

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН  
ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ  
З ОПТИМІЗАЦІЇ НАНОБІОМАТЕРІАЛОМ НА ОСНОВІ  
ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ ТА  
РАФІНОЗИ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ  
*IN VITRO* ГАМЕТ ТА ЕМБРІОНІВ СВИНЕЙ**

Чубинське, 2018

УДК 636.4:[591.463.1:57.086.83:57.085.2:591.3:620.3]

М 54

Авторський колектив:

*С. І. Ковтун*, доктор с.-г. наук, професор, академік НААН;

*О. В. Щербак*, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник;

*А. Б. Зюзюн*, кандидат біологічних наук, ст. наук. співробітник;

*П. А. Троцький*, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник.

*Методичні рекомендації розглянуто і схвалено вченою радою  
Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН  
(протокол № 11 від 23.10.2018 р.).*

Рецензенти:

*Котилова К. В.*, доктор с.-г. наук, заступник директора з наукової та інноваційної роботи Інституту продовольчих ресурсів НААН;

*Кузєбний С. В.*, канд. с.-г. наук, заступник директора з наукової роботи Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН.

М 54 Методичні рекомендації з оптимізації нанобіоматеріалом на основі високодисперсного кремнезему та рафінози середовищ для культивування *in vitro* гамет та ембріонів свиней / С. І. Ковтун, О. В. Щербак, А. Б. Зюзюн, П. А. Троцький. – Чубинське, 2018. – 24 с.

У рекомендаціях узагальнено методичні підходи щодо підвищення ефективності методики отримання дозрілих поза організмом ооцитів свиней та формування ембріонів за умови використання нанобіоматеріалу ВДК/рафіноза.

Запропоновані нові підходи до підвищення життєздатності деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів з використанням нанобіоматеріалів відповідно до «Інструкції із штучного осіменіння свиней» (Наказ Міністерства аграрної політики України від 13.12.2002 № 395) та ДСТУ 3070-95 «Штучне осіменіння сільськогосподарських тварин. Терміни та визначення».

Рекомендації розраховані на спеціалістів у галузі біотехнологічних і кріобіологічних лабораторій, науковців, викладачів і студентів вищих навчальних закладів біологічного, медичного й аграрного профілю.

УДК 636.4:[591.463.1:57.086.83:57.085.2:591.3:620.3]

© Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН, 2018

## ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	4
ВСТУП.....	5
Імобілізація рафінози на поверхні високодисперсного кремнезему та оцінка ефективності адсорбції.....	6
Оцінка біологічної активності ВДК/рафіноза за умов культивування <i>in vitro</i> із деконсервованими еякульованими сперматозоїдами кнурів.....	8
Ефективність мейотичного дозрівання ооцитів свиней <i>in vitro</i> за додавання ВДК/рафіноза до середовища культивування.....	11
Розвиток ембріонів свиней поза організмом за умови додавання ВДК/рафінози.....	14
Аналіз цитогенетичних препаратів ооцитів та ембріонів.....	17
ВИСНОВКИ.....	19
ДОДАТОК.....	20
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	22

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

<b>ВДК</b>	високодисперсний кремнезем
<b>БСА</b>	Bovine Serum Albumin (англ.), альбумін сироватки крові великої рогатої худоби
<b>ОКК</b>	ооцит-кумулясні комплекси
<b>ЛГЖ- кріосередовище</b>	лактозо-гліцеріно-жовткове кріосередовище
<b>НБМ</b>	нанобіоматеріал
<b><i>in vitro</i></b>	лат. (в склі) — технологія проведення досліджень, «в пробірці» — поза організмом
<b>t</b>	температура
<b>TSM 199</b>	середовище для культивування
<b>CO<sub>2</sub> інкубатор</b>	інкубатор для культивування клітин при заданих параметрах

## ВСТУП

Сучасні нанотехнології інтенсивно використовуються в різних галузях науки та техніки, зокрема біотехнології, сільському господарстві, медицині. Новою тенденцією до створення наночастинок є біологічний синтез із використанням полімерних матриць, які не токсичні та можуть бути легко виготовлені в будь-якій формі, необхідній для певного способу застосування. До подібних матриць можна віднести такі біополімери, як крохмаль, хітозан, циклодекстрин та високодисперсний кремнезем (ВДК) які діють як стабілізатор та відновлювальний агент. Застосування біополімерів під час виробництва наночастинок має кілька переваг порівняно зі звичайними синтетичними реагентами. Високомолекулярні ланцюги таких біополімерів характеризуються великим числом гідроксильних груп і тому такі структури можуть утворювати комплекси з цільовими молекулами. Це забезпечує контроль розміру, форми та дисперсності наночастинок, що і робить їх менш токсичними до клітин ссавців (Д. А. Новичкова, 2017). ВДК володіє унікальним комплексом фізико-хімічних і медико-біологічних властивостей: висока сорбційна ємність до білків, токсинів, відсутність алергенної та шкідливої дії на клітини, активація репаративних процесів (С. І. Ковтун, 2012, 2015).

В. Ю. Недава з колегами показали, що додавання до кріосередовищ ВДК під час кріоконсервації продовжує виживаність сперматозоїдів після їх деконсервації (В. Ю. Недава, 1990). Адсорбційна модифікація поверхні ВДК деякими вуглеводами забезпечила отримання на його основі наноматеріали, які проявили більш стимулюючу активність на сперматозоїди, ніж вихідний ВДК (О. В. Щербак, 2017). Під час створення нових наноматеріалів необхідно враховувати багатофункціональність біомолекул. Відомо, що деякі вуглеводи є енергоємними речовинами, природними кріопротекторами, а також конструкціями, що розпізнають у біополімерах і рецепторах клітинну поверхню.

Механізм дії деяких вуглеводів, які проникають у клітину та утворюють водневі зв'язки із молекулами води, наразі широко висвітлено, а вплив вуглеводів, які не проникають у клітину, на сьогодні до кінця не з'ясований. Таким вуглеводом є олігосахарид рафіноза.

Одержання біологічно повноцінних ембріонів сільськогосподарських тварин в умовах *in vitro*, порівняно з одержаними *in vivo*, має не завжди високі та стабільні результати. Тому оптимізації середовищ для культивування репродуктивних клітин приділяється значна увага біотехнологів. Для удосконалення середовищ культивування гамет свиней заслуговує уваги наноматеріал на основі ВДК та рафінози. Вітчизняними вченими доведено, що додавання ВДК до суспензії різних клітин (дріжджі, мікроорганізми, еритроцити, сперматозоїди) у малих концентраціях сприяє стимуляції їх життєздатності. Імобілізація на поверхні ВДК ряду біомолекул дозволяє створювати біологічно активні наноматеріали, які здатні підсилювати подібний ефект (А. А. Чуйко, 2003).

Дослідження проводили в лабораторії біотехнології відтворення Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН. Використаний нанобіоматеріал ВДК/рафіноза синтезовано в Інституті хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України.

### **Імобілізація рафінози на поверхні високодисперсного кремнезему та оцінка ефективності адсорбції**

В дослідженнях використаний нанобіоматеріал на основі ВДК (із гідроксильованою поверхнею, марка А-300) із  $S_{\text{пит}} = 285 \text{ м}^2/\text{г}$  (Україна, м. Калуш) та рафінози («Sigma»). Рафіноза є трисахаридом, який складається із залишків D-галактози, D-глюкози та D-фруктози (рис. 1).

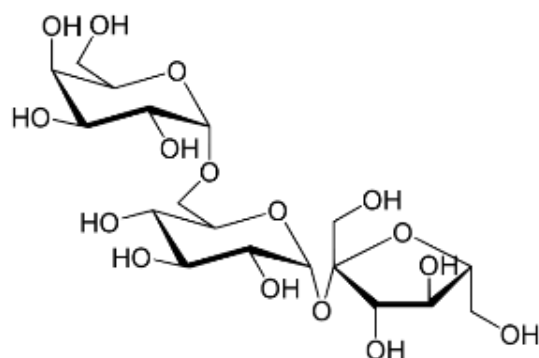


Рис. 1. Рафіноза ( $C_{18}H_{32}O_{16}$ )

Імобілізацію зазначених біомолекул на поверхні ВДК проводили, використовуючи фізичну адсорбцію із водної фази відповідно загальноприйнятої методики. Співвідношення адсорбат:адсорбент становив 1:10; вихідні концентрації для рафінози – 1,563–70 мкг/мл. Білок адсорбували при рН = 4,8. Час адсорбції – 2 год. при постійному струшуванні. Осад адсорбенту видаляли центрифугуванням 10 хв. при 3000 об/хв., висушували ( $t = +37^{\circ}\text{C}$ ) та механічно подрібнювали для використання в подальших дослідженнях. В надосадовій рідині вимірювали концентрацію зазначених речовин за стандартним методом (Г. А. Кочетов, 1980). Розраховували величину адсорбції за формулою (А. А. Чуйко, 2003):

$$A = (C_{\text{вих}} - C_{\text{рівн}})V/m,$$

де  $C_{\text{вих}}$  і  $C_{\text{рівн}}$  – відповідно вихідна та рівноважна концентрації в розчині, мг/мл;

$V$  – об'єм розчину, мл;

$m$  – маса адсорбенту, г.

Виміри проводили на спектрофотометрі «Lambda-35» («Perkin-Elmer»), а також фотоелектроколориметрі «КФК-2».

Ефективність адсорбційних взаємодій біомолекул із адсорбентом оцінювали за ізотермами адсорбції (Б. В. Айвазов, 1973). Десорбцію біомолекул із поверхні ВДК проводили за такими режимами, як і процес адсорбції. Для цього до наважок висушеного адсорбенту додавали воду у зазначених вище співвідношеннях. Надалі процес обробки проб ідентичний як після адсорбції.

Для підтвердження даних адсорбційних експериментів використовували метод ІЧ-спектроскопії. Для цього досліджували нанобіоматеріали в області довжин хвиль  $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$  на спектрофотометрі «Thermo Nicolet Nexus FTIR» із використанням приставки дифузного відбиття «SMART Collector». Їх зразки змішували із попередньо підсушеним KBr («Riedel-de Haen», Франція) в співвідношенні 1:4 (для вуглеводів). При обробці спектрів використовували програмне забезпечення «Omnis». Ефективність взаємодії біомолекул із поверхнею ВДК оцінювали за інтенсивністю

смуг поглинання при  $3750 \text{ см}^{-1}$ , які характерні для силанольних груп (В. М. Гунько, 2009).

### **Оцінка біологічної активності ВДК/рафіноза за умов культивування *in vitro* із деконсервованими еякульованими сперматозоїдами кнурів**

Рухливість сперматозоїдів це їх здатність до прямолінійного поступального руху. Для проведення оцінки рухливості сперматозоїдів за звичай необхідні наступні прилади та реактиви: мікроскоп біологічний, термостат, предметне скло, покривні скельця, палички скляні, піпетки мірні, натрій лимоннокислий ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), натрій хлористий ( $\text{NaCl}$ ).

До початку роботи необхідно прогріти термостат, робоча температура внутрішньої камери термостата має бути  $40\text{--}42^\circ\text{C}$ . Лабораторний посуд повинен бути стерильний (скельця шліфовані покривні і предметні, скляні палички, піпетки). Необхідні розчини та лабораторний посуд, які планується використовувати під час досліджень зберігається за температури  $35\text{--}40^\circ\text{C}$ .

Рухливість статевих клітин визначають за допомогою біологічного мікроскопа за збільшення у 120 або 180 разів. Зазвичай скляною паличкою (піпеткою) на предметне скло наносять краплю сперми, до якої додають 2-3 краплі 3% розчину лимоннокислого натрію. В своїх дослідженнях ми до 1 мл 3% розчину лимоннокислого натрію додавали НБМ в трьох концентраціях 0,1; 0,01 і 0,001% (дослідні групи) та контролі (без додавання ВДК/рафіноза). Дослідні зразки гарно перемішували до повного розчинення НБМ та додавали по одній гранулі кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів.

Деконсервовані сперматозоїди змішували з попередньо підготовленими розчинами, наносили краплю на предметне скельце та накривали покривним скельцем. Рухливість сперматозоїдів визначали у полі зору мікроскопа. Підраховували кількість клітин з прямолінійним поступальним, манежним і коливальним рухами, а також мертвих. У кожній пробі три рази поспіль ( $n = 3$ ) визначали



кількість рухливих сперматозоїдів. Оцінювання проводили за десятибальною системою: за кожних 10% сперматозоїдів з прямолінійно-поступальним рухом ставили один бал (0–10) або відсотками (0–100).

Запліднювальна здатність сперматозоїдів тісно пов'язана з їх виживаністю поза організмом, що, у свою чергу, залежить від їх стійкості до зовнішніх впливів. Тому поряд з рухливістю рекомендуємо визначати тривалість виживаності сперматозоїдів поза організмом.

Абсолютну виживаність сперматозоїдів визначали за кожний окремо взятий інтервал часу в процесі зберігання (культивування) сперматозоїдів після їх розморожування. Тривалість виживаності визначали за кількістю годин, що минули від початку розморожування та постановки на культивування сперматозоїдів до повної втрати рухливості клітинами.

Для проведення визначення тривалості виживаності сперматозоїдів поза організмом самця зазвичай використовують наступні прилади та реактиви: мікроскоп біологічний, термостат, холодильник, предметне і покривне скло, колби мірні (10–50 мл), 3% розчин лимоннокислого натрію. Спермодози розморожували (описано вище), фіксували час розморожування й одночасно визначали початкову рухливість сперматозоїдів. Через кожні 30 хвилин оцінку повторювали. Закінченням досліджень приймали час, коли рухливість сперматозоїдів становила 0,5 бала (5% сперматозоїдів проявляють рух).

В своїх дослідженнях для оцінки біологічної активності в експериментах застосовували кріоконсервовані еякульовані сперматозоїди трьох кнурів миргородської породи (Дніпро 641, Комиш 853, Коханий 289), які зберігаються у банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН. До розморожених сперматозоїдів кожного кнура додавали ВДК/рафінозу в концентрації 0,1; 0,01 і 0,001% (дослідні групи). Дію нанобіоматеріалу на сперматозоїди оцінювали за зміною їх активності у відсотках кожного кнура окремо з наступним

встановленням середнього показника у контролі (без додавання ВДК/рафіноза до розморожених сперматозоїдів) і у дослідних групах.

Встановлено, що після розморожування сперматозоїди проявляли в середньому активність на рівні  $16,7 \pm 3,33\%$ . Цей показник у контролі знизився упродовж 30 хв. лише на 1,7% ( $15,0 \pm 2,89\%$ ). Після перебування сперматозоїдів у середовищі, що містило ВДК/рафіноза у 0,1; 0,01 та 0,001% концентраціях упродовж 30 хвилин відбулося зниження активності гамет на 10,0; 8,4 та 6,7%, порівняно із початковою активністю (рис. 2).

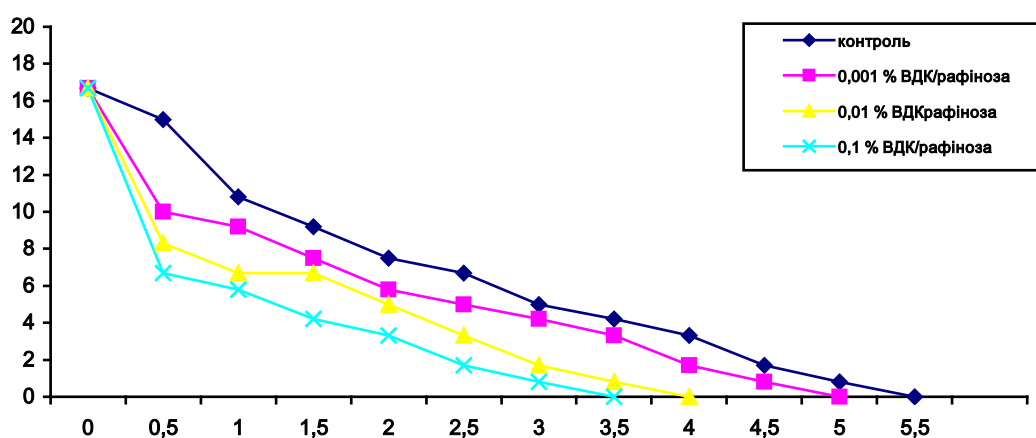


Рис. 2. Вплив ВДК/рафіноза на життєздатність деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів.

Слід відмітити, що через 1,5 години від початку дослідження активність сперматозоїдів у контролі становила 9,2%, а в дослідних групах на цей період часу відмічали подібну активність, а саме 7,5% із 0,001%-ою концентрацією ВДК/рафіноза; 6,7 та 4,2% із 0,01 та 0,1%-ою концентрацією ВДК/рафіноза. Загальний час виживаності сперматозоїдів у контролі сягав – п'ять годин, а в дослідній групі із 0,1%-ою не перевищив трьох годин, для сперматозоїдів які перебували із 0,01 та 0,001%-ою концентраціями цей показник становив 3,5 та 4,5 годин, відповідно.

На нашу думку такий процес проявився за рахунок властивостей сахарів заміщати молекули води в біологічних системах, які містять білки. Також такий процес може супроводжуватись утворенням комплексів в розчинах та зміною в'язкості таких біологічних систем.

## **Ефективність мейотичного дозрівання ооцитів свиней *in vitro* за додавання ВДК/рафіноза до середовища культивування**

Отримання ооцитів, їх морфологічну оцінку та відбір, постановку на дозрівання поза організмом в своїх дослідженнях проводили у стерильних умовах боксу. Температуру у боксі підтримували на рівні +20 – +25°C. Ооцит-кумулясні комплекси (ОКК) отримували із яєчників забитих клінічно здорових свинок віком 6 – 8,5 міс. ОКК вилучали шляхом розсічення стінок антральних фолікулів. Відібрані ооцити (n = 245) дозрівали *in vitro* упродовж 46 години в середовищі TCM 199 (Sigma, M-5017) з додаванням 20% еструсної сироватки крові корів і  $3-5 \times 10^6$  клітин гранульози/мл. Для культивування поза організмом відбирали ооцити із щільним та розпушеним кумулюсом (R. Romar, P. Coy, D. Rath, 2012). Гамети культивували за температури +38,8°C і 4% CO<sub>2</sub> у повітрі. Вилучені ОКК свиней розділяли на дві групи: дослідна, в якій культивування проводили в середовищі з додавання нанобіоматеріалу ВДК/рафіноза в концентрації 0,001% та контрольну, в якій культивування ОКК проводили без додавання нанобіоматеріалу. Критерієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільця (А. Б. Зюзюн, 2015). Рівень дозрівання ооцитів *in vitro*, запліднення та аналіз стану хроматину ядер ембріонів вивчали шляхом аналізу цитогенетичних препаратів, які готували за модифікованим методом А. Тарковського (P. J. Pradeep, 2011). Препарати фарбували 2% розчином барвника Гімза й аналізували під світловим мікроскопом Jenaval, Carl Zeiss ок×10, об×100. Статистичну обробку одержаних даних проводили з використанням критерію Ст'юдента.

Нашими попередніми дослідженнями показано, що найменший вплив на деконсервовані сперматозоїди кнурів мала 0,001%-ва концентрація ВДК/рафіноза, тому наступним етапом досліджень було оцінити ефективність мейотичного дозрівання ооцитів свиней *in vitro* за додавання саме цієї концентрації нанобіоматеріалу на основі ВДК та олігосахариду.

За морфологічною оцінкою та даними цитогенетичного аналізу встановлено, що найбільша частина ооцитів, в обох групах, після культивування поза організмом упродовж 46 годин досягла стадії ядерного дозрівання – метафази II, що свідчить про достатньо високий загальний рівень дозрівання (понад 75%). Встановлено вірогідну різницю між досліджуваними групами в кількості ооцитів які досягли метафази II в умовах *in vitro* ( $P < 0,01$  критерій Ст'юдента). Так в контрольній групі ооцитів які досягли метафази II (115 ооцитів із 166 поставлених на культивування) на 15,5% менше ніж в дослідній (67 ооцитів із 79 поставлених на культивування). Також відмічено, що в контрольній групі на 11,0% (31 ооцит із 166 поставлених на культивування) більше ооцитів які не відновили мейотичне дозрівання та залишились на стадії диплотени. (табл. 1).

### 1. Вплив ВДК/рафіноза на дозрівання ооцитів свиней в умовах *in vitro*

Група	Всього ооцитів, n	Стадії розвитку ооцитів <i>in vitro</i>			Кількість ооцитів з дегенерованим хроматином, n (% ± m)
		диплотена, n (% ± m)	телофаза, n (% ± m)	метафаза II, n (% ± m)	
Контрольна група	166	31 <sup>a</sup> (18,7±3,0)	5 <sup>c</sup> (3,0±1,3)	115 <sup>d</sup> (69,3±3,5)	15 <sup>f</sup> (9,0±2,2)
Дослідна група (0,001% ВДК/рафіноза)	79	6 <sup>b</sup> (7,6±2,9)	2 <sup>c</sup> (2,5 ±1,7)	67 <sup>e</sup> (84,8±4,0)	4 <sup>f</sup> (5,0±2,4)

Примітка: a,b, d:e – різниця статистично вірогідна порівняно до максимального значення з  $P < 0,01$ , критерій Ст'юдента

Слід відмітити, що загальна частина гамет з дегенерованим хромосомним матеріалом не перевищувала 9,0% і суттєво не різнилась між порівнюваними групами. Це вказує на забезпечення активізуючих умов середовища для повноцінного дозрівання ооцитів. Отже, додавання 0,001% ВДК/рафіноза сприяло підвищенню рівня ооцитів, які розвинулись до метафази II в умовах *in vitro* майже до 85,0% (67 ооцитів із 79 поставлених на культивування), завдяки забезпеченню активізуючих умов в середовищі для дозрівання ооцитів (рис. 3, 4). Це свідчить про стимулюючий вплив

ВДК/рафіноза в концентрації 0,001% на ооцити свиней в умовах культивування *in vitro*.



Рис. 3. Ооцит свині після дозрівання *in vitro* на стадії метафази II мейозу

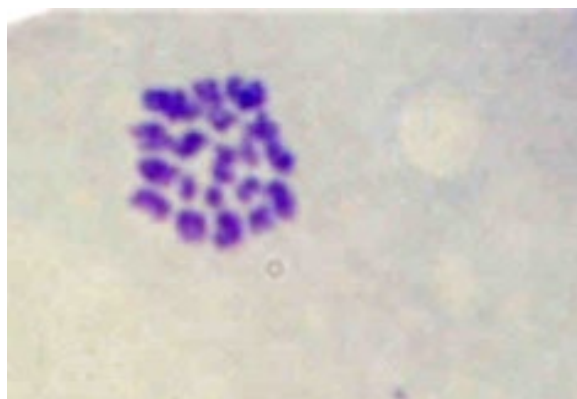


Рис. 4. Цитогенетичний препарат ооциту свині після дозрівання *in vitro* на стадії метафази II мейозу (n=19)

Отже, в результаті проведеної оцінки показано дозозалежний ефект ВДК/рафіноза на культивовані гамети. На нашу думку такий ефект ми спостерігали внаслідок взаємодії ВДК/рафіноза з білками мембрани гамет, тобто цей нанобіоматеріал у менших концентраціях спричинює лише структурні перебудови мембрани, а при збільшенні концентрації витягає з неї білки, порушуючи цілісність біліпідного шару.

## Розвиток ембріонів свиней поза організмом за умови додавання ВДК/рафінози

Нами показано, що ВДК/рафіноза в 0,001 %-ій концентрації можна успішно застосовувати для підвищення рівня мейотичного дозрівання ооцитів свиней *in vitro*. З огляду на отримані результати заслуговує на увагу додавання цього НБМ до середовища для культивування поза організмом ембріонів свиней. В зв'язку з цим ми вивчали вплив ВДК/рафіноза на ефективність формування зигот свиней в умовах *in vitro* та розвиток ембріонів поза організмом до доімплантаційних стадій.

Сперматозоїди та дозрілі поза організмом ооцити спільно інкубували в середовищі TALP-IVF (табл. 2) з додаванням суміші ПГЕ (20 мкМ пеніциламіну (Sigma, P 4875), 10 мкМ гіпотаурину (Sigma, H 1384) та 1 мкМ епінефрину (Sigma, E 4250) упродовж 18 годин при концентрації рухливих сперматозоїдів  $1,5 - 2,0 \times 10^6$  сперматозоїдів/мл та температурі 38,5°C і 5% CO<sub>2</sub> в атмосфері повітря і рН 7,8.

### 2. Склад середовищ для проведення запліднення яйцеклітин поза організмом

Компоненти середовища фірми Sigma (номер за каталогом)	мг на 20 мл води		
	TALP без іонів Ca <sup>2+</sup>	TALP для відмивання	TALP-IVF
1. Хлорид натрію, NaCl (S 5886)	130,9	133,2	133,2
2. Хлорид калію, KCl (S 5405)	4,0	4,76	4,76
3. Гідросульфат натрію, NaHCO <sub>3</sub> (S 5761)	42,0	3,36	41,8
4. Дигідрофосфат натрію, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (S 5011)	0,94	0,94	0,94
5. Лактат натрію, 60 % сироп (L 7900)	11,2	11,2	11,2
6. Хлорид магнію, MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (M 2393)	2,0	2,0	2,0
7. Хлорид кальцію, CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O (C 7902)	–	4,4	4,4
8. Нерес (H 9136)	24,0	48,0	48,0
9. Феноловий червоний (P 3532)	0,15	0,2	0,2
10. Канаміцин сульфату (P 5530)	1,5	1,5	1,5
11. Піруват натрію (P 5280)	2,2	1,1	1,1
12. БСА (A 6003)	120,0	60,0	60,0
13. Глюкоза (G 7021)	50,0	20,0	–

Після сумісного з сперматозоїдами культивування яйцеклітини відмивали у середовище TALP для відмивання 3–5 раз та 2 рази в середовищі для культивування ембріонів. Відмиті від сперматозоїдів зиготи свиней культивували *in vitro* у середовищі NCSU-23 (табл. 3).

### 3. Склад середовища NCSU-23

Компоненти середовища фірми Sigma (номер за каталогом)	мМоль
1. Хлорид натрію, NaCl (S 5886)	108,6
2. Хлорид калію, KCl (S 5405)	4,79
3. Гідросульфат натрію, NaHCO <sub>3</sub> (S 5761)	25,07
4. Дигідрофосфат калію, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ()	1,49
5. Сульфат магнію, MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,19
6. Хлорид кальцію, CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O (C 7902)	1,7
7. Глютамін (G 5763)	1,0
8. Таурин (T 0625)	7,0
9. Гіпотаурин (H 1384)	5,0
10. БСА (мг/мл, A 6003)	4,0
11. Глюкоза (G 7021)	5,55

Для проведення експериментальних досліджень використовували концентрацію ВДК/рафіноза 0,001%, враховуючи встановлений в попередніх дослідженнях позитивний вплив цієї концентрації на культивування ооцитів та сперматозоїдів поза організмом. Після запліднення *in vitro*, отримані зиготи розділили на дві групи:

I група – контрольна група

II група – дослідна група, до середовища для культивування додали 0,001% нанобіоматеріалу ВДК/рафіноза.

За даними морфологічного аналізу рівень дроблення ембріонів свиней *in vitro* у дослідній групі становив 38,0% (27 ембріонів із 71 заплідненої яйцеклітини), а в контрольній групі – 20,0% (19 ембріонів

із 95 запліднених яйцеклітин) (табл. 4). Сформовані 2-4-клітинні ембріони проявляли ознаки повноцінного розвитку (рис. 5). За результатами подальшого розвитку сформованих *in vitro* ембріонів свиней встановлено вірогідну різницю між досліджуваними групами та відмічено позитивний вплив ( $P < 0,05$ ) на подальший розвиток ембріонів свиней *in vitro* НБМ ВДК/рафіноза в концентрації 0,001%. Так в дослідній групі ембріонів свиней, які розвинулись на 5 день культивування з 2-4-клітинних до морул (рис. 6) або ранніх бластоцист, отримано на 8,2 % більше, ніж в контрольній (47,3 %).

#### 4. Аналіз впливу ВДК/рафінози на розвиток ембріонів свиней в умовах *in vitro*

Група	Запліднено ооцитів, n	Кількість ембріонів	
		2–4 клітинних, n (%)	ранніх морул, n (%)
I	95	19 <sup>a</sup> (20,0 ± 4,1)	9 <sup>c</sup> (47,3 ± 11,4)
II	71	27 <sup>b</sup> (38,0 ± 5,7)	15 <sup>c</sup> (55,5 ± 9,5)

**Примітки:** культивування до стадії морул відбувалося в одному досліді, a:b –  $P < 0,05$ , критерій Ст'юдента

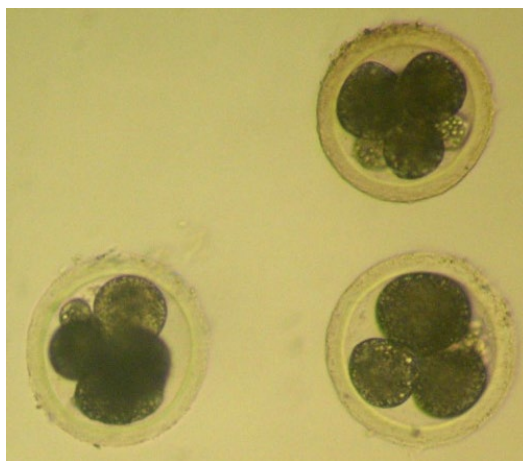


Рис. 5. 2-4 клітинні ембріони свиней отримані *in vitro*.

Зб. об.10х, ок.10х



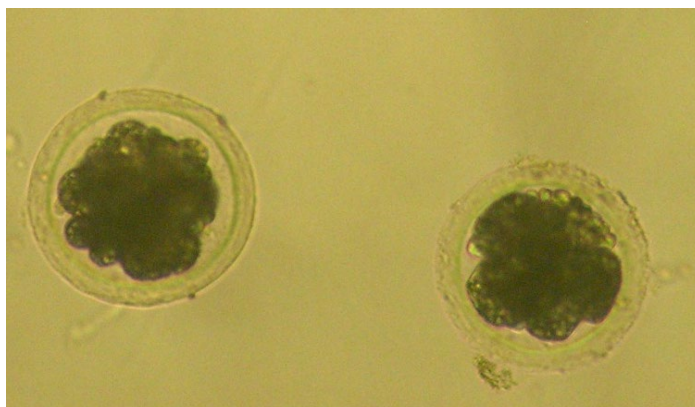


Рис. 6. Ембріони свиней, отримані поза організмом на стадії морули.  
Зб. об.10х, ок.10х

Проведеними дослідженнями з вивчення впливу ВДК/рафіноза в концентрації 0,001% на ефективність формування зигот свиней в умовах *in vitro* та розвиток ембріонів поза організмом доімплантаційних стадій встановлено позитивний вплив даного НБМ на формування та розвиток ембріонів в умовах *in vitro*. У дослідній групі, в середовище яке додано ВДК/рафіноза в концентрації 0,001% отримано вірогідно більшу кількість ембріонів (55,5%), які розвинулись до передімплантаційних стадій. Проведеним аналізом цитогенетичних препаратів ембріонів свиней встановлено, що отримані ембріони містили повноцінні ядра із ядерцями, кількість яких відповідала стадії розвитку ембріонів. Таким чином, НБМ ВДК/рафіноза в концентрації 0,001% у складі середовища для культивування ембріонів свиней стимулює процес дроблення зигот та сприяє розвитку вірогідно більшої кількості ( $P < 0,05$ ) ембріонів до передімплантаційних стадій розвитку.

### **Аналіз цитогенетичних препаратів ооцитів та ембріонів**

Для дослідження хроматину частину гамет використовували для приготування сухоповітряних препаратів за допомогою модифікованого методу А. Тарковського. Аналіз отриманих препаратів забезпечує оцінку стадій мейотичного дозрівання ооцитів

поза організмом та виявляє хромосомні порушення у гамет і ембріонів.

Перед виготовленням препаратів предметні скельця обезжирювали 96%-етиловим спиртом.

Ооцити свиней згідно методики переносили в 0,9% гіпотонічний розчин 3-заміщеного цитрату натрію на 10–15 хвилин, механічно звільняли їх від клітин кумулюсу та фіксували на сухому знежиреному склі сумішшю метанол-оцтова кислота (3:1).

Всі робочі розчини готували безпосередньо перед використанням. Але перед використанням гіпотонічний розчин поміщають в холодильник, а фіксуючий розчин в морозильну камеру на 20-25 хвилин.

Ембріони свиней для приготування препаратів розміщували на 1–2 хвилини в 0,9% гіпотонічному розчині цитрату натрію та фіксували на сухому знежиреному склі сумішшю метанол-оцтова кислота (2:1). Препарати фарбували 2% розчином барвника Гімза та аналізували під світловим мікроскопом (рис. 7).

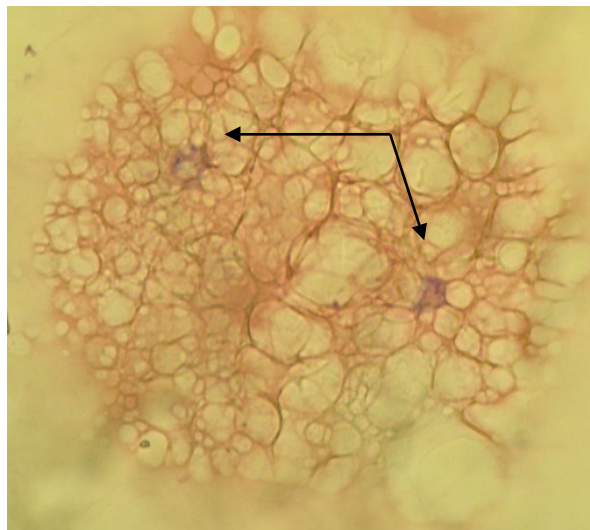


Рис. 7. Цитогенетичний препарат двоклітинного ембріона свиней отриманого *in vitro*. Стрілки вказують на ядра. Зб. об.100х, ок.10х

## ВИСНОВКИ

1. Розроблена та застосована оцінка в умовах *in vitro* біологічної активності нанобіоматеріалу на основі ВДК, поверхня якого модифікована рафінозою, за умов культивування із гаметами свиней.

2. Встановлено, що 0,001%-ва концентрація ВДК/рафіноза із деконсервованими сперматозоїдами кнурів забезпечує зниження їх активності на 5% (кнури 10,0% проти 15,0% у контролі).

3. З'ясовано, що додавання нанобіоматеріалу ВДК/рафіноза до середовища для культивування ОКК свиней в концентрації 0,001% сприяє вірогідному підвищенню їх рівня дозрівання порівняно із контролем.

4. Показано, що додавання 0,001%-ої концентрації ВДК/рафіноза до середовища культивування зигот стабілізує умови культивування ранніх зародків свиней і забезпечує кращий на 8,2% розвиток ембріонів поза організмом.

5. Перспективи подальших досліджень полягають у комплексній оцінці особливостей використання нанобіоматеріалів з врахуванням дозозалежної дії нанобіоматеріалу для конкретних типів клітин. Врахування отриманих результатів забезпечить оптимізацію технології культивування гамет та формування *in vitro* ембріонів сільськогосподарських тварин.

## ДОДАТОК

### Середовища та реактиви для культивування гамет

Для проведення досліджень необхідні наступні реактиви:

1. Середовище TC-199 (Sigma, Aldrich, Gibco);
2. Антибіотики: пеніцилін, стрептоміцин, гентаміцин (Sigma, Aldrich, Fluka або вітчизняного виробництва);
3. Солі: хлористий натрій, хлористий калій, хлористий магній, хлористий кальцій, дигідрофосфат калію, дигідрофосфат натрію, гідрофосфат натрію, лактат калію, піруват натрію, гідрокарбонат натрію (Sigma, Aldrich, Fluka);
4. Барвник Гимза (Sigma, Aldrich, Fluka);
5. Гепарин (Sigma, Aldrich, Fluka);
6. Метанол (вітчизняного виробництва марки ХЧ);
7. Льодяна уксусна кислота (вітчизняного виробництва марки ХЧ);
8. 3-х заміщений цитрат натрію (Sigma, Aldrich, Fluka);
9. Гіалуронидаза (Sigma, Aldrich, Fluka);
10. Вода для культури клітин (Sigma, Aldrich, Gibco);
11. Барвник трипановий синій 0,4%-ний розчин (Sigma, Aldrich, Fluka);
12. Фетальна сироватка корів (Sigma, Aldrich, Gibco);
13. Еструсна сироватка корів (Sigma, Aldrich, Gibco);
14. Бичачий сироватковий альбумін (Sigma, Aldrich, Gibco);
15. Мінеральне масло (Sigma, Aldrich, Fluka).

## Перелік необхідного обладнання й інструментів

Для виконання робіт необхідно наступне обладнання:

1. Мікроскоп МБС–9.
2. Мікроскоп «Jenaval» (об. 10x, 90x м. ім., 100x м. ім., ок. 10x).
3. CO<sub>2</sub> – Інкубатор.
4. Центрифуга.
5. Аналітичні ваги.
6. Сушильна шафа.
7. Термостат.
8. Холодильник-морозильник.
9. Лабораторні столи.
10. Предметні і покривні скельця.
11. Хімічний посуд (стакани, колби, циліндри різного об'єму).
12. Мікродозатори на 1–10 мкл и 10–100 мкл.
13. Пробірки «Епіндорф» об'ємом 1,5–2,0 мл.
14. Чашки «Петрі»  $d = 90$  и  $d = 40$  мм.
15. Чашки культуральні 4-ти луночні.
16. Фільтри и фільтрувальні мембрани.
17. Хірургічні інструменти (ножиці, скальпелі, зажими, пінцети).
18. Шприци одноразові (1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл и 20 мл).
19. Спиртівки.
20. Вата хірургічна.
21. Маркери.
22. Спирт.

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Адсорбционное взаимодействие высокодисперсного кремнезема с биомолекулами / А. А. Чуйко, Н. Н. Власова, Н. К. Давиденко, В. К. Погорельский // Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния; под ред. А. А. Чуйко. – К. : Наук. думка, 2003. – С. 116–152.
2. Айвазов, Б. В. Практикум по химии поверхностных явлений и адсорбции / Б. В. Айвазов. – М. : Высшая школа, 1973. – 208 с.
3. Белоус, А. М. Криобиология : монографія / А. М. Белоус, В. И. Грищенко; под редакцией Ю. В. Калугина и И. И. Никитина. – К. : Наукова думка, 1994. – 432 с.
4. Вивчення біологічної активності наноматеріалу в умовах культивування сперматозоїдів та ооцитів свиней *in vitro* / О. В. Щербак, А. Б. Зюзюн, О. С. Осипчук, С. І. Ковтун, Н. П. Галаган, П. А. Троцький // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / Національна академія наук України. – К. : Логос, 2017. – Т. 20. – С. 256–259.
5. Використання наноматеріалів для ефективного формування ембріонів свиней *in vitro* / С. І. Ковтун, О. В. Щербак, А. Б. Зюзюн, П. А. Троцький, Т. В. Галицька // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології : зб. наук. пр. – 2012. – Т. 4. – С. 513–518.
6. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на морфологию и интрацитоплазматическую локализацию липидных капель в ооцитах свиней / Д. А. Новичкова, Т. И. Кузьмина, О. В. Щербак, Н. П. Галаган, О. А. Епишко / Розведення і генетика тварин : міжвід. темат. наук. зб. – 2017. – Вип. 53. – С. 284–292.
7. Галаган, Н. П. Нанокompозити на основі високодисперсного кремнезему і біомолекул та їх термічні перетворення / Н. П. Галаган, Л. М. Патеї, Н. С. Настасієнко // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології : зб. наук. пр. – 2006. – № 4, вип. 3. – С. 599–612 / Nanokompозити na osnovi visokodispersnogo kremnezemu i biomolekul ta ih termichni peretvorennja / N. P. Galagan, L. M. Patej, N. S. Nastasienko // Nanosistemi, nanomateriali, nanotehnologії : zb. nauk. pr. – 2006. – № 4, vip. 3. – S. 599–612.
8. Гунько, В. М. Вода на границе раздела фаз / В. М. Гунько, В. В. Туров, П. П. Горбик. – К. : Наук. думка. – 2009. – 694 с.
9. Застосування наноматеріалу в ембріогенетичній системі *in vitro* отримання ембріонів свиней / О. В. Щербак, О. С. Осипчук, С. І. Ковтун, В. В. Дзіцюк // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / Національна академія наук України – К. : Логос. – 2015. – Т. 17. – С. 164–168.

10. Застосування наночастинок діоксиду кремнію в технології формування ембріонів свиней *in vitro* / О. В. Щербак, Н. П. Галаган, П. А. Троцький, С. І. Ковтун / Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології : зб. наук. пр. – 2017. – Т. 15, № 2. – С. 381–388.
11. Кочетов, Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М. : Высшая школа, 1980. – 215 с.
12. Методичні рекомендації з кріоконсервації сперматозоїдів та ооцитів сільськогосподарських тварин і формування ембріонів *in vitro* / С. І. Ковтун, Н. П. Галаган, О. В. Щербак, П. А. Троцький. – Чубинське, 2015. – 17 с.
13. A simple technique for chromosome preparation from embryonic tissues of teleosts for ploidy verification / P. J. Pradeep, T. C. Srijaaya, R. B. M. Zain, A. Papini, A. K. Chatterji // *Caryologia*, 2011. – Vol. 64, № 2. – P. 233–239.
14. Bermejo-Alvarez, P. Effect of glucose concentration during *in vitro* culture of mouse embryos on development to blastocyst, success of embryo transfer, and litter sex ratio / P. Bermejo-Alvarez, Rm Roberts, C. S. Rosenfeld // *Mol. Reprod. Dev.* – 2012. – Vol. 79, № 5. – P. 329–336.
15. Cryotolerance of *in vitro* produced porcine blastocysts is improved when using glucose instead of pyruvate and lactate during the first 2 days of embryo culture / M. Castillo-Martín, M. Yeste, R. Morató, T. Mogas, S. Bonet // *Reprod Fertil Dev.* – 2013. – Vol. 25 (5). – P. 737–745.
16. Development of an improved porcine embryo culture medium for cloning, transgenesis and embryonic stem cell isolation / L. F. Beebe, S. M. McIlfratrick, I. M. Vassiliev, M. B. Nottle // *Cloning & Transgenesis.* – 2013. – Vol. 2, I. 2. – P. 1–5.
17. Effects of Trichostatin A on *In vitro* Development of Porcine Embryos Derived from Somatic Cell Nuclear Transfer / Y. I. Jeong, C. H. Park, H. S. Kim, Y. W. Jeong, J. Y. Lee, S. W. Park et al. // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* – 2013. – Vol. 26 (12). – P. 1680–1688.
18. Romar, R. *In vitro* fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years / R. Romar, H. Funahashi, P. Coy // *Theriogenology.* – 2016. – Vol. 85. – P. 125–134.
19. Romar, R. Maturation conditions and boar affect timing of cortical reaction in porcine oocytes / R. Romar, P. Coy, D. Rath // *Theriogenology.* – 2012. – Vol. 78. – P. 1126–1139.

**НАУКОВО-МЕТОДИЧНЕ ВИДАННЯ**

Ковтун Світлана Іванівна  
Щербак Оксана Василівна  
Зюзюн Аза Богданівна  
Троцький Петро Анатолійович

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ  
З ОПТИМІЗАЦІЇ НАНОБІОМАТЕРІАЛОМ НА ОСНОВІ  
ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ ТА  
РАФІНОЗИ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ  
*IN VITRO* ГАМЕТ ТА ЕМБРІОНІВ СВИНЕЙ**

Комп'ютерна верстка та макетування П. А. Троцький

Підписано до друку 23.10.2018 р.  
Формат 60 × 84 1/16  
Ум. друк. арк. 1,4  
Наклад 100 прим.