

ВПЛИВ КОРОТКОСТРОКОВОГО ЗБЕРІГАННЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ КОРІВ І СВИНОМАТОК ПРИ БІЛЯНУЛЬОВИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

П. А. Троцький
trotskyi_pa@ukr.net

Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця
Національної академії аграрних наук України
вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н,
Київська обл., 08321, Україна

Сучасні біотехнологічні методи дають змогу раціонально впливати на відтворювальний потенціал самок, значно збільшувати кількість високопродуктивних особин і тим самим – виробництво продукції тваринництва. Короткострокове зберігання статевих клітин самиць тварин є одним із прогресивних напрямків розвитку сучасної біотехнології. Метою роботи було вивчити вплив такого зберігання при білянульових температурах (+4° С) ооцит-кумулюсних комплексів корів і свинок на їх подальший розвиток in vitro. В дослідженнях використовували ооцити корів і свиноматок з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом. Яєчники і гамети самиць попередньо зберігали протягом 6-24 год. при білянульових температурах у фосфатно-сольовому буфері Dulbecco. Ооцит-кумулюсні комплекси корів культивували в протягом 27 годин, свиноматок - 44 години. При проведенні досліджень були використані біотехнологічні, морфологічні та цитогенетичні методи, а також методи статистичної обробки даних. Встановлено залежність терміну попереднього зберігання (6, 9, 12, 15, 18, 24 год.) при білянульових температурах яєчників корів і свиноматок на подальший розвиток гамет самиць в умовах in vitro. Збільшення терміну зберігання яєчників з 6 до 24 год. призводить до значного зменшення (з 60,5 до 9,6 %) показника дозрівання поза організмом ооцитів корів та (з 50,5 до 3,4 %) свиноматок до метафази-2 мейозу. Короткострокове зберігання ооцит-кумулюсних комплексів корів і свиноматок при білянульових температурах впливає на біологічні особливості роз-

витку гамет самок в умовах *in vitro*. Для раціонального використання гамет корів та свиноматок необхідно використовувати ооцити, що зберігалися при біянульових температурах (+4° C) не більше 6 годин.

Ключові слова: короткострокове зберігання, ооцит-кумулясні комплекси, біянульові температури, дозрівання *in vitro*.

THE INFLUENCE of SHORT-TERM STORAGE OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES of COWS and SOWS at TEMPERATURES ABOUT ZERO

P. A. Trotskiy
trotskiy_pa@ukr.net

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M. V. Zubets NAAS
1, Pogrebnyak Street, Chubynske, Boryspil district,
Kyiv region, 08321, Ukraine

The modern biotechnological methods enable to efficiently affect to the reproductive potential of females, significantly increase the number of highly productive animals and thus increasing the livestock production. Short-term storage of female animals' gametes is one of the advanced areas of the development of modern biotechnology. The aim of the work was to study the effect of short-term storage oocyte-cumulus complexes cows and sows on their further development "In Vitro" at temperatures about zero (+ 4° C). In studies using oocytes of cows and sows with homogeneous fine-grained ooplasm, undamaged transparent cover, with tight or partially loosened cumulus. The ovaries and female gametes were pre-stored in phosphate-buffered saline Dulbecco for 6-24 hours at temperatures about zero. The oocyte-cumulus complexes of cows were cultivated during 27 hours, and sows - 44 hours. When conducting research were used biotechnology, morphological and cytogenetic methods and the methods of statistical data. The dependence from the preliminary storage (6, 9, 12, 15, 18, 24 hr.) at temperatures about zero of the ovaries of cows and sows on the further development of female gametes in conditions "In Vitro" was determined. Longer storage of ovaries since 6 to 24 hours leads to a significant decrease (from 60.5 to 9.6 %) rate of maturation of oocytes of cows and sows outside the body (from 50.5 to 3.4 %) to metaphase of meiosis-2. Short-term storage oocyte-cumulus complexes cows and pigs at about zero temperature af-

fects to the biological characteristics of development the females' gametes in conditions "In Vitro".

For the rational use of gametes cows and sows should to use oocytes that were stored at temperatures about zero (+ 4° C) no more than 6 hours.

Keywords: short-term storage, oocyte-cumulus complexes, about zero temperatures, maturation "In Vitro".

ВЛИЯНИЕ КРАТКОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ ООЦИТОВ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ КОРОВ И СВИНОМАТОК ПРИ ОКОЛОНУЛЕВЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

П. А. Троцкий
trotskiy_pa@ukr.net

Институт разведения и генетики животных имени М. В. Зубца
Национальной академии аграрных наук Украины
ул. Погребняка, 1, с. Чубинское, Бориспольский р-н,
Киевская обл., 08321, Украина

Современные биотехнологические методы позволяют рационально влиять на воспроизводительный потенциал самок, значительно увеличивать количество высокопродуктивных особей и тем самым - производство продукции животноводства. Краткосрочное хранение половых клеток самок животных является одним из прогрессивных направлений развития современной биотехнологии. Целью работы было изучение влияния краткосрочного хранения при около нулевых температурах (+ 4° C) ооцит-кумулюсных комплексов коров и свиноматок на их дальнейшее развитие "In Vitro". В исследованиях использовали ооциты коров и свиноматок с гомогенной тонкозернистой ооплазмой, невредимой прозрачной оболочкой, плотным или частично разрыхленным кумулюсом. Яичники и гаметы самок предварительно хранили в течение 6-24 часов при около нулевых температурах в фосфатно-солевом буфере Dulbecco. Ооцит-кумулюсные комплексы коров культивировали в течение 27 часов, свиноматок - 44 часа. При проведении исследований были использованы биотехнологические, морфологические и цитогенетические методы, а также методы статистической обработки данных. Установлена зави-

симость срока предварительного хранения (6, 9, 12, 15, 18, 24 ч.) при около нулевых температурах яичников коров и свиноматок на дальнейшее развитие гамет самок в условиях "In Vitro". Увеличение срока хранения яичников с 6 до 24 часов приводит к значительному уменьшению (с 60,5 до 9,6 %) показателя созревания вне организма ооцитов коров и (с 50,5 до 3,4 %) свиноматок до метафазы-2 мейоза. Краткосрочное хранение ооцит-кумулясных комплексов коров и свиноматок при около нулевых температурах влияет на биологические особенности развития гамет самок в условиях "In Vitro". Для рационального использования гамет коров и свиноматок необходимо использовать ооциты, которые хранились не более 6 часов при около нулевых температурах (+ 4° С).

Ключевые слова: краткосрочное хранение, ооцит-кумулясные комплексы, около нулевые температуры, созревание "In Vitro".

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 сільськогосподарських тварин залежно від потреб народного господарства [1, 2]. Зокрема, зберігання гамет обох батьків припускає необмежені варіанти їх поєднання в майбутньому, а створення ооцитобанку та банку запліднених яйцеклітин дає змогу різко знизити витрати на отримання ембріонів та сприяє розв'язанню цілої низки наукових проблем у розгортанні досліджень з клітинної та генної інженерії [3, 4, 5]. Не менш важливе значення має й вирішення проблеми короткострокового зберігання гамет самиць сільськогосподарських тварин без зниження їх життєздатності, що в певній мірі розширює доступ і строки використання базового біологічного матеріалу для подальших біотехнологічних маніпуляцій з клітинами. Порівняно з глибоким заморожуванням короткочасне зберігання надзвичайно простий та набагато дешевший, тому що не потребує спеціальних складних пристроїв і приладів.

Метою роботи було вивчити вплив короткострокового зберігання при білянульових температурах (+4° С) ооцит-кумулясних комплексів корів і свинок на їх подальший розвиток *in vitro*.

Матеріал і методика досліджень. В дослідженнях використовували ооцити корів і свиноматок з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом [6]. Яєчники і гамети самиць попередньо зберігали протягом 6-24 год. при білянульових температурах (+4° С) у фосфатно-сольовому буфері Dulbecco. Ооцит-кумулясні

комплекси корів культивували в чотирьохлункових планшетах протягом 27 годин, свиноматок - 44 години при температурі 38,5°C, 5% CO₂ у повітрі, в краплях середовища 199 з 10% попередньо інактивованою 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. Після культивування гамети підлягала цитогенетичному аналізу, цитогенетичні препарати готували за методом Tarowski A.K. [7], забарвлювали 2,0% розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

Результати досліджень. Проведено дослідження із короткострокового зберігання при біянульових температурах ооциткумулюсних комплексів корів і свиноматок, вивчено цитоморфологічні особливості розвитку гамет самиць в умовах *in vitro* та визначено їх біологічну повноцінність після мейотичного дозрівання поза організмом.

Таблиця 1. Культивування поза організмом гамет корів, отриманих з яєчників, що зберігались при біянульових температурах різний термін часу

Вариант досліджу	Термін зберігання, год.	Кількість прокультивованих клітин	Кількість клітин:					
			на метафазі-2 мейозу		на інших стадіях мейозу		з хромосомними порушеннями	
			n	%	n	%	n	%
А	6	119	72	60,5 ^d ±4,5	12	10,1 ±2,8	35	29,4 ⁱ ±4,2
Б	9	113	50	44,2 ^c ±4,7	10	8,9 ±2,7	53	46,9 ^j ±4,7
В	12	101	36	35,6 ^{cb} ±4,8	11	10,9 ±3,1	54	53,5 ^{jm} ±5,0
Г	15	97	23	23,7 ^{bi} ±4,3	14	14,4 ±3,6	60	61,9 ^{mk} ±4,9
Д	18	109	14	12,8 ^a ±3,2	15	13,8 ±3,3	80	73,4 ^{kn} ±4,2
Е	24	94	9	9,6 ^{ag} ±3,0	13	13,8 ±3,6	72	76,6 ^{nl} ±4,4
К	2	89	67	75,3 ^e ±4,6	9	10,1 ±3,2	13	14,6 ⁿ ±3,7

(різні суперскрипти вказують на вірогідну різницю між показниками)

a:f; c:d; d:e; j:k; k:l – P < 0,05; c:f; g:f; h:i; i;j; m:n – P < 0,01; a:b; a:c; a:d; a:e; b:d; b:e; c:e; e:f; h;j; h:k; h:m; h:n; i:l; i:k; i:m; j:l; :n; m:l; n:l – P < 0,001

За результатами експериментальних досліджень, дані наведено в таблиці 1, виявлено залежність терміну попереднього зберігання (6, 9, 12, 15, 18, 24 год. гр. А-Е) при білянкульових температурах (+4° С) яєчників корів на подальший розвиток гамет самиць в умовах *in vitro*. Збільшення терміну зберігання яєчників з 6 до 24 год. призводить до значного зменшення (з 60,5 до 9,6 %) показника дозрівання поза організмом ооцитів корів до метафази-2 мейозу. Показник кількості гамет з хромосомними порушеннями у цих експериментальних групах збільшувався з 29,4 до 76,6 %. У контрольній групі (К) показники кількості клітин, що досягли метафази-2 мейозу та мали хромосомні порушення, становили відповідно 75,3 та 14,6 %. Аналогічну тенденцію виявлено і в дослідженнях із короткострокового зберігання яєчників свиноматок при білянкульових температурах різний термін часу (табл. 2).

Таблиця 2. Дозрівання ооцитів свиноматок, отриманих з яєчників, що зберігались при білянкульових температурах різний термін часу

Вариант досліджу	Термін зберігання, год.	Кількість прокультивованих клітин	Кількість клітин					
			на метафазі 2 мейозу		на інших стадіях мейозу		з хромосомними порушеннями	
			п	%	п	%	п	%
А	6	111	56	50,5 ^d ±4,7	10	9,0 ±2,7	45	40,5 ⁱ ±4,7
Б	9	105	39	37,1 ^c ±4,7	8	7,7 ±2,6	58	55,2 ^j ±4,9
В	12	96	25	26,0 ^{cb} ±4,5	14	14,6 ±3,6	57	59,4 ^l ±5,0
Г	15	123	23	18,7 ^{bg} ±3,5	17	13,8 ±3,1	83	67,5 ^{lm} ±4,2
Д	18	98	9	9,2 ^a ±2,9	11	11,2 ±3,2	78	79,6 ^k ±4,1
Е	24	116	4	3,4 ^{af} ±1,7	16	13,8 ±3,2	96	82,8 ^{kn} ±3,5
К	2	85	57	67,1 ^e ±5,7	7	8,2 ±3,0	21	24,7 ^h ±4,7

a:g; c:d; h:i; i:j; k:m – P<0,05; a:b; b:c; d:e; i:e; k:l; m:n – P< 0,01; a:c; a:d; a:e; b:d; b:e; b:f; c:e; e:g; f:e; f:g; h:j; h:k; h:l; h:m; i:k; i:m; j:k; l:n – P< 0,001

Відповідне збільшення терміну попереднього зберігання яєчників свиноматок призводило до зменшення отримання гамет самиць на метафазі-2 мейозу (гр. А-Е) з 50,5 до 3,4 % та збільшення кількості гамет з порушеннями їх хромосомного апарату з 40,5 до 82,8 %. Аналогічні показники в гр. К становили відповідно 67,1 та 24,7 %.

Таким чином, встановлено різну ефективність попереднього зберігання ооцит-кумулюсних комплексів корів і свиноматок при білянкульових температурах, вивчено цитоморфологічні особливості розвитку гамет самок в умовах *in vitro* та визначено їх біологічну повноцінність. Доведено, що збільшення терміну попереднього зберігання з 6 до 24 годин гамет самок при +4° С не призводить до збільшення кількості гамет, що дозріли до метафазі-2 мейозу після 27- і 44-годинного культивування (відповідно для гамет корів і свинок).

Висновки. Короткострокове зберігання ооцит-кумулюсних комплексів корів і свинок при білянкульових температурах впливає на біологічні особливості розвитку гамет самок в умовах *in vitro*. Для раціонального використання гамет корів та свинок необхідно використовувати ооцити, що зберігалися при білянкульових температурах (+4° С) не більше 6 годин.

Список використаної літератури

1. The evolution of porcine embryo *in vitro* production / Christopher G. Grupen // *Theriogenology*. – 2014. – Vol.81. – I.1. – P. 24–37.
2. Arav A Cryopreservation of oocytes and embryos / A. Arav // *Theriogenology*. – 2014. – Vol.81. – I.1. – P. 96–102.
3. Implications of storage and handling conditions on glass transition and potential devitrification of oocytes and embryos / M. Sansinena, M.V. Santos, G. Taminelli, N. Zaritky // *Theriogenology*. – 2014. – Vol. 82. – I.3. – P. 373–378.
4. Bazer F.W., Spenser T.E. Reproductive biology in the era of genomics biology // *Theriogenology*. – 2005. – V.64. – I.3. – P. 442-456
5. Безуглий М. Д. Розвиток біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин / М. Д. Безуглий, О. Є. Гузеватий // *Вісник аграрної науки*. – 2006. – № 12. – С. 83-87.
6. Гузеватий О. Є. Методики оцінки якості ооцит-кумулюсних комплексів корів для кріоконсервування / О. Є. Гузеватий, П. А. Троцький, Ю. М. Собко // *Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві*. – К.: Аграрна наука, 2005. – С.180-187.
7. Tarkowski A.K. An air drying method for chromosoma preparation from mouse eggs // *Cytogenetics*. – 1966. – V. 5. – P. 394-400.