

## КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ ЯК МЕТОД ЗБЕРЕЖЕННЯ РІЗНОМАНІТТЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

Інтенсифікація селекційного процесу тісно пов'язана з використанням досягнень сучасної біотехнології і генетики та їх безпосереднім включенням у програми вдосконалення існуючих і створення нових порід, типів та ліній сільськогосподарських тварин. Крім цього, використовуючи концептуальні та методичні досягнення сучасної біологічної науки, біотехнологія все більш активніше приймає участь у розв'язанні багатьох фундаментальних проблем. Однією з основних є дослідження функцій геному на ранніх стадіях онтогенезу, аналіз механізмів, що контролюють нормальний та патологічний розвиток організму.

У біотехнології відтворення тварин важливим розділом є науковий напрям, який пов'язаний із кріоконсервуванням генетичного матеріалу у вигляді гамет, ембріонів, ядер та інших клітин і молекул, у яких закладена морфофункціональна інформація про біологічний об'єкт. Україна займає провідне місце в світі в науковому і практичному плані з кріоконсервування чоловічих гамет. Але щодо довготривалого зберігання і використання в практиці тваринництва жіночих статевих клітин наша країна немає значних успіхів. Ця проблема досить складна та вимагає значних економічних, інтелектуальних і практичних затрат. Нині розробка технології кріоконсервування жіночих гамет має для кожної країни пріоритетне значення, оскільки дає змогу зберігати для майбутніх поколінь біологічне різноманіття тваринного світу, інтенсифікувати селекційний процес і використовувати їх в практичній біотехнології відтворення тварин. Досягнуті за останні десятиріччя успіхи в галузі біології розмноження сільськогосподарських тварин значно розширили можливості регулювання відтворювальної функції у тварин біотехнологічними методами, відкрили великі можливості зберігання та практичного використання репродуктивних клітин і ембріонів, залежно від потреб народного господарства.

Метою даної роботи була розробка ефективних умов надшвидкого заморожування ооцит-кумулясних комплексів корів і свинок та оцінка життєздатності деконсервованих ооцитів *in vitro*.

Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулясні комплекси корів і свинок. Такі комплекси отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів яєчників, вимивали середовищем Дюльбекко та оцінювали за морфологічними ознаками. Для заморожування використовували ооцити з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неущождженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом.

Перед заморожуванням гамет корів та свинок обробляли еквілібраційним розчином, а потім переносили у вітрифікаційний розчин. Еквілібраційний (10 % гліцерин + 20 % пропандіол) та вітрифікаційний (25 % гліцерин + 25 % пропандіол) розчини для кріоконсервування ооцит-кумулясних комплексів корів і свинок були приготовлені на середовищі Дюльбекко з додаванням 20 %-ої фетальної сироватки теляти.

Після розморожування гамет виведення кріопротекторів з них проводили шляхом перенесення їх на 10 хв у розчин 1,0 М сахарози. Ооцит-кумулясні комплекси корів культивували протягом 27 год, а свинок – 45 год при температурі +38,5 °С, 5 % CO<sub>2</sub> у повітрі в краплях середовища 199 з 10 %-ою фетальною сироваткою теляти, 2,5 мкг/мл ФСГ, 1,0 мкг/мл естрадіолу, 2,5 МОд/мл лютеїнізуючого гормону, 2,0 мМ натрія пірувату, 2,92 мМ кальція лактату, 40 мкг/мл гентаміцину.

Після дозрівання поза організмом нативні та деконсервовані яйцеклітини корів і свинок підлягали заплідненню *in vitro*. Для запліднення *in vitro* використовували відповідно заморожену сперму бугая і нативну сперму кнура. Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою J. J. Parrish (1989). Спільне інкубування яйцеклітин і сперматозоїдів проводили в термостаті при температурі +38,5 °С, 5 % CO<sub>2</sub> у повітрі, в краплях середовища Fert.-TALP. Після 12–18 год спільного інкубування яйцеклітини і зиготи відмивали від прилиплої сперми і переносили в краплі середовища CDM для подальшого культивування.

На різних етапах культивування ооцити та ембріони підлягали морфологічному і цитогенетичному аналізу. Цитогенетичні препарати готували за методом А. К. Tarcowski (1966) або М. Ushijima (1988), забарвлювали 2,0 %-м розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

У результаті проведених досліджень із використанням сучасної методики кріоконсервування та раціонального використання

ооцит-кумулясних комплексів встановлено життєздатність *in vitro* деконсервованих ооцитів корів і свинок, заморожених надшвидким методом. Отримано до 70 % гамет у корів та до 40 % гамет у свинок, які дозріли поза організмом до метафази-2 мейозу.

Серед сучасних біотехнологічних прийомів маніпуляцій з гаметами сільськогосподарських тварин запліднення *in vitro* попередньо дозрілих поза організмом ооцитів корів та свинок на сьогодні є одним з найбільш перспективних. Успішне запліднення деконсервованих яйцеклітин і подальший розвиток зародків після їх культивування є одним з об'єктивних критеріїв успішного кріоконсервування гамет самиць. Нами встановлено, що запліднення *in vitro* попередньо дозрілих поза організмом деконсервованих яйцеклітин корів і свинок дає можливість отримувати до 34 % зародків великої рогатої худоби та до 23 % зародків свиней.

Наразі ефективність методів кріоконсервування гамет корів і свинок, що ґрунтуються на використанні надвисоких швидкостей заморожування-розморожування та повільних режимів заморожування є неоднаковою. Велика кількість експериментальних робіт із заморожування отриманих *in vivo* і *in vitro* ооцитів, яйцеклітин, зигот і ембріонів проводиться з метою розробки простого і ефективного методу їх збереження. За умови відносної простоти та надійності реалізації цих завдань буде забезпечено подальший прогрес у галузі сучасних біотехнологій відтворення. Розробка методів заморожування ооцит-кумулясних комплексів корів та свинок вимагає ретельного вивчення багатьох чинників, пов'язаних з обробкою гамет еквілібраційним та вітрифікаційним розчинами, заморожуванням-розморожуванням клітин, виведенням з них кріопротекторів. Важливою умовою є вивчення ядерного і цитоплазматичного дозрівання поза організмом заморожено-розморожених ооцитів, розвиток зигот і ембріонів після запліднення *in vitro* деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин корів і свинок.

Наші дослідження показали, що на рівень життєздатності деконсервованих гамет має вплив не тільки технологія глибокого заморожування і розморожування, а й якість і стадія розвитку гамет перед кріоконсервуванням. Наведені результати досліджень показують, що нагромаджений досвід кріобіологічних досліджень із надшвидкого заморожування дає можливість удосконалювати методи заморожування і розморожування, які забезпечують життєздатність гамет корів і свинок без використання дорогої кріобіологічної техніки.

За останнє десятиріччя досягнуто значних успіхів у дозріванні і заплідненні *in vitro* як нативних, так і деконсервованих гамет, отриманих з антральних фолікулів сільськогосподарських тварин, розроблені технології отримання ооцит-кумулясних комплексів з яєчників тварин, умови їх зберігання, культивування і запліднення поза організмом, які дають змогу отримувати значно більшу кількість ембріонів як для наукових, так і для практичних цілей від різних видів тварин із високим генетичним потенціалом. Уже сьогодні створено ембріобанки та необхідно створювати ооцитобанки цінного генетичного матеріалу від високопродуктивних тварин. Це сприятиме значному прискоренню селекційного процесу у тваринництві та дозволить спростити експорт та імпорт генетичного матеріалу.

Вивчення процесів, що відбуваються при заморожуванні біологічних об'єктів, сприяє подальшому розумінню проблем кріобіології. Більше того, поглиблене вивчення механізмів кріопошкодження і кріозахисту клітин дасть змогу знайти нові підходи до успішного заморожування ооцитів, яйцеклітин та ембріонів. Для удосконалення методів кріоконсервування необхідно проводити подальші дослідження, спрямовані на визначення складу і концентрації кріопротекторів у еквілібраційному та вітрифікаційному розчині, одержання технологічних способів реалізації необхідних швидкостей заморожування-розморожування біологічних об'єктів із урахуванням виду тварин і типу клітин.

**УДК 636.22/28.034.061**

**Л. М. ХМЕЛЬНИЧИЙ, Ю. П. ПОЛУПАН**  
*Інститут розведення і генетики тварин НААН України*

### **РЕКОМЕНДАЦІЇ МІЖНАРОДНОГО КОМІТЕТУ З РЕЄСТРАЦІЇ ТВАРИН (ICAR) ЩОДО МЕТОДІВ ОЦІНКИ БУДОВИ ТІЛА МОЛОЧНОЇ ХУДОБИ**

У червні 2006 р. Міжнародним комітетом з реєстрації тварин було оновлено рекомендації призначені стандартизувати методи оцінки будови тіла корів молочної худоби у відповідності до правил та стандартів, установлених кожною світовою (міжнародною) федерацією.

Згідно з рекомендаціями ICAR оцінка бугая проводиться на першій стадії селекції (близько річного віку), якого бажано порівняти з

Розведення і генетика тварин. 2010. № 44 © Л. М. Хмельничий, Ю. П. Полупан, 2010