

КОВТУН С.І., ЗЮЗЮН А.Б.✉, ЩЕРБАК О.В., ТРОЦЬКИЙ П.А.

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

✉ aza.zuzyun@gmail.com, (099) 735-21-73

ВИКОРИСТАННЯ НАНОБІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ ТЕХНОЛОГІЇ КУЛЬТИВУВАННЯ ООЦИТІВ КОРІВ ПОЗА ОРГАНІЗМОМ

Мета. Вивчення впливу наноматеріалу на основі високодисперсного кремнезему, модифікованого вуглеводом – сахароза (ВДК/сахароза), на ефективність мейотичного дозрівання ооцитів корів *in vitro*. **Методи.** Нативні та деконсервовані ооцит-кумулясні комплекси (ОКК) корів розділяли на чотири групи: три дослідні, в яких культивування проводили в середовищі, що містило 0,1, 0,01 та 0,001 % наноматеріалу ВДК/сахароза та контрольну – без додавання наноматеріалу. **Результати.** Встановлено, що найбільш дієвою для підвищення рівня дозрівання є додавання 0,001 % концентрації ВДК/сахароза, що забезпечує отримання 76,8 % ооцитів, які досягли стадії метафази II мейозу. Додавання в середовище для культивування деконсервованих гамет корів ВДК/сахарози (0,001 %) та подальше запліднення *in vitro* попередньо дозрілих поза організмом деконсервованих яйцеклітин корів сприяє збільшенню кількості отриманих ембріонів до 33,3 %. **Висновки.** Показано, що найбільший позитивний вплив на дозрівання ооцитів корів поза організмом мало додавання 0,001 % ВДК/сахарози до середовища для культивування, що сприяло підвищенню рівня дозрівання до 76,8 %. Використання 0,001 % концентрації ВДК/сахарози у складі середовища для *in vitro* культивування деконсервованих ОКК корів сприяє збільшенню до 33,3 % кількості отриманих зародків ВРХ після запліднення *in vitro* деконсервованих і дозрілих яйцеклітин.

Ключові слова: ооцити, культивування *in vitro*, ембріони, наноматеріал, високодисперсний кремнезем.

Розвиток сучасних ембріологічних методів та біотехнології відтворення спрямований на здешевлення вартості та підвищення ефективності одержання ембріонів *in vitro*. Застосування сучасних технологій та методів дасть змогу не лише раціональніше використовувати генетич-

ний потенціал самиць, а й ефективно реалізувати завдання сільськогосподарської біотехнології. Тому існує необхідність в удосконаленні методики одержання дозрілих яйцеклітин *in vitro*.

Перспективними структурними одиницями для покращення культуральних середовищ є наноматеріали на основі високодисперсного кремнезему. Висока питома поверхня, хімічна чистота, нетоксичність і біологічна сумісність високодисперсного кремнезему (ВДК) забезпечують створення на його основі препаратів із програмованим вивільненням іммобілізованих на його поверхні синтетичних або природних сполук [1, 2].

Вуглеводи – це енергоємні речовини, які є природними кріопротекторами, а також структурні елементи розпізнавання в біополімерах і рецепторах клітинної поверхні [3, 4]. Важливу біологічну роль і специфічні функції в організмі відіграють цукри та їх похідні. Так, аміноцукри служать термінальними вуглеводами рецепторів клітин, що робить їх привабливими з точки зору використання в наноконструкціях на основі ВДК, призначених для контакту з клітинною поверхнею [5, 6].

У дослідженнях ми використали наноматеріал, основою якого є високодисперсний кремнезем. Поверхня ВДК була модифікована вуглеводом – сахароза (Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України). Посилаючись на функціональні особливості вуглеводів (кінцевий агрегат, що з'єднується з рецепторами клітин), можна сподіватися на ефективність використання такого наноматеріалу для оптимізації технології одержання дозрілих поза організмом ооцитів корів [7].

Метою дослідження було вивчення впливу наноматеріалу ВДК/сахароза на ефективність мейотичного дозрівання ооцитів корів *in vitro*.

Матеріали і методи

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

У роботі використовували високодисперсний кремнезем марки А-300 (ВДК, виробництво Калуського дослідного заводу Інституту хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України, Суд = 285 м² / Г); дисахарид сахарози (Sucr, «Merck», Німеччина). Структурна формула зазначеного вуглеводу наведена на рисунку 1. ВДК попередньо прожарювали за температури 400°C упродовж 2 год.

ОКК отримували із яєчників забитих клінічно здорових корів віком 3–5 років. ОКК вилучали шляхом розсічення стінок антральних фолікулів. Відібрані ооцити дозрівали *in vitro* упродовж 24 годин у середовищі ТСМ 199 (Sigma, М-5017) з 20 % еструсної сироватки крові корів і 3–5 × 10⁶ клітин гранулози/мл. Для культивування поза організмом відбирали ооцити із щільним та розпушеним кумулюсом [8]. Гамети культивували за температури +38,8°C і 4 % CO₂ у повітрі. Критерієм морфо-

логічної оцінки дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільця. Рівень дозрівання ооцитів *in vitro*, запліднення та аналіз стану хроматину ядер ембріонів вивчали шляхом аналізу цитогенетичних препаратів, які готували за модифікованим методом А. Тарковського. Препарати фарбували 2 % розчином барвника Гімза й аналізували під світловим мікроскопом Jenaval, Carl Zeiss ок×10, об×100. Статистичну обробку одержаних даних проводили з використанням критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Вилучені із яєчників ОКК (n=218, рис. 2) були розділені на чотири групи: I група – ооцити цієї групи помістили для дозрівання у середовище, що містило ВДК/сахарозу в концентрації 0,001 %; II група – 0,01 %; III група – 0,1 %; IV група – контрольна, ооцити культивували у середовищі без ВДК/сахарози.

Культивування ооцитів усіх груп проводили упродовж 24 годин. Через цей проміжок часу здійснювали морфологічний аналіз рівня дозрівання гамет поза організмом за наявністю полярного тільця (рис. 3).

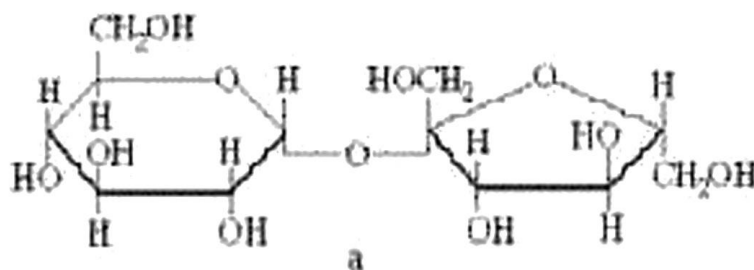


Рис. 1. Структурна формула сахарози.

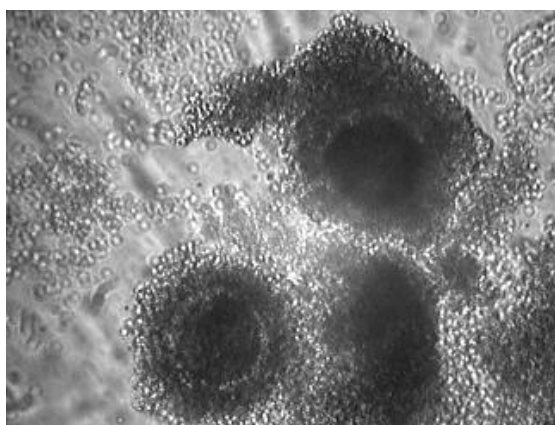


Рис. 2. ОКК, вилучені із яєчників корови.

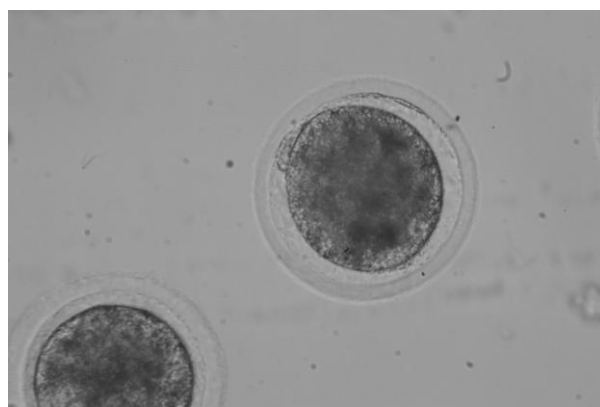


Рис. 3. Ооцити корів після дозрівання *in vitro* на стадії метафази II мейозу.

Для підтвердження морфологічного аналізу та визначення стадій розвитку виготовляли цитогенетичні препарати. За результатами морфологічної та цитогенетичної оцінки встановлено, що в усіх групах більша частина ооцитів (60,0 %) відновила під час культивування поза організмом мейотичні перетворення та досягла метафази II (табл.). Але виявлена значна різниця в рівні дозрівання між досліджуваними групами ооцитів. Так, найбільшого відсотка ооцитів (76,8 %) досягли метафази-II в I групі. На 16,0 % менше, ніж у I групі, дозріло клітин у II групі. Найменшу кількість мейотичних перетворень ооцитів корів *in vitro* (51,1 %) спостерігали у III групі ($p < 0,001$).

Встановлена також вірогідна різниця між I та IV групами в кількості ооцитів з ознаками дегенерації хроматину ($p < 0,001$). В IV групі таких клітин виявлено на 17,5 % більше, ніж у I групі.

Отже, наноматеріал ВДК/сахароза позитивно впливає на дозрівання ооцитів корів в умовах *in vitro*. Встановлено, що найбільш дієвою для підвищення рівня дозрівання є додавання 0,001 % концентрації ВДК/сахарози. В групі з такою концентрацією наноматеріалу отримано найбільшу кількість (76,8 %) ооцитів, які досягли метафази-II, і найменше клітин з ознаками дегенерації хроматину – лише 5,4 %.

Наступним етапом наших досліджень було вивчення впливу ВДК/сахарози на формування *in vitro* ембріонів із використанням деконсервованих гамет корів та оцінка якості деконсервованих гамет корів.

Досліджено вплив різних концентрацій (0,1; 0,01; 0,001 %) ВДК/сахарози на мейотичне дозрівання ОКК корів поза організмом, заплід-

нення та подальший розвиток в умовах *in vitro* деконсервованих гамет (рис. 4). Дослідження були спрямовані на оцінку розвитку ембріонів ВРХ *in vitro* із використанням деконсервованих гамет корів за застосування ВДК/сахарози в концентрації 0,1 % – група А; 0,01 % – група Б; 0,001 % – група В.

Для культивування використовували ОКК корів, які були заморожені методом вітрифікації та зберігалися в рідкому азоті. Після розморожування та виведення кріопротекторів гамету розподіляли на 4 групи: група А – додавали 0,1 % ВДК/сахарози; група Б – 0,01 %; група В – 0,001 % група К була контрольною (без додавання ВДК/сахарози). ВДК/сахарозу додавали в середовище для культивування деконсервованих ОКК корів.

За результатами експериментальних досліджень встановлено, що додавання ВДК/сахарози в концентрації 0,001 % в середовище для культивування є більш сприятливим для подальшого розвитку деконсервованих ооцитів корів. Після запліднення *in vitro* попередньо дозрілих поза організмом деконсервованих яйцеклітин корів встановлено, що додавання в середовище для культивування деконсервованих гамет корів ВДК/сахарози (0,001 %) сприяє збільшенню кількості отриманих ембріонів (до 33,3 %) порівняно з додаванням 0,1 та 0,01 % (відповідно 16,7 та 20,9 %).

Таким чином, проведений порівняльний аналіз впливу ВДК/сахарози в концентрації 0,001 % виявив збільшення кількості формування ембріонів *in vitro*, що також призвело до отримання більшої кількості зародків на інших стадіях розвитку.

Таблиця. Ефективність мейотичних перетворень ооцитів корів *in vitro* за впливу ВДК/сахарози

| Групи | Всього ооцитів, n | Стадії розвитку ОКК <i>in vitro</i> | | | | Ооцитів із дегенерацією хроматину, n (%) |
|-------|-------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| | | диплотена, n (%) | діакінез, n (%) | метафаза I, n (%) | метафаза II, n (%) | |
| I | 56 | 6 ^a (10,7±4,1) | 0 ^b | 4 ^c (7,1±3,4) | 43 ^d (76,8±5,6) | 3 ^e (5,4±3,0) |
| II | 56 | 9 ^a (16,0±4,9) | 2 ^b (3,5±2,4) | 3 ^c (5,3±3,0) | 34 ^{df} (60,8±6,5) | 8 ^{gh} (14,4±4,6) |
| III | 45 | 7 ^a (15,5±5,4) | 0 ^b | 3 ^c (6,7±3,7) | 23 ^{def} (51,1±7,5) | 12 ^h (26,7±6,5) |
| IV | 61 | 11 ^a (18,0±4,9) | 3 ^b (4,9±2,7) | 1 ^c (1,6±1,6) | 32 ^{ef} (52,6±6,3) | 14 ^h (22,9±5,3) |

Примітки: d:e; d:f; g:h – $p < 0,001$ критерій Стьюдента. В цій таблиці різні суперскрипти у межах однієї колонки вказують на вірогідну різницю між показниками.

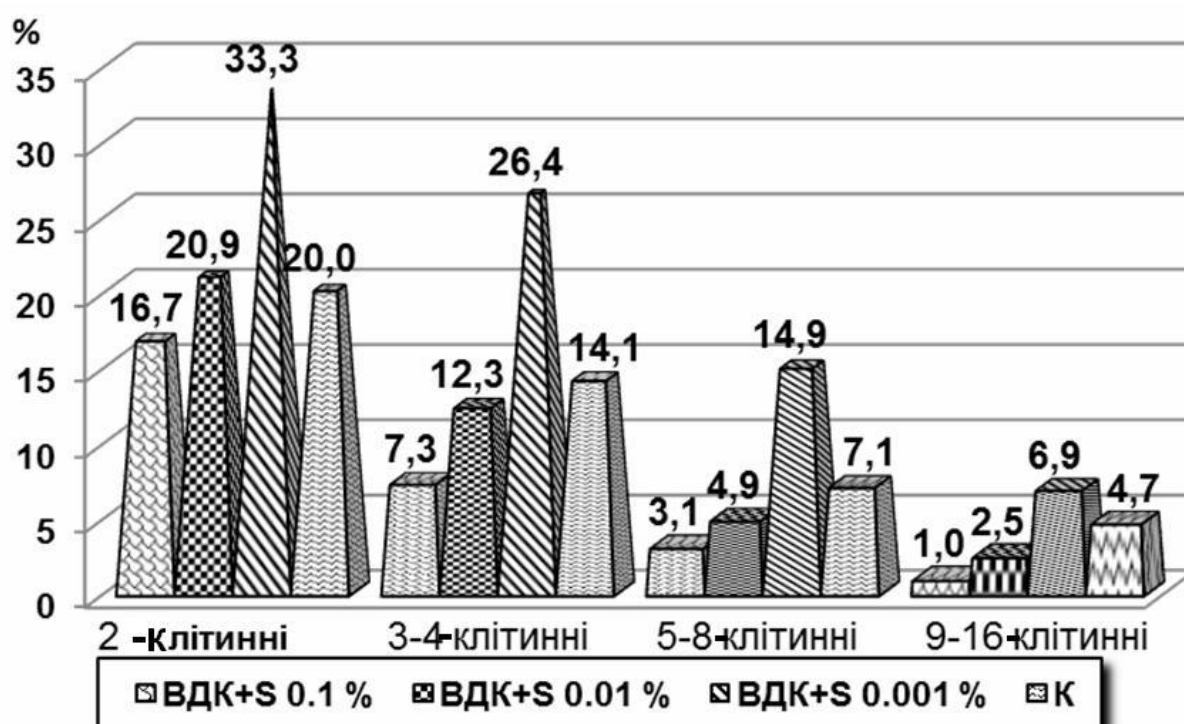


Рис. 4. Вплив ВДК/сахарози на ефективність розвитку *in vitro* ембріонів великої рогатої худоби, отриманих із деконсервованих яйцеклітин.

Висновки

1. Вивчено вплив біологічної активності наноматеріалу ВДК/сахароза на ефективність мейотичного дозрівання нативних та деконсервованих ооцитів корів *in vitro*.

2. Показано, що найбільший позитивний вплив на дозрівання ооцитів корів поза організмом мало додавання 0,001 % ВДК/сахарози до середовища для культивування, що сприяло підвищенню рівня дозрівання до 76,8 %.

3. Використання 0,001 % концентрації ВДК/сахарози у складі середовища для *in vitro* культивування деконсервованих ОКК корів сприяє збільшенню до 33,3 % кількості отриманих зародків ВРХ після запліднення *in vitro* деконсервованих і 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

1. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А.А. Чуйко. К., 2003. 415 с.
2. Liu L., Takenaka T., Zinchenko A.A. Cationic silica nanoparticles are efficiently transferred into mammalian cells. *International Symposium on Micro-Nanomechanics and Human Science* (Nagoya, 11–14 Nov, 2007). 2007. P. 281–285.
3. Галаган Н.П., Клименко Н.Ю., Орел И.Л. и др. Биофункциональные наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема, белка и аминокислот. *Biopolymers and Cell*. 2010. Vol. 26, № 3. P. 205–213.
4. 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* (Kiev, December 14–16, 2006). Kiev, 2006. P. 62.
5. Клименко Н.Ю., Новікова О.А., Місчанчук Б.Г., Галаган Н.П. Вплив іммобілізованого альбуміну на властивості композитів в системах з клітинами. *Сб. Поверхність*. 2013. Вып. 5 (20). С. 291–300.
6. Кулик Т.В., Паляниця Б.Б., Галаган Н.П. Молекулярна самоорганізація в системах нанорозмірні частинки – вуглеводи. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. К.: Академперіодика, 2003. Т. 1, Вып. 2. С. 681–690.
7. Ковтун С.І., Галаган Н.П., Щербак О.В., Троцький П.А. Методичні рекомендації з кріоконсервації сперматозоїдів та ооцитів сільськогосподарських тварин і формування ембріонів *in vitro*. Чубинське, 2015. 17 с.
8. Ковтун С.І., Галаган Н.П. Влияние наноматериалов на получение эмбрионов свиней вне организма. *Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья*: материалы II Всерос. науч. конф. с международным участием. Белгород, 2006. С. 106–109.

References

1. Chuiko A.A. Medicinskaja himija i klinicheskoe primenenie dioksida kremnija – Medical chemistry and clinical application of silicon dioxide, Edited by. Pod red. A.A. Chujko. K.: Naukova dumka, 2003. 415 p. (in Ukrainian).
2. Liu L., Takenaka T., Zinchenko A.A., Chen N., Inagaki S., Asada H., Kishida T., Mazda O., Murata S., Yoshikawa K. Cationic silica nanoparticles are efficiently transferred into mammalian cells. *International Symposium on Micro-Nanomechatronics and Human Science* (Nagoya, 11–14 Nov, 2007). 2007. P. 281–285.
3. Galagan N.P., Klimenko N.Ju., Orel I.L., Novikova O.A., Turov V.V. Biofunctional nanomaterials based on highly dispersed silica, protein and amino carbohydrates. *Biopolymers and Cell*. 2010. 26 (3). P. 205–213. (in Ukrainian).
4. 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* (Kiev, December 14–16, 2006). Kiev, 2006. P. 62. (in Ukrainian).
5. Klymenko N.Yu., Novikova O.A., Mischanchuk B.H., Halahan N.P. Influence of immobilized albumin on the properties of composites in systems with cells. *Sb. Poverkhnost' – Sb. Surface*. 2013. 5 (20). P. 291–300. (in Ukrainian).
6. Kulyk T.V., Palyanytsya B.B., Halahan N.P. Molecular self-organization in nano-sized particles – carbohydrates. *Nanosystemy, nanomaterialy, nanotekhnolohiyi*. K.: Academiperidology, 2003. 1 (2). P. 681–690. (in Ukrainian).
7. Kovtun S.I., Halahan N.P., Shcherbak O.V., Trots'kyi P.A. Methodical recommendations on cryopreservation of sperm and oocytes of farm animals and formation of embryos *in vitro*. Chubyns'ke, 2015. P. 17. (in Ukrainian).
8. Kovtun S.I., Galagan N.P. Influence of nanomaterials on the production of pig embryos outside the body. *Sorbents as a factor of quality of life and health: Materials of II All-Russia. scientific conf. with international participation*. Belgorod. P. 106–109. (in Russian).

KOVTUN S.I., ZYUZYN A.B., SHCHERBAK O.V., TROTSKIY P.A.

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

APPLYING THE NANOBIOLOGICAL METHODS FOR OPTIMIZE THE *IN VITRO* CULTIVATION TECHNOLOGY FOR COWS OOCYTES

Aim. Investigated effect nanomaterial of highly dispersed ultra fine silica (UFS) by carbohydrate – sucrose (UFS/sucrose) on the effectiveness of meiotic maturation cows oocytes *in vitro*. **Methods.** The fresh and frozen – thawed cow oocyte-cumulus complex (OCC) was divided into four groups: three experimental in which the cultivation was carried out in a medium containing of 0, 1; 0, 01 and 0,001 % UFS/sucrose and control without adding nanomaterial. **Results.** It was concluded that the addition of UFS/sucrose in 0.001 % concentration is effective for elevation level of oocytes maturation and provides reception of 76,8% oocytes that induced the metaphase II of meiosis. Adding carbohydrate – sucrose (UFS/sucrose) in 0.001 % concentration to the culture medium frozen – thawed cow generative cells, make positive effect on *in vitro* fertilization and provide embryos quantity enhancement to 33.3 %. **Conclusions.** Addition of UFS/sucrose in 0.001 % concentration to the culture medium have increase effect and promote level *in vitro* maturation of cows oocytes rising to 76.8 %. Usage of UFS/sucrose in 0.001 % concentration as part of *in vitro* culture medium for cows oocyte-cumulus complex conduce rising quantity of cattle embryos to 33.3 % after *in vitro* fecundation frozen – thawed and maturation oocytes.

Keywords: oocytes, *in vitro* culture, embryos, nanomaterial, ultra fine silica (UFS).