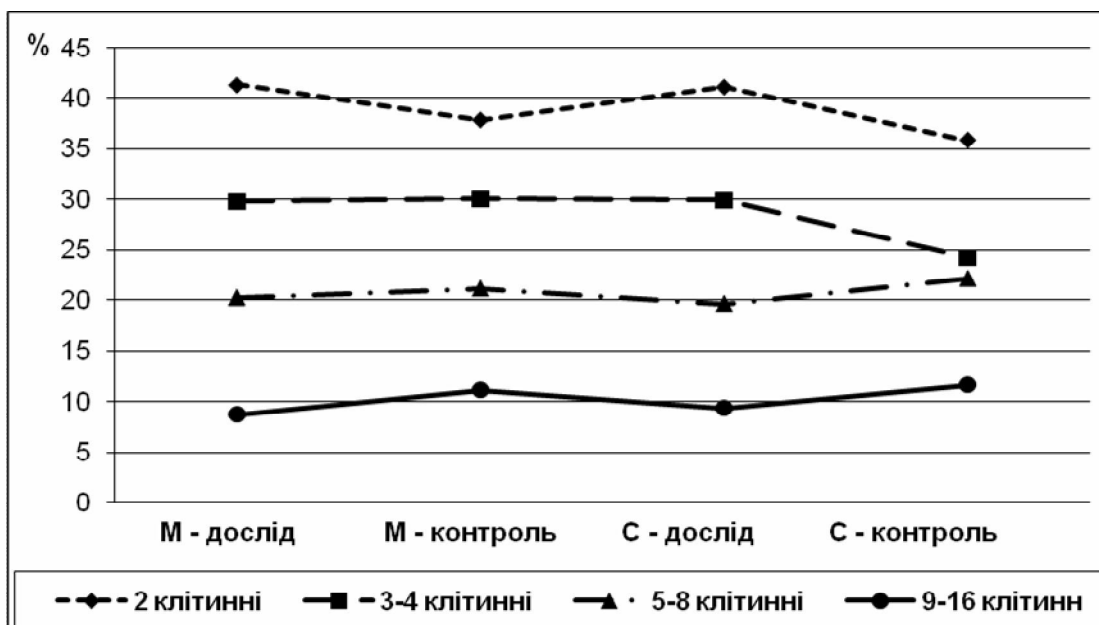


Рис. 1. Динаміка дроблення ембріонів свиней отриманих *in vitro* з деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок та свиноматок

На четверту добу культивування ембріонів, отриманих з деконсервованих, дозрілих та запліднених поза організмом яйцеклітин свинок та

свиноматок також спостерігалась тенденція зменшення коефіцієнта дроблення.

Індекс дроблення ембріонів (співвідношення кількості ембріонів певної стадії до наступної стадії їх розвитку) має не меншу інформативність, а ніж коефіцієнт динаміки дроблення зародків після запліднення *in vitro*. Аналізуючи подальше дроблення ембріонів свиней різних вікових груп (рис.

2) не встановлено значних відмінностей індексу дроблення між дослідними групами як 3-4, 5-8 так і 9-16-клітинних ембріонів. Крім того аналогічну тенденцію спостерігали між контрольними групами.

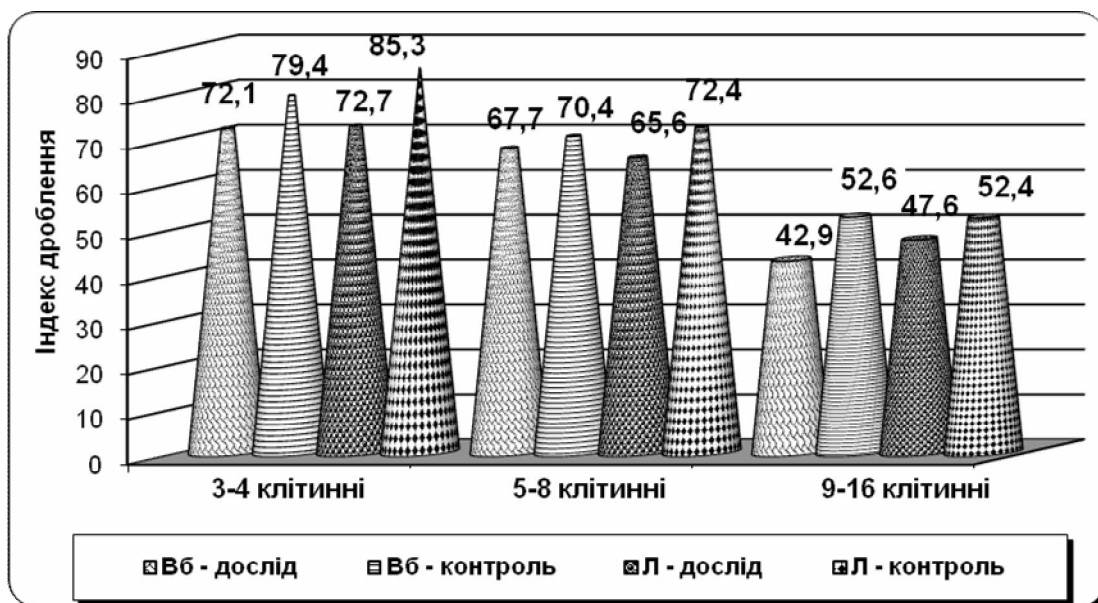


Рис. 2. Індекс дроблення ембріонів свиней отриманих *in vitro* з деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок та свиноматок

Таким чином, проведений порівняльний аналіз кріорезистентних властивостей ооцит-кумулюсних комплексів свинок різних вікових груп виявив, що збільшення віку тварин не призводить до збільшення після заморожування-розморожування і культивування кількості життєздатних гамет свиноматок та рівня формування ембріонів отриманих *in vitro*. Виходячи із одержаних нами експериментальних даних необхідно констатувати той факт, що використання сучасних біотехнологічних методів дозволяє отримувати необхідну кількість біологічного матеріалу від тварин з високим генетичним потенціалом і більш

кваліфіковано вирішувати проблеми, які пов'язані з одержанням ембріонів *in vitro* з деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин.

**Висновки.** Кріорезистентність ооцит-кумулюсних комплексів свинок незалежить від вікових особливостей гамет зберігати здатність до подальшого розвитку після деконсервування. Для збереження та раціонального використання генофонду свиней на основі методології функціонування кріобанку можна використовувати ооцит-кумулюсні комплекси свинок та свиноматок кріоконсервованими надшвидким методом.

#### Список використаної літератури:

1. Програма збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року / заг. наук. ред. І.В. Гузева, консультація та специфікація Ю.В. Мельника. – К.: Арістей, 2009. – 132 с.
2. Науково-технічна програма «Збереження генофонду сільськогосподарських тварин» / В. П. Буркат, М. Я. Єфіменко, Б. Є. Подоба та ін. // Тваринництво України. – 2007. – № 2. – С. 6-9.
3. Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos // Theriogenology. - 2014. - Vol.81, I.1. - P.96-102.
4. Seidel G.E., Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation // Theriogenology. - 2006. - Vol.65, I.1. - P.228-235.
5. Rexroad C.E. Jr., Green R.D., Wall R.J. Regulation of animal biotechnology: Research needs // Theriogenology. - 2007. - Vol.68. - Suppl.1. - P.S3-S8.
6. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid / Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Handron R.R. et al. // Biol.Reprod. - 1989. - V.40. - P. 1020-1025.
7. Relationship between the cell number and Quality of Day-8 bovine blastocysts / Ushijima M., Okuda M., Nakajama T. et al. // Proc. 3rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans. - 1988. - №9. - P. 37-38.

**Галицкая Т.В., Троцкий П.А. ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫХ ООЦИТОВ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ СВИНОК РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП**

Приведены результаты экспериментальных исследований по оценке криорезистентности ооцит-кумулясных комплексов свинок разных возрастных групп на жизнеспособность деконсервированных гамет и последующее развитие эмбрионов *in vitro*. Установлено, что использование современных биотехнологических методов позволяет получать необходимое количество незрелых ооцитов от свинок и свиноматок с высоким генетическим потенциалом для более широкого применения репродуктивного потенциала животных. Изучено динамику и индекс последующего дробления *in vitro* эмбрионов свиной разных возрастных групп, которые получены из деконсервированных и созревших вне организма яйцеклеток свинок и свиноматок.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, ооцит-кумулясные комплексы, витрификационный раствор, криопротекторы, созревание *in vitro*, эмбрионы.

**Galician T.V., Trotsky P.A. EVALUATION VIABILITY DEKONSERVOVANYH OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES PIGS DIFFERENT AGE GROUPS**

The results of experimental researches are resulted from the estimation cryoresistive oocyte-cumulus complexes piggy-wiggies of different age-dependent groups on viability frozen-thawed gametes and subsequent development of embryos *in vitro*. It is set that the use of modern biotechnological methods allows getting the necessary amount of immature oocytes from piggy-wiggies and sows with high genetic potential for the more wide use of genesial potential of animals. Certainly dynamics and index the subsequent crushing *in vitro* embryos pigs of different age-dependent groups which are got from frozen-thawed and *maturations* of organism ovules piggy-wiggies and sows.

**Key words:** cryopreservation, oocyte-cumulus complexes, vitrification solution, cryoprotectors, *maturations in vitro*, embryos.

Дата надходження в редакцію: 22.12.2013 р.

Рецензент: кандидат с.-г. наук, доцент В.В. Попсуй