

ОСОБЛИВОСТІ ВИВЧЕННЯ КРІОРЕЗИСТЕНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ СВИНОК РІЗНИХ ПОРІД

Т. В. Галицька*, П. А. Троцький

Інститут розведення і генетики тварин НААН, с.Чубинське, Україна

У статті наведено результати експериментальних досліджень із кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас та велика біла. Оцінено кріорезистентні властивості гамет і подальший їх розвиток in vitro після деконсервування. Аналіз проведених досліджень засвідчив перевагу використання ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас для кріоконсервування, порівняно з гаметами свинок породи велика біла. Встановлено, що при кріоконсервуванні ооцитів свинок породи ландрас отримано 24,8 % зародків із деконсервованих гамет і лише 14,1 % зародків свиней породи велика біла. Показано, що індекс дроблення ембріонів має свої особливості розподілу при аналізі результатів розвитку їх in vitro.

Заморожування і тривале зберігання біологічних об'єктів необхідно розглядати, перш за все, як спосіб їх введення в тривалий анабіоз, коли життєздатність може бути поновлена після відігріву і повернення їх у фізіологічні умови. З цієї точки зору кріоконсервування яйцеклітин і ембріонів ссавців має значне теоретичне та практичне значення. Оскільки ембріон тварини дає початок життя новому організму після трансплантації реципієнту, глибоке заморожування зародків можна вважати як спосіб тривалого зберігання всього організму в цілому [1–3]. Така унікальна можливість зворотного введення в тривалий анабіоз цілого організму дозволяє вирішувати декілька значних наукових проблем. Це забезпечує збереження гібридних ліній, мутацій і особливі генетичні комбінації, які будуть цінним матеріалом для генетичних досліджень у майбутньому. Через те, що значну кількість зникаючих видів ссавців не вдається зберігати в умовах природних біоценозів, то єдиним можливим варіантом зберегти для людства унікальні генотипи цих тварин є створення банку репродуктивних клітин і зародків [4–6].

Наразі більше уваги приділяється дослідженням, пов'язаним із отриманням *in vitro* ембріонів свиней на основі використання методів культивування, кріоконсервування і запліднення *in vitro* яйцеклітин свинок. Наявність зародків та гамет свиней різних порід, ліній забезпечить планомірність і ефективність пошукових робіт, пов'язаних з біотехнологічними методами відтворення тварин. Крім того, розробка методів отримання, морфологічної оцінки, кріоконсервування, дозрівання і запліднення *in vitro* – це сучасний стратегічний підхід для більш глибокого і ефективного використання потенціального запасу гамет свинок, що закладені в яєчниках і переважна більшість яких протягом життя тварин підлягає атрезії і у відтворенні участі не приймає [7–9].

Метою досліджень було вивчити кріорезистентні властивості ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас і велика біла при кріоконсервуванні на життєздатність і подальший розвиток поза організмом деконсервованих гамет.

Матеріали і методи. Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулюсні комплекси свинок порід велика біла і ландрас. Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко, виловлювали пастерівською піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками. Для заморожування

* Науковий керівник: д-р с.-г. наук, член-кореспондент НААН С. І. Ковтун

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). Група К, в якій ооцит-кумулюсні комплекси свинок не заморожували, була контрольною. Еквілібраційний та вітрифікаційний розчини були приготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20 % сироватки корів, яку попередньо інактивували при +56 °С протягом 30 хв. 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 °С, 5 % CO₂ у повітрі, в краплях середовища 199 з 10 % попередньо інактивованою еструсною сироваткою корів, 2,5 мкг/мл ФСГ, 1,0 мкг/мл естрадіолу, 2,5 МОд/мл лютеїнізуючого гормону, 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 кнурів (Ля1 № 3246, Роял Турк № 143). Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J. J. et al. [10]. 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. [11], забарвлювали 2,0 % розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

Результати та обговорення. Проведені експериментальні дослідження з вивчення кріорезистентних властивостей ооцит-кумулюсних комплексів свинок порід ландрас (вар. А) і велика біла (вар. Б) при кріоконсервуванні (табл.). Для вивчення кріорезистентних властивостей різних порід кожен варіант розподіляли на дві групи: дослідна — в якій ооцит-кумулюсні комплекси підлягали кріоконсервуванню надшвидким методом і контрольна — гамети не заморожували.

Таблиця

Вплив породних особливостей на життєздатність і мейотичне дозрівання деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів свинок

Варіанти дослідів		Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадіях					
			2 клітин		3-4 клітин		5-8 клітин	
			п	%	п	%	п	%
А	Ад	121	30	24,8 ^а ±3,9	18	14,9±3,2	8	6,6±2,3
	Ак	112	48	42,9 ^б ±4,7	35	31,3±4,4	19	16,9±3,5
Б	Бд	135	19	14,1 ^с ±3,0	9	6,7±2,1	4	3,0±1,5
	Бк	83	29	34,9 ^{аб} ±5,2	23	27,7±4,9	10	12,0±3,6

Примітка: у цій таблиці різні суперскріпти вказують на вірогідну різницю між показниками. а : с — P < 0,05; а : б — P < 0,01; б : с — P < 0,001

За результатами експериментальних досліджень встановлено, що кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів свинок різних порід по різному впливає на подальший розвиток запліднених *in vitro* деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин. Так, запліднення *in vitro* яйцеклітин свинок породи ландрас (гр. Ад) і подальше 72-годинне культивування призводить до збільшення на 10,7 % кількості отриманих зародків, порівняно з яйцеклітинами свинок породи велика біла (гр. Бд). У контрольній групі (без

заморожування) показники *in vitro* отримання ембріонів свиней породи ландрас (гр. Ак) та велика біла (гр. Бк) становили відповідно 42,9 і 34,9 %.

Крім показника дроблення зародків після запліднення *in vitro* не меншу інформативність має й індекс дроблення ембріонів (кількість ембріонів на відповідній стадії розвитку від загальної кількості ембріонів). Встановлено, що індекс дроблення 2-клітинних ембріонів (порода ландрас) був вищий у дослідній групі, порівняно з контролем (рис. 1). При подальшому дробленні ембріонів (3–4- та 5–8-клітинні) спостерігали зменшення індексу дроблення ембріонів у дослідній групі та збільшення відповідного індексу в контрольній групі. Аналогічну тенденцію спостерігали при дробленні ембріонів породи велика біла (рис. 2).

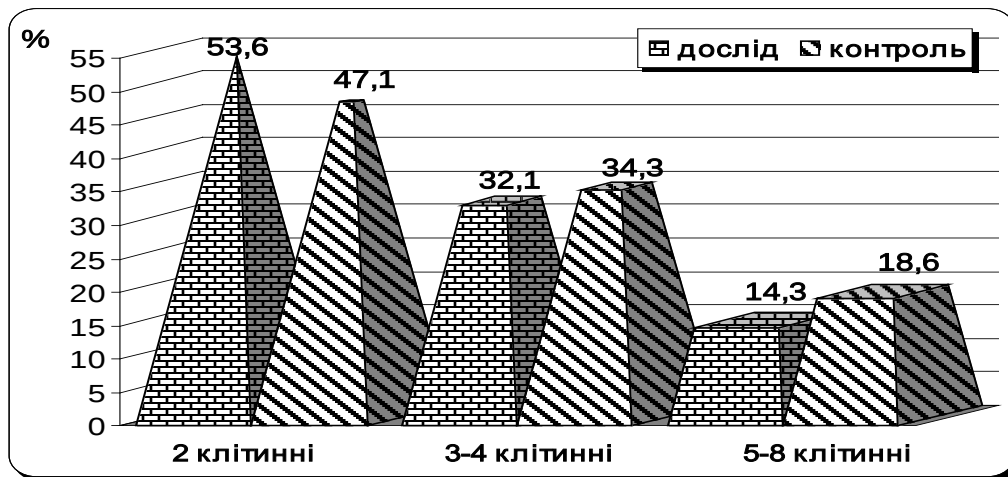


Рис. 1. Індекс дроблення ембріонів свиней отриманих *in vitro* з деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок породи ландрас

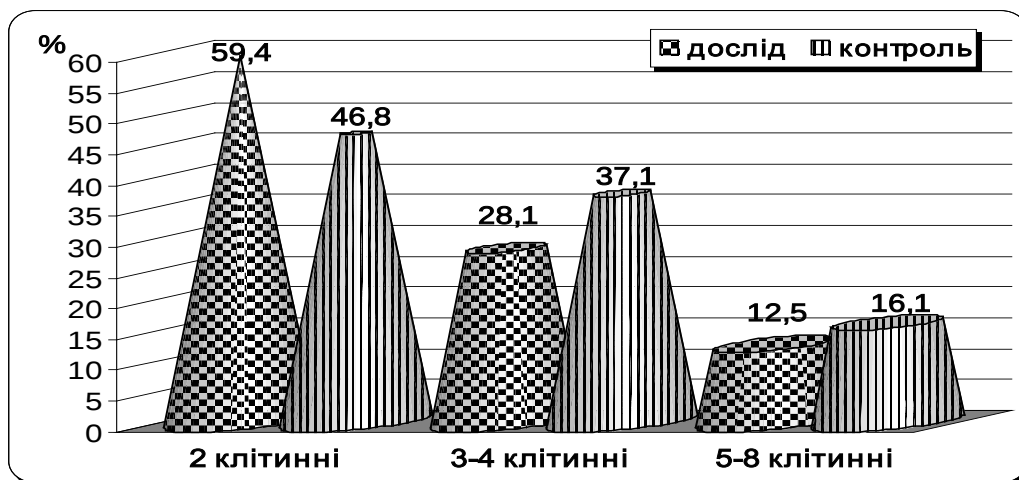


Рис. 2. Індекс дроблення ембріонів свиней отриманих *in vitro* з деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок породи велика біла

Таким чином, результати наших експериментальних досліджень констатують той факт, що при кріоконсервуванні ооцит-кумулюсних комплексів свинок різних порід спостерігали різну їх кріорезистентність. Встановлена перевага використання ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас для кріоконсервування, порівняно з гаметами свинок породи велика біла за таких показників як кількість отриманих зародків з деконсервованих і дозрілих яйцеклітин.

ВИСНОВКИ

Чутливість ооцитів свинок до дії низьких температур залежить від породних особливостей. Використання для заморожування ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас, порівняно з гаметами свинок породи велика біла, призводить до збільшення на 10,7 % кількості отриманих зародків свиней після запліднення *in vitro* деконсервованих і дозрілих яйцеклітин.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому при розробці методів отримання ембріонів із деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок слід враховувати породні особливості.

FEATURES OF STUDY CRYORESISTANT PROPERTIES OF OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES OF DIFFERENT BREEDS PIGGY-WIGGIES

T. V. Galicka, P. A. Trotskiy

Institute of Animal Breeding and Genetics of NAAS, Chubynske

S U M M A R Y

In the article results of experimental researches are resulted from cryopreservation oocyte-cumulus complexes of piggy-wiggies breed landrace and large white pigs. Appraised cryoresistant properties of gametes and their subsequent development *in vitro* after frozen-thawed. The analysis of conducted researches witnessed advantage of application of oocyte-cumulus complexes of piggy-wiggies breed landrace for cryopreservation comparatively with gametes of piggy-wiggies breed large white. It is set that at cryopreservation oocytes of piggy-wiggies breed landrace it was obtained 24,8 % embryos from frozen-thawed gamete and only 14,1 % embryos of pigs breed large white. It is rotined that the index of crushing embryos has the features of distributing at the analysis results development of them *in vitro*.

ОСОБЕННОСТИ ИЗУЧЕНИЯ КРИОРЕЗИСТЕНТНЫХ СВОЙСТВ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ СВИНОК РАЗНЫХ ПОРОД

Т. В. Галицкая, П. А. Троцкий

Институт разведения и генетики животных НААН, с. Чубинское

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье приведены результаты экспериментальных исследований криоконсервирования ооцит-кумулюсных комплексов свинок породы ландрас и большая белая. Оценены криорезистентные свойства гамет и последующее их развитие *in vitro* после деконсервирования. Анализ проведенных исследований подтвердил преимущество использования ооцит-кумулюсных комплексов свинок породы ландрас для криоконсервирования по сравнению с гаметами свинок породы большая белая. Установлено, что при криоконсервировании ооцитов свинок породы ландрас получено 24,8 % зародышей из деконсервованных гамет и только 14,1 % зародышей свиней породы большая белая. Показано, что индекс дробления эмбрионов имеет свои особенности распределения при анализе результатов развития их *in vitro*.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Betteridge K. J.* Farm animal embryo technologies : Achievement and perspectives / K. J. Betteridge // *Theriogenology*. — 2006. — Vol. 65, I. 5. — P. 905–913.
2. *Seidel G. E.* Modifyng oocytes and embryos to improve their cryopreservation / G. E. Seidel, Jr. // *Theriogenology*. — 2006. — Vol. 65, I. 1. — P. 228–235.
3. *Vajta G.* Improving cryopreservation systems / G. Vajta, M. Kuwayama // *Theriogenology*. — 2006. — Vol. 65, I. 1. — P. 236–244.
4. *Bazer F. W.* Reproductive biology in the era of genomics biology / F. W. Bazer, T. E. Spencer // *Theriogenology*. — 2005. — Vol. 64, I. 3. — P. 442–456.
5. *Горбунов Л. В.* Криоконсервация половых клеток и эмбрионов животных / Л. В. Горбунов, Л. П. Бучацкий. — К. : Издательско-полиграфический центр «Киевский университет», 2005. — 325 с.
6. *Woods E. J.* 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.
7. *Яблонський В. А.* Біотехнологія відтворення тварин : підручник / В. А. Яблонський. — К. : Арістей, 2005. — 296 с.
8. *Gilchrist R. B.* Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro / R. B. Gilchrist, J. G. Thompson // *Theriogenology*. — 2007. — Vol. 67, I. 1. — P. 6–15.
9. *Gardner D. K.* Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures / D. K. Gardner, C. B. Sheehan, L. Rienzi et al. // *Theriogenology*. — 2007. — Vol. 67, I. 1. — P. 64–72.
10. *Parrish J. J.* Capacitation of bovine spermatozoa by ovidact fluid / J. J. Parrish, J. L. Susko-Parrish, R. R. Handron et al. // *Biol.Reprod.* — 1989. — V. 40. — P. 1020–1025.
11. *Ushijima M.* Relationship between the cell number and Quality of Day-8 bovine blastocysts / M. Ushijima, M. Okuda, T. Nakajama et al. // *Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans.* — 1988. — № 9. — P. 37–38.

Рецензент — кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії біотехнології Л. І. Остаповець, ІРГТ НААН.