

ТРОЦЬКИЙ П. А.[✉], ЩЕРБАК О. В., КОВТУН С. І.

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

Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н, с. Чубинське, вул. Погребняка, 1

[✉] trotskiy_pa@ukr.net

ЗАСТОСУВАННЯ НАНОМАТЕРІАЛУ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO* ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Мета. Оцінити ефективність застосування наноматеріалу в середовищі для подальшого розвитку *in vitro* ембріонів великої рогатої худоби. Ембріони були отримані з деконсервованих ооцитів, які є складовими біоматеріалу в системі збереження генетичних ресурсів тварин на клітинному рівні. **Методи.** Під час проведення досліджень були використані біотехнологічні, кріобіологічні, морфологічні та цитогенетичні методи, а також методи статистичної обробки даних. **Результати.** Ооцит-кумулюсні комплекси (ОКК) корів розділяли на чотири групи: три дослідні, в яких культивування проводили в середовищі, що містило 0,1, 0,01 та 0,001 % ВДК / сахарози та контрольну – без додавання нанобіоматеріалу. В разі запліднення *in vitro* попередньо дозрілих поза організмом деконсервованих яйцеклітин корів та подальшого культивування ембріонів у середовищі з додаванням 0,001 % наноматеріалу, синтезованого на основі високодисперсного кремнезему і сахарози (ВДК / сахароза), одержано більшу кількість сформованих ембріонів (34,6 %) порівняно з додаванням 0,1 % (12,5 %), 0,01 % (17,9 %) та з контрольною групою (21,5 %). Встановлено, що коефіцієнт дроблення 2-клітинних ембріонів зменшувався від 65,0 % до 39,8 % із зменшенням концентрації ВДК / сахароза від 0,1 до 0,001 %. Найбільш стабільні показники індексу дроблення від 78,4 до 50,0 % спостерігали на четверту добу культивування ембріонів у дослідній групі з 0,001 % ВДК / сахароза. **Висновки.** Зменшення концентрації ВДК / сахароза з 0,1 % до 0,01 % у складі середовища для *in vitro* культивування ембріонів призводить до збільшення відповідно на 22,1 % і 16,7 % кількості отриманих зародків порівняно з 0,001 % (34,6 % роздроблених ембріонів).

Ключові слова: ооцит-кумулюсний комплекс, кріоконсервація, деконсервація, наноматеріал, дозрівання *in vitro*, ембріон.

Біотехнологічні методи відтворення сільськогосподарських тварин слід розглядати як методи отримання статевих клітин, ембріонів, удосконалення та розроблення нових способів кріоконсервації та тривалого зберігання клітин ссавців. Особливо важлива роль кріоконсервації та тривалого зберігання гамет самиць і ембріонів під час створення та вдосконалення цінних у селекційному плані фенотипів та отримання нових генотипів сільськогосподарських тварин. Метод кріоконсервації разом із методикою культивування та запліднення *in vitro* гамет самиць вже сьогодні є базовим під час отримання в достатній кількості необхідного матеріалу, а саме ооцитів на різних стадіях їх мейотичного дозрівання, зигот, зародків на різних стадіях їх розвитку, та використання його для розмноження тварин. Тому зусилля вчених зосереджені на розробці надійного методу – кріоконсервація та раціональному використанні гамет тварин, що зберігаються в кріобанках [1–3].

Вітрифікація – один із простих методів заморожування статевих клітин, під час якого клітини піддаються підвищеним концентраціям кріопротекторів, і кріоконсервація проходить з утворенням твердої склоподібної структури, що не містить кристалів льоду. За останнє десятиліття методи кріоконсервації постійно удосконалюються для досягнення більш стабільних показників. Було вивчено проникність клітин до різних кріопротекторів; захисні сполуки стали більш ефективні та менш токсичні; відбулися значні удосконалення кріоконтейнерів для кріоконсервації статевих клітин. Незважаючи на це, все ще існують проблеми, які потребують практичних рішень щодо кріопошкодження та розвитку деконсервованих гамет [4–6].

Метою досліджень було оцінити ефективність застосування наноматеріалу в середовищі для подальшого розвитку зародків *in vitro*, отриманих із деконсервованих ооцитів, в систе-

мі збереження генетичних ресурсів тварин на клітинному рівні.

Матеріали і методи

Дослідження проведено в лабораторії біотехнології відтворення Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН. Дослідний зразок ВДК / сахароза синтезовано в Інституті хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України.

Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулясні комплекси (ОКК) корів. Їх отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко (Sigma, D 5773), виловлювали та оцінювали за морфологічними ознаками під мікроскопом. Для заморожування використовували ОКК зі щільним або частково розпушеним кумулюсом, з ооцитами, що мали гомогенну тонкозернисту ооплазму та неушкоджену прозору оболонку. Перед заморожуванням ОКК обробляли еквілібраційним розчином (10 хв), потім їх переносили у вітрифікаційний розчин (30 с). Еквілібраційний та вітрифікаційний розчини були приготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко (Sigma, D 5773) з додаванням 20 % сироватки крові корів, яку попередньо інактивували за 56 °С упродовж 30 хвилин. Виведення кріопротекторів після розморожування ОКК проводили шляхом перенесення їх на 10 хвилин у розчин 1,0 М сахарози. Потім ОКК тричі відмивали середовищем 199, оцінювали за морфологічними ознаками і переносили в середовище для дозрівання. У ньому ОКК культивували в чотирьохлункових планшетах протягом 27 годин за температури 38,5 °С в атмосфері з 5 % CO₂ у повітрі в краплях середовища 199 з 20 % попередньо інактивованою еструсною сироваткою крові корів, 2,0 мМ натрію пірувату, 2,92 мМ кальцію лактату, 40 мкг/мл гентаміцину.

Нативні (контрольна група) та деконсервовані ОКК після дозрівання поза організмом підлягали заплідненню *in vitro*. Для запліднення яйцеклітин *in vitro* використовували заморожено-розморожену сперму бугая. Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J. J. та ін. [9]. Спільне інкубування яйцеклітин і сперматозоїдів проводили в термостаті за температури 38,5 °С в атмосфері 5 % CO₂ в повітрі в краплях середовища Fert.-TALP. Після 12–18 годин спі-

льного інкубування сперматозоїдів та яйцеклітин можливі зиготи відмивали від сперматозоїдів, що прилипли до прозорої оболонки, і переносили в середовище CDM для подальшого культивування. Цитогенетичні препарати зародків, отриманих після запліднення яйцеклітин *in vitro*, готували за методом Ushijima M. та ін. [10]. Статистичну обробку даних проводили за Лакіним Г. Ф. [11] із використанням критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Проведено порівняльний аналіз різних концентрацій ВДК / сахароза (0,1 %, 0,01 %, та 0,001 %) в культуральному середовищі на формування та подальший розвиток ембріонів великої рогатої худоби. Після запліднення зиготи розподіляли на чотири групи: група А з 0,1 % ВДК / сахароза; група Б з 0,01 %; група В з 0,001 %; група К – контрольна, без додавання ВДК / сахароза. ВДК / сахароза додавали в середовище CDM для подальшого культивування ембріонів (табл.).

За результатами експериментальних досліджень встановлено, що додавання ВДК / сахароза в середовище для культивування ембріонів впливає на рівень формування ембріонів *in vitro* (дроблення ембріонів). У разі запліднення *in vitro* попередньо дозрілих поза організмом деконсервованих яйцеклітин корів та подальшого культивування ембріонів у середовищі з додаванням 0,001 % ВДК / сахароза встановлено збільшення кількості отриманих ембріонів на 16,7 % та на 22,1 % порівняно з додаванням 0,01 % та 0,1 %, відповідно. Також на 13,1 % більше сформувалося ембріонів із додаванням 0,001 % ВДК / сахароза, порівняно з контрольною групою (табл.).

Таким чином, під час вивчення впливу різних концентрацій ВДК / сахароза на життєздатність та подальший *in vitro* розвиток ембріонів великої рогатої худоби виявлено різну їх ефективність. Встановлена перевага використання 0,001 % ВДК / сахароза, порівняно з 0,1 % та 0,01 % в культуральному середовищі за кількістю роздроблених ембріонів.

Крім показника дроблення ембріонів після запліднення *in vitro*, не меншу інформативність має коефіцієнт дроблення ембріонів – кількість ембріонів на відповідній стадії розвитку від загальної кількості ембріонів (рис. 1).

Таблиця. Результати культивування *in vitro* ембріонів із додаванням наноматеріалу ВДК / сахароза

Варіанти досліджу	Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадіях							
		2 клітин		3-4 клітин		5-8 клітин		9-16 клітин	
		n	%	n	%	n	%	n	%
А 0,1%	104	13	12,5 ^a ±3,2	5	4,8 ^e ±2,1	2	1,9 ^h ±1,3	0	0,0 ^k ±0,0
Б 0,01%	117	21	17,9 ^{ac} ±3,5	11	9,4 ^{ge} ±2,7	4	3,4 ^h ±1,7	3	2,6 ^{lk} ±1,5
В 0,001%	107	37	34,6 ^b ±4,6	29	27,1 ^f ±4,3	18	16,8 ⁱ ±3,6	9	8,4 ^l ±2,7
К	93	20	21,5 ^{ad} ±4,2	17	18,3 ^{fg} ±4,0	10	10,8 ^{ij} ±3,2	6	6,5 ^{lm} ±2,5

Примітки: b : d, h : j, k : m P<0,05; b : c, e : g, k : l P<0,01; a : b, e : f, h : i P<0,001, критерій Стьюдента. В цій таблиці різні суперскрипти вказують на вірогідну різницю між показниками.

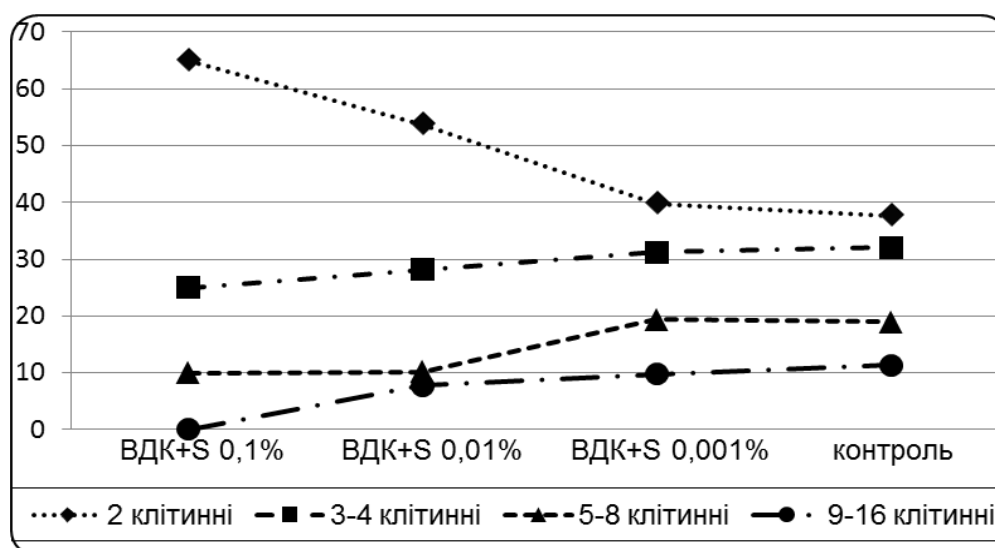


Рис. 1. Коефіцієнт дроблення *in vitro* ембріонів у середовищі з ВДК / сахароза, отриманих із деконсервованих і прокультивованих яйцеклітин корів.

Встановлено, що коефіцієнт дроблення 2-клітинних ембріонів зменшувався від 65,0 до 39,8 % із зменшенням концентрації ВДК / сахароза від 0,1 % до 0,001 %. Через 48 годин культивування спостерігали зворотний ефект: із зменшенням концентрації ВДК / сахароза коефіцієнт дроблення дещо збільшувався і був від 25,0 % до 31,2 %. На третю добу культивування ембріонів спостерігали майже удвічі вищий коефіцієнт дроблення в групі В порівняно з іншими дослідними групами А та Б. Подальше культивування ембріонів до 96 год призводить до загального зменшення коефіцієнта дроблення в дослідних групах Б і В (відповідно 7,7 % і 9,7 %) та до 0,0 % в групі А.

Встановлено, що індекс дроблення (співвідношення кількості ембріонів певної стадії до

наступної стадії їх розвитку) ембріонів у разі використання ВДК / сахароза, отриманих *in vitro* із деконсервованих і прокультивованих яйцеклітин корів, мав значні коливання під час дроблення ембріонів (рис. 2).

Аналізуючи подальше дроблення ембріонів, отриманих *in vitro* в разі використання 0,1 % ВДК / сахароза (група А), встановлено значні коливання індексу дроблення від 40,0 до 0,0 %. У разі використання 0,01 % ВДК / сахароза (група Б) спостерігали спочатку зменшення індексу дроблення з 52,4 до 36,4 %, а потім різке збільшення до 75,0 %. Найбільш стабільні показники індексу дроблення від 78,4 до 50,0 % спостерігали на четверту добу культивування ембріонів у дослідній групі В.

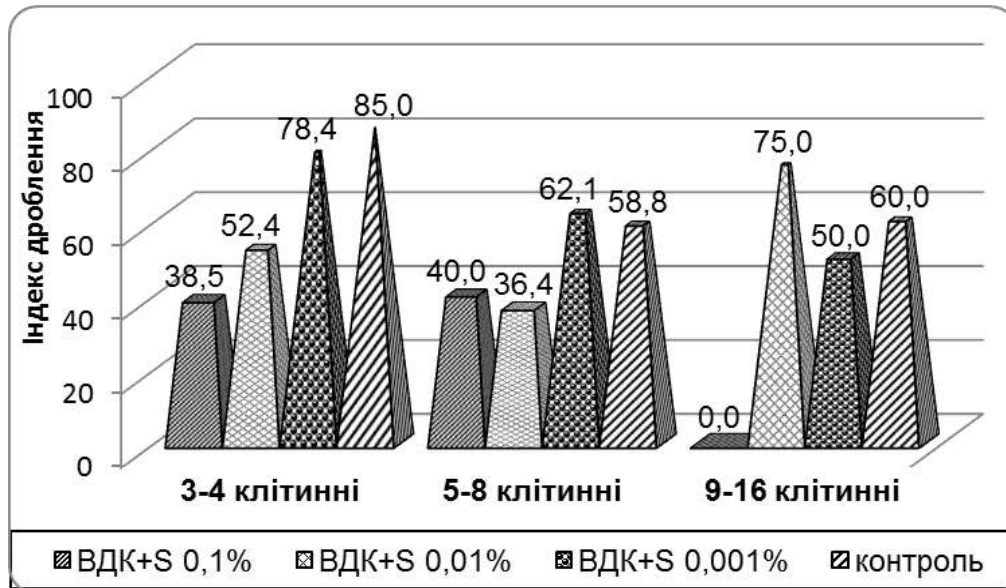


Рис. 2. Індекс дроблення *in vitro* ембріонів у середовищі з ВДК / сахарозою, отриманих із деконсервованих і прокультивованих яйцеклітин корів.

Таким чином, на основі високодисперсного кремнезему (ВДК) можна створювати речовини з програмованим вивільненням іммобілізованих на його поверхні синтетичних або природних сполук. Вибір біомолекул із вуглеводами під час створення наноматеріалів зумовлений різноманітністю їх функцій. Створення наноматеріалів на основі ВДК з адсорбованою на його поверхні сахарозою впливає на біологічну активність отриманих композитів у системі репродуктивних технологій. Додавання наноматеріалів до середовищ для культивування *in vitro* ембріонів сільськогосподарських тварин сприяє цілеспрямованій стимуляції біологічних процесів у клітинах та ефективному подальшому ембріогенезу.

Отже, з'ясовано ефективність використання ВДК / сахароза в середовищі для культивування ембріонів, отриманих із деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів корів. Встановлено, що використання 0,001 % концентрації ВДК / сахароза в разі культивування ембріонів

приводить до збільшення загальної кількості отриманих життєздатних зародків та подальшого розвитку ембріонів *in vitro*.

Висновки

Вивчено вплив додавання різних концентрацій ВДК / сахароза до середовища для культивування ембріонів великої рогатої худоби на ефективність формування та подальший розвиток в умовах *in vitro*.

Встановлено, що найбільший позитивний вплив на розвиток ембріонів поза організмом мало додавання 0,001 % ВДК / сахароза до середовища для культивування, що сприяло підвищенню рівня розвитку ембріонів до більш просунутих стадій розвитку до 16,8 %.

Зменшення концентрації ВДК / сахароза з 0,1 % до 0,01 % у складі середовища для *in vitro* культивування ембріонів призводить до зменшення відповідно на 22,1 % і 16,7 % кількості отриманих зародків (порівняно з 0,001 %).

References

1. Prentice J.R., Anzar M. Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. *Veterinary Medicine International*. 2010. Vol. 2011. 11 p. doi: 10.4061/2011/146405
2. Hwang I.S., Hochi S. Recent progress in cryopreservation of bovine oocytes. *BioMed Research International*. Published online 2014. doi: 10.1155/2014/570647
3. Dujičková L., Makarevich A. V., Olexiková L., Kubovičová E., Strejček F. Methodological approaches for vitrification of bovine oocytes. *Zygote*. Published online by Cambridge University Press. 2020. Vol. 29, Iss. 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0967199420000465>
4. Zhenguang Huang, Lei Gao, Yunpeng Hou, Shien Zhu, Xiangwei Fu. Cryopreservation of farm animal gametes and embryos: recent updates and progress. *Front. Agr. Sci. Eng.* 2019, Vol. 6, Iss. 1. P. 42–53. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2018231>

5. Trotskiy P.A. Cryopreservation of oocyte-cumulus complexes of cows with different bioactive substances. *Animal Breeding and Genetics*. 2016. Iss. 51. P. 255–260. <https://doi.org/10.31073/abg.51.34>
6. Punyawai K., Anakkul N., Srirattana K., Aikawa Y., Sangsritavong S., Nagai T., Parnpai R. Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. *Journal of Reproduction and Development*. 2015. Vol. 61, Iss. 5. P. 431–437. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-163>
7. Chaves D.F., Corbin E., Almanana C., Locatelli Y., Souza-Fabjan M.G., Bhat M.H., Freitas V.J.F., Mermillod P. Vitrification of immature and in vitro matured bovine cumulus–oocyte complexes: Effects on oocyte structure and embryo development. *Livestock Science*. 2017. Vol. 199. P. 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.02.022>
8. Abdel-Gawad E.M.M., Abdel-Halim B.R., Helmy N.A., Badr A.F.. Effect of cryoprotective solutions, Ethylene Glycol, Dimethyle-sulfoxide and Ficoll 70 with different combination ratios on vitrification of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2016 Vol. 11, Iss. 10. P. 608–619. doi: 10.3923/ajava.2016.608.619
9. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Handrow R.R. Sims M.M., First N.L. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod*. 1989. Vol 40, Iss. 5. P. 1020–1025.
10. Ushijima M., Okuda M., Nakajama T. et al. Relationship between the cell number and Quality of Day-8 bovine blastocysts. *Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans*. 1988. № 9. P. 37–38.
11. Lakin G.F. *Biometriya*. Moskva: Vysshaya shkola, 1990. 351 s. [in Russian]

TROTSKYI P.A., SHCHERBAK O.V., KOVTUN S.I.

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Ukraine, 08321, Kyiv region, Boryspil district, Chubynske village, Pohrebniaka str., 1

APPLICATION OF NANOMATERIAL FOR MATURATION *IN VITRO* OF CATTLE EMBRYOS

Aim. To evaluate the effectiveness of the use of nanomaterial in the environment for the further development of *in vitro* embryos derived from frozen-thawed oocytes in the system of conservation of genetic resources of animals at the cellular level. **Methods.** Biotechnological, cryobiological, morphological, cytogenetic, and statistical methods, as well as methods of statistical data processing were used in the research. **Results.** Oocyte-cumulus complexes (OCC) of cows were divided into four groups: three experimental, in which the maturation was performed in a medium containing 0.1, 0.01 and 0.001% UFS/sucrose and control - without the addition of nanobiomaterial. *In vitro* fertilization of pre-mature frozen-thawed ova of cows and subsequent maturation of embryos in the medium with the addition of UFS/sucrose (0.001%) showed an increase in the number of embryos by 16.7–22.1% compared with the addition of 0.1; 0.01% and 13.1% compared to the control group. It was found that the fragmentation rate of 2-cell cattle embryos decreased from 65.0 to 39.8% with a decrease in the concentration of UFS/sucrose from 0.1 to 0.001%. The most stable indicators of the fragmentation index from 78.4 to 50.0% were observed on the fourth day of embryo cultivation in experimental group B. **Conclusions.** Reducing the concentration of UFS/sucrose from 0.1 to 0.001% in the composition of the medium for *in vitro* maturation of cattle embryos leads to an increase of 16.7–22.1% in the number of embryos obtained.

Keywords: oocyte-cumulus complex, cryopreservation, nanomaterial, *in vitro* maturation, embryo.