

ЩЕРБАК О.В.¹, ЗЮЗЮН А.Б.¹, ОСИПЧУК О.С.², КОВТУН С.І.¹, ГАЛАГАН Н.П.^{3✉}, ТРОЦЬКИЙ П.А.¹

¹ Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця Національної академії аграрних наук України, Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1, e-mail: aza.zuzyun@yandex.ua

² ТОВ «Біофарма-Інвест», Україна, 09100, Київська область, м. Біла Церква, вул. Київська, 37, e-mail: Osipchuksasha@gmail.com

³ Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України, Україна, 03164, м. Київ, вул. Генерала Наумова, 17, e-mail: nataliyagalagan@gmail.com

✉ nataliyagalagan@gmail.com

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ НАНОМАТЕРІАЛУ В УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ТА ООЦИТІВ СВИНЕЙ *IN VITRO*

Надійним засобом використання потенційного запасу репродуктивних клітин тварин є культивування в умовах *in vitro* незрілих ооцитів, вилучених із яєчників забитих тварин. Підвищити ефективність збереження гамет та отримання *in vitro* повноцінних ембріонів можна за рахунок оптимізації середовищ для культивування та кріоконсервації гамет із використанням певних речовин. Так, наночастинки активно використовують при діагностиці хронічних хвороб, для пригнічення бактеріальних інфекцій, як агенти доставки лікарських засобів та цільових молекул. Для удосконалення середовищ культивування ооцитів та ембріонів поза організмом заслугове на увагу високодисперсний кремнезем (ВДК), що застосовується як складова різних лікарських засобів.

ВДК є перспективним носієм для іммобілізації багатьох синтетичних і природних сполук, що дозволяє на його основі створювати біологічно активні наноконструкції для біотехнології. Велика питома поверхня ВДК ($S_{\text{m}} = 300 \text{ м}^2/\text{г}$) зумовлена малим розміром (4–40 нм) його первинних частинок [1, 2]. Вона визначає високу адсорбційну здатність ВДК при зв'язуванні багатьох речовин, у тому числі і біомолекул. Центрами адсорбції на поверхні ВДК служать силанольні групи (Ні-ОН). Саме гідроксильний покрив зумовлює значну гідрофільність поверхні ВДК і здатність адсорбувати полярні молекули [3, 2]. ВДК широко відомий як допоміжний матеріал при виготовленні багатьох лікарських засобів [4–6]. Доведено, що додавання ВДК до суспензій клітин (дріжджі, гамети, еритроцити) в низьких концентраціях сприяє підвищенню їх життєздатності. Іммобілізація на його поверхні таких біомолекул, як білки (БСА) і вуглеводи,

здатна підсилювати цей ефект [7, 8].

У наших дослідженнях використано наноматеріал на основі ВДК, поверхня якого модифікована альбуміном сироватки крові великої рогатої худоби (БСА) та аміновмісним вуглеводом – N-ацетилнейрамінова кислота (N-АНК). Вона є термінальним фрагментом рецепторів клітин, що значною мірою відповідає за величину їх від'ємного заряду, який корелює зі ступенем життєздатності клітин [9, 10]. Такий наноматеріал ми назвали ВДК/БСА/N-АНК.

Мета досліджень – оцінити біологічну активність наноматеріалу ВДК/БСА/N-АНК за умов культивування з різними його концентраціями із сперматозоїдами та ооцитулюючими комплексами свиней *in vitro*.

Матеріали і методи

Дослідження проведено в лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН, дослідний зразок ВДК/БСА/N-АНК синтезовано в Інституті хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України.

Для оцінки біологічної активності в експериментах застосовувалися кріоконсервовані еякульовані сперматозоїди (рис. 1) 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 0,1, 0,01 і 0,001 % ВДК/БСА/N-АНК (дослідні групи). Дію наноматеріалу на сперматозоїди оцінювали за зміною їх активності у відсотках (кожного кнура окремо) з наступним встановленням середнього показника у контролі (без додавання ВДК/БСА/N-АНК до розморо-

жених сперматозоїдів) і у дослідних групах.

Ооцит-кумулюсні комплекси (ОКК) (рис. 2) отримували із яєчників забитих клінічно здорових свинок віком 6–8,5 міс. ОКК вилучали шляхом розсічення стінок антральних фолікулів. Відібрані ооцити ($n=155$) дозрівали *in vitro* упродовж 46 годин у середовищі ТСМ 199 (Sigma, M-5017) з 20 % еструсної сироватки крові корів і $3\text{--}5 \times 10^6$ клітин гранульози/мл. Для культивування поза організмом відбирали ооцити із щільним та розпушеним кумулюсом [11, 12]. Гамети культивували за температури $+38,8^\circ\text{C}$ і 4 % CO_2 у повітрі. Вилучені ОКК свиней розділяли на три групи: дві дослідні, в яких

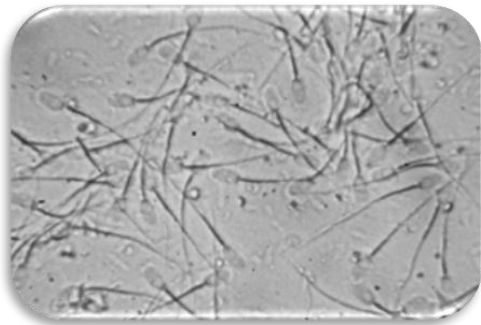


Рис. 1. Деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура.

культивування проводили в середовищі, що містило 0,1 та 0,001 % наноматеріалу ВДК/БСА/Н-АНК і контрольну, в якій культивування ОКК проводили без додавання наноматеріалу. Критерієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільця. Рівень дозрівання ооцитів *in vitro* вивчали шляхом аналізу цитогенетичних препаратів, які готували за модифікованим методом А. Тарковського [13, 14]. Препарати фарбували 2 %-ним розчином барвника Гімза й аналізували під світловим мікроскопом Jenaval, Carl Zeiss $\text{ок}\times 10$, $\text{об}\times 100$. Статистичну обробку одержаних даних проводили з використанням критерію Стьюдента.



Рис. 2. ОКК, вилучені із яєчників свинок.

Результати та обговорення

Вплив на життєздатність гамет трьох концентрацій (0,1; 0,01; 0,001 %) ВДК/БСА/Н-АНК оцінювали за активністю сперматозоїдів у відсотках. Встановлено, що свіжоодержані сперматозоїди кнурів у середньому проявляли активність на рівні $81,7\% \pm 1,66$ (рис. 3). Цей показник одержано в результаті встановлення індивідуальної активності сперматозоїдів кожного кнура (відповідно, Дніпро 641 – 85,0 %; Комиш 853 – 80,0 %; Коханий 289 – 80,0 %).

Розморожені сперматозоїди кнурів проявляли в середньому активність на рівні $16,7\% \pm 3,3$ (відповідно, Дніпро 641 – 20,0 %; Комиш 853 – 20,0 %; Коханий 289 – 10,0 %). Слід відмітити, що середня активність кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів знизилася на 79,6 %. Аналіз життєздатності сперматозоїдів після розморожування показав, що їх виживаність у середньому становила 4,5 години (відповідно, Дніпро 641 – 5,0 годин; Комиш 853 – 4,5 години; Коханий 289 – 4,0 години).

Показник середнього значення активності на рівні 16,7 % у контролі зберігався упродовж 90 хв (відповідно, Дніпро 641 – 20,0 %; Комиш 853 – 20,0 %; Коханий 289 – 10,0 %). У дослідних групах через 30 хв. найбільш активними у середньому були гамети (рис. 4), які перебували з 0,001 % ВДК/БСА/Н-АНК ($30,0\% \pm 1,73$; відповідно, Дніпро 641 – 33,0 %; Комиш 853 – 30,0 %; Коханий 289 – 27,0 %).

Найнижчу середню активність $12,0\% \pm 1,67$ через 30 хв, порівняно з 0,001 %-ою та 0,01 %-ою ВДК/БСА/Н-АНК, мали сперматозоїди, які перебували із 0,1 %-ою концентрацією наноматеріалу (Дніпро 641 – 15,0 %; Комиш 853 – 10,5 %; Коханий 289 – 10,0 %). Їх активність у середньому знизилася на 18 %, порівняно із 0,001 %-ою та на 11 % порівняно з 0,01 %-ою концентрацією наноматеріалу ($23,0\% \pm 3,38$). Вказана вище активність сперматозоїдів з 0,01 % ВДК/БСА/Н-АНК у середньому встановлена за відповідних індивідуальних показників кожного кнура (відповідно, Дніпро 641 –

27,5 %; Комиш 853 – 25,0 %; Коханий 289 – 16,5 %)

Отже, при вивченні впливу різних концентрацій ВДК/БСА/N-АНК на життєздатність гамет кнурів найбільш активними виявилися сперматозоїди за додавання 0,001 %-ої концентрації ВДК/БСА/N-АНК, яка забезпечила зростання їх активності на 13,3 %. Показано, що недоцільно додавати 0,1 %-ву концентрацію ВДК/БСА/N-АНК до розморожених сперматозоїдів кнурів, оскільки помічено суттєве зниження їх активності. Це вказує на те, що така концентрація наноматеріалу є високою, при цьому від-

бувається швидке насичення рецепторів клітинної поверхні сперматозоїдів цим наноматеріалом, що призводить до зниження їх активності.

Наступним етапом наших досліджень був аналіз впливу двох концентрацій (0,1 % та 0,001 %) наноматеріалу ВДК/БСА/N-АНК на ефективність мейотичних перетворень ооцитів свиней.

За результатами морфологічної та цитогенетичної оцінки встановлено (табл.), що 58,5 % ооцитів свиней відновили мейотичне дозрівання і досягли стадії метафази II мейозу в контрольній групі без додавання наноматеріалу.



Рис. 3. Життєздатність еякульованих сперматозоїдів кнурів.

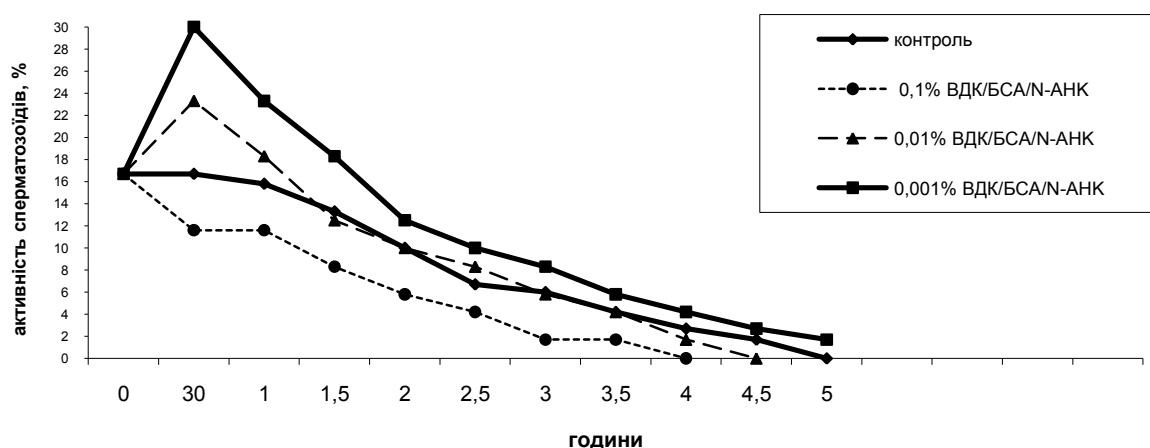


Рис. 4. Вплив ВДК/БСА/N-АНК на життєздатність деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів.

Таблиця. Вплив ВДК/БСА/N-АНК на ефективність мейотичних перетворень ооцитів свиней *in vitro*

Концентрація добавки у середовищі, %	Усього ооцитів	Стадії розвитку ОКК <i>in vitro</i>		Кількість ооцитів з дегенерованим хроматитном, n (%)
		диплотена, n (%)	метафаза II, n (%)	
контроль	53	15 ^a (28,3±6,2)	31 ^d (58,5±6,8)	7 ^g (13,2±4,6)
0,1	47	5 ^b (10,6±4,5)	37 ^c (78,7±5,9)	5 ^g (10,6±4,5)
0,001	55	16 ^{ac} (29,0±6,1)	33 ^{df} (60,0±6,6)	6 ^g (10,9±4,2)

Примітки: a:b; b:c; d:e; e:f – p < 0,05 критерій Стьюдента. Різні суперскрипти у межах однієї колонки вказують на вірогідну різницю між показниками.

Додавання 0,1 %-вої концентрації ВДК/БСА/N-АНК в середовище культивування *in vitro* ооцитів свиней забезпечувало формування дозрілих яйцеклітин на суттєво вищому рівні (на 20,2 %), порівняно із контролем та на 18,7 % вище в разі додавання 0,001 %-вої концентрації ВДК/БСА/N-АНК.

Встановлено вірогідну різницю між досліджуваними групами (p < 0,05, критерій Стьюдента) та відзначено позитивний вплив ВДК/БСА/N-АНК в концентрації 0,1 % на мейотичні перетворення ооцитів свиней *in vitro*. Додавання до середовища культивування ооцитів ВДК/БСА/N-АНК в концентрації 0,1 % забезпечувало високий відсоток дозрілих *in vitro* до метафази II ооцитів і низьку кількість дегенерованого хроматину гамет, хоча рівень дегенерації в разі додавання 0,001 %-ої концентрації ВДК/БСА/N-АНК суттєво не відрізнявся від 0,1 %-вої концентрації та контролю.

Отже, додавання до середовища культивування ооцитів свиней ВДК/БСА/N-АНК в 0,1 %-вій концентрації забезпечувало формування більшої кількості дозрілих яйцеклітин із меншою кількістю дегенерованого хроматину гамет, що може бути пов'язано з реструктуриза-

цією білкових молекул у наслідок стабілізації їх електричних зарядів.

Висновки

Застосована оцінка в умовах *in vitro* біологічної активності наноматеріалу на основі високодисперсного кремнезему, поверхня якого модифікована білком та аміновмісним вуглеводом, за умов культивування із гаметами свиней.

Показано, що найбільший позитивний вплив на розморожені сперматозоїди кнурів мала 0,001 %-ва концентрація ВДК/БСА/N-АНК, яка забезпечила зростання їх активності на 13,3 %.

Також показано, що ВДК/БСА/N-АНК підвищує ефективність дозрівання ооцитів свиней в умовах *in vitro*. Встановлено, що такий наноматеріал, доданий в 0,1 %-й концентрації у середовище для *in vitro* культивування ооцитів свиней, забезпечує на 20,2 % більше сформованих дозрілих яйцеклітин.

Робота виконана за фінансової підтримки Міністерства освіти та науки України в рамках проекту «Розроблення оптимізованої технології кріоконсервації генетичного матеріалу вітчизняних порід свиней» (договір № ДЗ/47-2015 від 30.10.2015 р.).

Література

- Lindberg H.K., Falck G.C., Suhonen S., Vippola M., Vanhala E., Catalán J., Savolainen K., Norppa H. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells *in vitro* // *Toxicol. Lett.* – 2009. – № 186 (3). – p. 166–173.
- Liu L., Takenaka T., Zinchenko A.A., Ning C., Shio I., Hidetsugu A., Tsunao K., Osam M., Shizuaki M., Kenichi Y. Cationic silica nanoparticles are efficiently transferred into mammalian cells // *International Symposium on Micro-Nanomechanics and Human Science*, 11–14 Nov. 2007. – Nagoya. – P. 281–285.
- Михайленко В.М., Михайленко П.М., Слейко Л.О. Нанотехнології – перспективи застосування та ризику для здоров'я людини // *Онкологія*. – 2008. – № 10 (4). – С. 420–426.
- Галаган Н.П., Ковтун С.І., Грищенко І.В. Вплив наноконструкції з білком на життєздатність кріоконсервованих гамет кнурів // *Матеріали IX Укр. біохімічного з'їзду*. – 2006. – Т. 2 – С. 144–145.
- Галаган Н.П., Клименко Н.Ю., Орел И.Л., Новикова Е.А., Туров В.В. Биофункциональные наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема, белка и аминокислот // *Biopolymers and Cell*. – 2010. – V. 26, № 3. – P. 205–213.
- Galagan N.P., Kovtun S.I., Osaulenko V.L., Moshkivska N.M. Effect of nanocomposites based of ultrafine silica on reproductive cells // *Ukrainian–German Symposium on Nanobiotechnology*, December 14–16, 2006. – K., 2006. – P. 62.

7. Галаган Н.П. Наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема и биомолекул в средах с репродуктивными клетками // Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья: материалы II Всерос. науч. конф. с междунар. участием. – М.: Белгород, 2006. – С. 55–59.
8. Ковтун С.И., Галаган Н.П. Влияние наноматериалов на получение эмбрионов свиней вне организма // Материалы II Всерос. науч. конф. с международным участием «Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья». – М.: Белгород, 2006. – С. 106–109.
9. Москаленко В.Ф., Яворовський О.П. Екологічні і токсиколого-гігієнічні аспекти біологічної безпеки нанотехнологій, наночастинок та наноматеріалів // Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О.О. Богомольця. – 2009. – № 3. – С. 25–35.
10. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / под ред. А.А. Чуйко. – К.: Наукова думка, 2003. – 415 с.
11. Coy P., Ruiz S., Romar R., Campos I., Gadea J. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different system // Theriogenology. – 1999. – V. 51. – P. 799–812.
12. Ковтун С.І., Басовський Д.М., Куновський Ю.В. Методика одержання доімплантаційних зародків великої рогатої худоби та свиней поза організмом // Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві: наук. зб. – К.: Аграр. наука, 2005. – С. 192–200.
13. Prather R.S. Nuclear control of early embryonic development in domestic pigs // J. Reprod. Fertil. – 1993. – V. 48. – P. 17–29.
14. Tarkowski A.K. An air – drying method for chromosome preparation from mouse eggs // Cytogenetics. – 1966. – № 5, 3. – P. 394–400.

SHCHERBAK O.V.¹, ZYUZYN A.B.¹, OSYPCHEK O.S.², KOVTUN S.I.¹, GALAGAN N.P.³, TROTSKIY P.A.¹

¹ Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V. Zubets of National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Ukraine, 08321, Kiev Region, Borispol District, v. Chubinske, Pogrebnyaka str., 1, e-mail: aza.zyuzyun@yandex.ua

² LLC "Byofarma-Invest",

Ukraine, 09100, Kiev Region, City of White Church, Kyivska str., 3, e-mail: Osipchuksasha@gmail.com

³ O.O. Chuiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03164, Kiev, Gen. Naumova str., 17, e-mail: nataliyagalagan@gmail.com

THE STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY NANOMATERIAL IN CULTIVATION CONDITIONS PIGS SPERM AND OOCYTES *IN VITRO*

Aim. To assess the biological activity of nanomaterial UFS/BSA/NANA of culture conditions with different concentrations of spermatozoa and the oocyte-cumulus complexes of pigs *in vitro*. **Methods.** For study biological activity in experiments used ejaculate cryopreserved sperms of three boars (Bank Animal Genetic Resources Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V. Zubets of National Academy of Agrarian Science of Ukraine) and freshly prepared oocytes pigs. **Results.** In study effect of different concentrations NM (UFS/BSA/NANA) on viability gametes boar. The most active sperms when we add UFS/BSA/NANA in concentration 0.001 %. Adding UFS/BSA/NANA 0.1 % concentration in the cell culture medium has provided formation mature pigs oocytes for significantly higher level, which was 20.2 % more compared to the control and 18.7 % higher, when we add UFS/BSA/NANA in concentration 0.001 %. **Conclusions.** It is demonstrated the positive effect on defrosted boars sperms with adding UFS/BSA/NANA in concentration 0.001 %, their biological activity increased by 13.3 % compared with control. It is demonstration that add UFS/BSA/NANA in concentration 0.1 % in cell culture medium with pig's oocytes, level of maturation increased by 20.2 %.

Keywords: oocytes, sperms, pigs, cultivation *in vitro*, ultra-fine silica (UFS).