

ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ЕМБРІОНІВ СВИНЕЙ *IN VITRO* В СИСТЕМІ ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОРІЗНОМАНІТТЯ ТВАРИН

Т. В. ГАЛИЦЬКА, П. А. ТРОЦЬКИЙ

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН, (Чубинське, Україна)

trotskiy_pa@ukr.net

*Наведено результати експериментальних досліджень з вивчення кріорезистентних особливостей ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас на життєздатність деконсервованих гамет і подальший розвиток ембріонів *in vitro*. При проведенні досліджень були використані біотехнологічні, кріобіологічні, морфологічні та цитогенетичні методи, а також методи статистичної обробки даних. Проведено дослідження з вивчення впливу індивідуальних особливостей ооцит-кумулюсних комплексів свинок при заморожуванні з наступним їх заплідненням та морфологічний і цитогенетичний аналізи отриманих *in vitro* ембріонів. Встановлено, що у 22,2 % випадках спостерігається наявність взаємозв'язку кріорезистентності ооцит-кумулюсних комплексів свинок між дослідною та контрольною групами за таких показників як кількість отриманих зародків. Для збереження та раціонального використання племінних (генетичних) ресурсів у свинарстві необхідно створювати кріобанки гамет для довгострокового зберігання з метою подальшої реалізації їх для відтворення.*

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

FEATURES OF EMBRYOS OF PIGS *IN VITRO* SYSTEM FOR THE CONSERVATION OF ANIMAL BIODIVERSITY

T. V. Galicka, P. A. Trotskiy

Institute of animal breeding and genetics nd. a. M.V.Zubets NAAS, (Chubynsky, Ukraine)

*The results of experimental studies on cryoresistive features oocyte-cumulus complexes pig breeds Landrace frozen-thawed the viability of gametes and further development of embryos *in vitro*. In conducting the research were used biotechnology, cryobiological, morphological and cytogenetic techniques and methods of statistical data. A study on the effects of individual characteristics oocyte-cumulus complexes pigs when frozen and their subsequent fertilization and morphological and cytogenetic analyzes of *in vitro* derived embryos. Found that in 22,2% of cases the relationship cryoresistive oocyte-cumulus complexes pigs between experimental and control groups on such indicators as the number of embryos obtained. For the conservation and management of breeding (genetic) resources in the pig must create cryobanks for long-term storage of gametes for further implementing them for playback.*

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

ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ СВИНЕЙ *IN VITRO* В СИСТЕМЕ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ЖИВОТНЫХ

Т. В. Галицкая, П. А. Троцкий

Інститут розведення і генетики животнох імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)

Приведены результаты экспериментальных исследований по изучению криорезистентных особенностей ооцит-кумулюсных комплексов свинок породы ландрас на жизнеспособность деконсервированных гамет и дальнейшее развитие эмбрионов *in vitro*. При проведении исследований были использованы биотехнологические, криобиологические, морфологические и цитогенетические методы, а также методы статистической обработки данных. Проведено исследование по изучению влияния индивидуальных особенностей ооцит-кумулюсных комплексов свинок при замораживании с последующим их оплодотворением и морфологический и цитогенетический анализы полученных *in vitro* эмбрионов. Установлено, что в 22,2 % случаев наблюдается наличие взаимосвязи криорезистентности ооцит-кумулюсных комплексов свинок между опытной и контрольной группами по таким показателям как количество полученных зародышей. Для сохранения и рационального использования племенных (генетических) ресурсов в свиноводстве необходимо создавать криобанки гамет для долгосрочного хранения с целью дальнейшей реализации их для воспроизведения.

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

Вступ. Нині важливе значення для сільського господарства має застосування біотехнологічних методів в тваринництві, які є ключовим фактором ефективності використання генетичного матеріалу в селекції і відтворенні. Особливо актуальним є використання цінного генетичного матеріалу тварин, отже збереження генофонду є дуже важливим та актуальним завданням зберігання та практичного використання репродуктивних клітин і ембріонів. Саме тому вирішення проблеми підвищення репродуктивної функції тварин безумовно потребують розробок нових теоретичних й практичних підходів використання біотехнологічних засобів зберігання і використання біорізноманіття у системі біотехнологічної селекції та концепції збереження генетичного різноманіття сільськогосподарських та зникаючих видів тварин. Збереження генетичного матеріалу від маточного поголів'я сільськогосподарських тварин на даний час є дуже актуальним питанням. Впровадження в практику методів відтворення сільськогосподарських тварин у системі збереження та раціонального використання генофонду порід розширює можливості їх використання для подальших біотехнологічних маніпуляцій з клітинами, дає змогу зменшити витрати на отримання ембріонів в умовах *in vitro* та сприяє розв'язанню цілої низки наукових проблем [1, 2, 3].

Розробка нових та удосконалення існуючих методів низькотемпературного зберігання гамет та ембріонів одна з найбільш актуальних проблем сучасної кріобіотехнології, яка обумовлює необхідність збереження генетичних ресурсів рідких і зникаючих видів тварин при створенні криобанків для підтримки біорізноманіття у вітчизняному тваринництві. У цьому контексті актуальним є удосконалення системи одержання ембріонів з деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів свинок після криоконсервування та їх подальший розвиток *in vitro*. На сьогодні існує великий досвід низькотемпературного консервування гамет і ембріонів тварин, однак залишаються невирішеними питання, які пов'язані з оптимізацією вже існуючих методів криоконсервування, вивченням криорезистентних властивостей ооцитів тварин різних порід, ефективністю їх застосування для консервування гамет ранніх стадій розвитку та ін. При вирішенні цих проблем важливе значення має проведення порівняльного аналізу впливу індивідуальних особливостей ооцитів, та їх геометричні параметри, що визначають оптимальні умови процедури низькотемпературного консервування на розвиток *in vitro* отриманих ембріонів [4, 5, 6].

Метою наших досліджень було удосконалення системи одержання ембріонів з деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас після криоконсервування та їх подальший розвиток *in vitro*.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулюсні комплекси отримані із яєчників свинок породи ландрас із СВАТ «Агрокомбінат «Калита» (Київська обл.). Ооцит-кумулюсні комплекси свинок отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів яєчників, вимивали середовищем

Дюльбекко та оцінювали за морфологічними ознаками. 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). Еквілібраційний та вітрифікаційний розчини були приготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко (D5773) з додаванням 20 % сироватки крові корів, яку попередньо інактивували при +56°C протягом 30 хв. Після розморожування гамет виведення кріопротекторів проводили шляхом перенесення їх на 10 хв. у розчин 1,0 М сахарози. Потім клітини тричі відмивали середовищем M-199 (M2520), оцінювали за морфологічними ознаками і переносили в середовище для культивування. Ооцит-кумулюсні комплекси свинок культивували в чотирьохлункових планшетах упродовж 45 год. за температури +38,0°C, 5% CO₂ у повітрі, в середовищі 199 з 20% попередньо інактивованою еструсною сироваткою крові корів, 2,0 мМ натрію пірувату, 2,92 мМ кальцію лактату, 40 мкг/мл гентаміцину. Деконсервовані гамети свинок після культивування поза організмом підлягали заплідненню *in vitro*. Для запліднення *in vitro* яйцеклітин свинок використовували нативну сперму кнура (№ 1067). Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J.J. et al. [7]. Після 12–18 год. спільного інкубування 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., забарвлювали 2,0 %-м розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

Результати досліджень. Проведено порівняльний аналіз індивідуальних особливостей ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас в процесі кріоконсервування на життєздатність деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин та розвиток *in vitro* отриманих ембріонів (табл. 1). В дослідженнях використано ооцити від дев'яти свинок

1. Результати запліднення деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок породи ландрас

№ п/п	Варианти дослідів	Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадіях					
			2 клітин		3-4 клітин		5-8 клітин	
			n	%	n	%	n	%
1	Д	43	11	25,6 ^a ± 6,7	7	16,3 ^a ± 5,6	3	7,0 ^a ± 3,9
	К	39	14	35,9 ^a ± 7,7	9	23,1 ^a ± 6,7	5	12,8 ^a ± 5,4
2	Д	48	6	12,5 ^b ± 4,8	3	6,3 ^d ± 3,5	1	2,1 ^b ± 2,1
	К	34	12	35,3 ^c ± 8,2	10	29,4 ^e ± 7,8	5	14,7 ^c ± 6,1
3	Д	40	6	15,0 ^b ± 5,6	4	10,0 ^b ± 4,7	3	7,5 ^a ± 4,2
	К	16	7	43,8 ^c ± 12,4	6	37,5 ^c ± 12,1	4	25,0 ^a ± 10,8
4	Д	33	9	27,3 ^a ± 7,8	5	15,2 ^a ± 6,2	2	6,1 ^a ± 4,2
	К	12	5	41,7 ^a ± 14,2	4	33,3 ^a ± 13,6	2	16,7 ^a ± 10,8
5	Д	42	11	26,2 ^a ± 6,8	6	14,3 ^a ± 5,6	3	7,2 ^a ± 4,0
	К	15	6	40,0 ^a ± 12,6	5	33,3 ^a ± 12,2	3	20,0 ^a ± 10,3
6	Д	26	8	30,8 ^a ± 9,1	4	15,4 ^a ± 7,1	3	11,5 ^a ± 6,3
	К	17	8	47,1 ^a ± 12,1	7	41,2 ^a ± 11,9	4	23,5 ^a ± 10,3
7	Д	50	15	30,0 ^a ± 6,5	12	24,0 ^a ± 6,0	7	14,0 ^a ± 4,9
	К	17	9	52,9 ^a ± 12,1	7	41,2 ^a ± 11,9	5	29,4 ^a ± 11,1
8	Д	52	19	36,5 ^a ± 6,7	14	26,9 ^a ± 6,2	9	17,3 ^a ± 5,2
	К	21	12	57,1 ^a ± 10,8	10	47,6 ^a ± 10,9	7	33,3 ^a ± 10,3
9	Д	57	14	24,6 ^a ± 5,7	11	19,3 ^b ± 5,2	6	10,5 ^b ± 4,1
	К	27	12	44,4 ^a ± 9,6	11	40,7 ^c ± 9,5	8	29,6 ^c ± 8,8

Примітка. b : c – P < 0,05; d : e – P < 0,01; критерій Стьюдента.

породи ландрас. Отримані гамети від кожної свинки розподіляли на 2 групи: дослідну (Д), в якій ооцит-кумулюсні комплекси підлягали кріоконсервуванню та контрольну (К), де ооцит-кумулюсні комплекси свинок не заморожували. За результатами експериментальних досліджень встановлено, що індивідуальні особливості мають вплив на подальший розвиток запліднених *in vitro* деконсервованих і дозрілих поза організмом ооцитів свинок. Так, при заплідненні *in vitro* яйцеклітин свинок породи ландрас і подальшому культивуванні у 22,2 % (2 із 9 випадках) спостерігали статистично вірогідну різницю ($P < 0,05$) між дослідною і контрольною групами через 24 та 72 годин культивування. Через 48 годин культивування ембріонів аналогічну різницю спостерігали у 33,3 % (3 із 9 випадках).

За результатами експериментальних досліджень дроблення загальної кількості ембріонів свиней породи ландрас (рис. 1) встановлено, що розвиток ембріонів, отриманих з деконсервованих і дозрілих поза організмом ооцит-кумулюсних комплексів свинок впливає на подальший розвиток залежно від індивідуальних кріорезистентних особливостей. Встановлено, що запліднення *in vitro* яйцеклітин свинок породи ландрас і подальше 24-годинне культивування призводить до зменшення на 17,6 % ($P < 0,001$) кількості отриманих зародків, порівняно з контрольною групою. При подальшому культивуванні ембріонів від 48 до 72 годин спостерігали аналогічну тенденцію (відповідно 17,9 та 12,3 %).

Таким чином, при вивченні індивідуальних особливостей ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас під час кріоконсервування встановлено різну їх ефективність. За результатами експериментальних досліджень встановлено, що 77,8 % (7 із 9 випадках) дослідних груп не встановлено взаємозв'язку кріорезистентності ооцит-кумулюсних комплексів свинок між дослідною та контрольною групами за таких показників як кількість отриманих зародків. Вивчення життєздатності деконсервованих гамет та подальшого розвитку ембріонів *in vitro* показало, що індивідуальні особливості ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас є фактором, який впливає на результативність кріоконсервування.

Отже, для комплексного використання репродуктивного потенціалу свинок породи ландрас застосовано підходи щодо кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів та перевірена їх здатність до подальшого ембріонального розвитку *in vitro* після деконсервування та осіменіння. Показано, що гамети свинок можна успішно застосовувати для додаткового використання репродуктивного потенціалу самиць сільськогосподарських тварин із застосуванням сучасних біотехнологічних розробок.

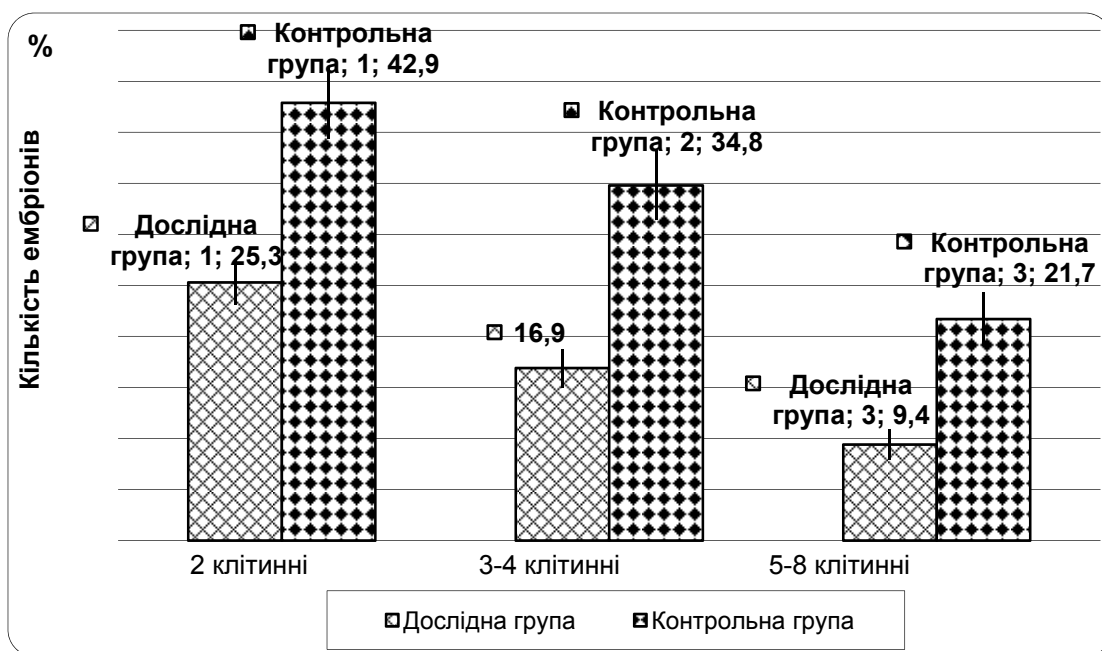


Рис. 1. Результати дроблення загальної кількості ембріонів свиней породи ландрас

Висновки. 1. Для збереження та раціонального використання племінних (генетичних) ресурсів у свинарстві необхідно створювати кріобанки гамет для довгострокового зберігання з метою подальшої реалізації їх для відтворення.

2. Кріорезистентність ооцит-кумулясних комплексів свинок породи ландрас залежить від індивідуальних особливостей життєздатності гамет. Встановлено, що індивідуальне (від кожної тварини окремо) кріоконсервування ооцит-кумулясних комплексів свинок породи ландрас та подальше культивування ембріонів призводить у 22,2 % випадках до відмінностей між дослідною і контрольною групами.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Ковтун, С. І. Нові біотехнологічні методи збереження генетичних ресурсів тварин / С. І. Ковтун // Проблеми збереження генофонду тварин : матеріали творчої дискусії . – К. : Аграрна наука, 2007. – С 44–45.

2. Програма збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року / заг. наук. ред. І. В. Гузєва, консультація та специфікація Ю. Ф. Мельника. – К. : Арістей, 2009. – 132 с.

3. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue / E. J. Woods, J. D. Benson, Y. Agca, J. K. Crister // *Cryobiology*. – 2004. – Vol. 48. – P. 146–156.

4. Галицька, Т. В. Особливості вивчення кріорезистентних властивостей ооцит-кумулясних комплексів свинок різних порід / Т. В. Галицька, П. А. Троцький // Науково-технічний бюлетень. – Львів, 2011. – Вип. 12. – № 1-2. – С. 228–332.

5. Cryopreservation of oocytes and embryos / A. Arav // *Theriogenology*. – 2014. – Vol. 81. – I. 1. – P. 96–102.

6. The evolution of porcine embryo in vitro production / Christopher G. Grupen // *Theriogenology*. – 2014. – Vol. 81. – I. 1. – P. 24–37.

7. 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.

REFERENCES

1. Kovtun, S. I. 2007. Novi biotekhnolohichni metody zberezhenya henetychnykh resursiv tvaryn – New biotechnological methods for preserving animal genetic resources, *Problemy zberezhenja genofondu tvaryn : materialy tvorchoi' dyskusii' – Preservation of the gene pool of animals: Materials creative discussion*. Kyiv, Ahrarna nauka, 44–45 (in Ukrainian).

2. Guzjev, I. V., and Ju. F. Mel'nyk. 2009. *Prohrama zberezhenya henofondu osnovnykh vydiv sil's'kohospodars'kykh tvaryn v Ukrayini na period do 2015 roku – Program preserve the gene pool of the main types of farm animals in Ukraine for the period up to 2015*, zah. nauk. red. I. V. Huzyeva, konsul'tatsiya ta spetsyifikatsiya Yu. F. Mel'nyka – common. Science. ed. I. V. Huzyeva, consultation and specification Yu. F. Melnyk. Kyiv, Aristey, 132 (in Ukrainian).

3. Woods, E. J., J. D. Benson, Y. Agca, and J. K. Crister. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue. *Cryobiology*. 48: 146–156.

4. Halyts'ka, T. V., and P. A. Trots'kyu. 2011. Osoblyvosti vyvchennya kriorezystentnykh vlastyvostey ootsyt-kumulyusnykh kompleksiv svynok riznykh porid – features of study cryoresistives properties are an oocyte-cumulus complexes of piggy-wiggies different breeds, *Naukovo-tekhnichnyy byuletyn' – Scientific and Technical Bulletin*. L'viv, 12 (1,2): 228–332 (in Ukrainian).

5. Arav, A. 2014. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*. 81 (1): 96–102.

6. Christopher, G. Grupen. 2014. The evolution of porcine embryo in vitro production. *Theriogenology*. 81 (1): 24–37.

7. Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish, R. R. Handrow, M. M. Sims, and N. L. First. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 40: 1020–1025.