

фолликулярної жидкості і структурних елементів фолликула ( $127,4 \pm 10,5 \mu\text{a}$ ,  $P < 0.001$ ).

Таким образом, мониторинг транслокации и оценка функционального состояния митохондрий донорских ооцитов коров и свиней на основе измерения интенсивности флуоресценции флуорохромов (родамин 123, MitoTracker Orange CMTRos) – информативный критерий раннего прогнозирования потенций к формированию зрелой яйцеклетки и оценки качества сред для созревания ооцитов *in vitro*.

УДК 636.92.082:621.039.53+57.08

## **ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ КРОЛІВ *in vitro* З ВИКОРИСТАННЯМ НАНОМАТЕРІАЛІВ**

**А. Б. Зюзюн\***

***Інститут розведення і генетики тварин НААН***

Одержання біологічно повноцінних ембріонів сільськогосподарських тварин поза організмом (*in vitro*), порівняно з їх формуванням в статевих шляхах самок, не завжди є на високому рівні, оскільки ембріональний розвиток залежить від взаємозв'язку ембріонів із статевими шляхами самки. Отже, ефективно одержання ембріонів ссавців *in vitro* неможливе без забезпечення оптимальних умов культивування та середовищ, які повинні задовольняти потреби клітин у поживних речовинах і відповідати особливостям метаболізму (Соу Р. et. al., 2005; Смилова Н. И. и др., 1999).

Наразі дослідження з удосконалення методик клонування, трансгенезу та одержання ембріональних стовбурових клітин проводяться переважно з використанням гамет кролів (M.R. Blanco et. al., 2011; Y. Kosenyuk, 2006.). Це пов'язано з тим, що цей вид сільськогосподарських тварин є зручним біологічним об'єктом внаслідок коротких репродуктивних циклів і багатоплідності. Тому існує необхідність в удосконаленні методик одержання дозрілих яйцеклітин кролів та формування ембріонів *in vitro* з метою їх використання для відпрацювання методів одержання клонованих та трансгенних особин.

Для удосконалення середовищ культивування поза організмом ембріонів кролів заслуговує на увагу вискодисперсний кремнезем (ВДК), який є наноматеріалом з розміром частинок 4–40 нм і застосовується для підвищення життєздатності кріоконсервованих сперматозоїдів сільськогосподарських тварин та оптимізації середовищ формування ембріонів свиней *in vitro* (Чуйко А. А., 2003; Ковтун С. І., 2009). Наявність на поверхні ВДК певної кількості хімічно активних гідроксильних груп зумовлює моди-

---

\* Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук, професор, член-кореспондент НААН С.І. Ковтун

фікацію поверхні різними функціональними групами, що дає змогу використовувати ВДК як матрицю для синтезу матеріалів із певними фізико-хімічними та біологічними властивостями (Галаган Н. П. та ін., 2006). В зв'язку з цим ми вивчали вплив ВДК t°C200 на ефективність формування зигот кролів в умовах *in vitro* та розвиток ембріонів поза організмом до імплантаційних стадій. В дослідженнях був використаний ВДК вітчизняного виробництва (м. Калуш Івано-Франківської обл.) з S пит = 300 м<sup>2</sup>/г, поверхня якого перед експериментом було оброблено протягом 2 годин при температурі +200°C.

Для проведення досліджень яєчники одержували від забитих клінічно здорових статевозрілих кролиць віком 6–12 міс. Ооцит-кумулясні комплекси вилучали шляхом розсічення стінок антральних фолікулів. Відібрані гамети дозрівали *in vitro* упродовж 24 години в середовищі TCM 199 (Sigma, M-5017) з додаванням 20 % еструсної сироватки крові корів і 3–5 x 10<sup>6</sup> клітин гранульози в 1 мл. Культивування проводили за температури +38,8°C і 4 % CO<sub>2</sub> у повітрі. Критерієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільця. Ембріони отримували шляхом запліднення яйцеклітини свіжоотриманими сперматозоїдами, які вилучали із хвостової частини придатка сім'яника (епідидиміс) кроля. Капацитовані поза організмом епідидимальні сперматозоїди (концентрація – 1,5 x 10<sup>6</sup> в 1 мл) та ооцити спільно інкубували в середовищі TALP-IVF упродовж 22 годин. Культивування ембріонів проводили у середовищі TCM 199 (Sigma, M-5017) з додаванням 10 % фетальної сироватки крові теляти (Sigma, F-9665) та з додаванням 0,001 % наноматеріалу ВДК t°C200.

В дослідженнях ми використали найбільш дієву концентрацію 0,001 % наноматеріалу ВДК t°C200, яка за результатами попередніх досліджень при додаванні до розморожених сперматозоїдів бугаїв та кнурів у даній концентрації пролонгує їх життєву активність (Galagan N. P. et. al., 2006; Галаган Н. П. та ін., 2010). Для проведення даного дослідження ми розділили зиготи кролів, які одержані після дозрівання та запліднені *in vitro* дві групи: група 1 – дослідна (58 шт.), в якій культивування проводили в середовищі з 0,001 % наноматеріалу ВДК t°C200; група 2 – контрольна (54 шт.), в якій культивування зигот проводили без додавання наноматеріалу. За даними морфологічного аналізу рівень дроблення ембріонів кролів *in vitro* становив 55,2 % (32 із 58) у групі 1, а в групі 2–51,9 % (28 із 54). Сформовані 2–4-клітинні ембріони проявляли ознаки повноцінного розвитку. Отже, хоча рівень дроблення суттєво не відрізнявся між порівнюваними групами, але вищий відсоток спостерігався в дослідній групі з 0,001 % ВДК t°C200, що свідчить про перевагу його використання. За результатами подальшого розвитку сформованих *in vitro* ембріонів кролів встановлено вірогідну різницю між досліджуваними групами та відмічено позитивний вплив ( $p < 0,05$ , критерій Ст'юдента) на подальший розвиток ембріонів кролів *in vitro* наноматеріалу ВДК t°C200 в концентрації 0,001%. Так в дослідній групі ембріонів кролів, які розвинулись *in vitro* до ранньої морули (18 із 58) отримано на 18 % більше, ніж в контрольній (7 із 54).

Проведений цитогенетичний аналіз препаратів ембріонів кролів на різних стадіях розвитку (від двох бластомерів до ранньої морули) підтвердив, що ембріони, які за візуальною морфологічною оцінкою були визначені як нормальні містили повноцінні ядра із ядерцями, кількість яких відповідала кількості бластомерів ембріонів, хроматин цих ядер відповідав стадії розвитку зародка.

Отже, проведеними експериментальними дослідженнями з вивчення впливу ВДК t°C200 в концентрації 0,001 % на ефективність формування зигот кролів в умовах *in vitro* та розвиток ембріонів поза організмом на доімплантаційних стадій встановлено позитивний вплив даного наноматеріалу на формування та розвиток ембріонів в умовах *in vitro* і отримати вірогідно більшу кількість ембріонів (31 %), які розвинулись до стадії морули. Таким чином, наноматеріал ВДК у складі середовища для культивування ембріонів кролів стимулюють процес дроблення зигот та сприяють розвитку вірогідно більшої кількості ембріонів на доімплантаційних стадіях.

УДК 636.2:612.621

## **КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В ООЦИТАХ СВИНЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЕСТОСТЕРОНА**

***В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина***  
***Всероссийский научно-исследовательский институт***  
***генетики и разведения сельскохозяйственных животных,***  
***Санкт-Петербург, Россия***

Совершенствование систем дозревания ооцитов свиней *in vitro* – актуальная проблема биотехнологии получения эмбрионов, в том числе трансгенных и клонированных. Моделирование систем дозревания ооцитов подразумевает знание механизмов влияния различных факторов, в том числе гормонов, определяющих потенции ооцитов к оплодотворению и дальнейшему развитию эмбрионов. Основным подходом к решению этой проблемы является изучение механизмов внутриклеточной сигнализации в клетках во время процессов активации и ингибирования мейоза. В настоящее время установлено, что важным моментом внутриклеточной передачи сигналов является изменение транспорта и внутриклеточной концентрации различных ионов. Изменения в транспорте и внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  играют ключевую роль в запуске и регуляции общих и специализированных клеточных функций, таких как пролиферация, рост, секреция, сокращение и т.д. Стероиды играют важную роль в формировании зрелой яйцеклетки млекопитающих *in vivo*. Известно, что при воздействии тестостерона ингибируется созревание ооцитов, при совме-