

## ВПЛИВ ТРИВАЛОСТІ СУМІСНОЇ ІНКУБАЦІЇ ГАМЕТ НА ЕМБРІОНАЛЬНИЙ РОЗВИТОК СВИНЕЙ *IN VITRO*

С.І. Ковтун, Ю.В. Куновський  
Інститут розведення і генетики тварин УААН

*Представлені результати досліджень зі встановлення оптимального часу співкультивування in vitro яйцеклітин і сперматозоїдів свиней. Встановлена перевага застосування 18-годинного спільного перебування гамет в умовах in vitro, яке забезпечує запобігання негативного впливу маніпулювання на зиготи свиней у період їх розвитку поза організмом.*

Ключові слова: **свині, яйцеклітини, епідидимальні сперматозоїди, запліднення in vitro, співкультивування гамет, ембріон.**

Досягнення біотехнологічних методів на основі генетики розвитку дали змогу одержувати клоновані і генетично модифіковані ембріони великої рогатої худоби і свиней шляхом маніпулювання ембріонами. Проте ефективність методів реконструювання є недостатньо високою, головним чином через недосконалість технологій маніпулювання з ембріонами. Для підвищення результативності цих методів необхідно удосконалити IVM (*in vitro* maturation – дозрівання поза організмом) і IVF (*in vitro* fertilization – запліднення поза організмом) системи одержання ембріонів [8]. Ембріональний розвиток ссавців є результатом тонкого взаємозв'язку між реалізацією генетичної програми хромосом зародків і станом статевих шляхів самиці [2].

Важливим елементом успішного ембріонального розвитку свиней *in vitro* є вплив стадій статевого циклу яєчників. Встановлено, що розвиток зародків поза організмом до стадії бластоцисти вищий, коли для запліднення використовують ооцити, вилучені з яєчників на стадії фолікулярного росту або зі старим жовтим тілом порівняно зі стадією фолікулярного домінування. Це означає, що відсоток клітин, генетично запрограмованих на загибель, збільшується, коли яєчники перебувають на стадії фолікулярного домінування. Необхідно враховувати розміри фолікулів, які мають суттєвий вплив на розвиток ооцитів до метафази II мейозу [6]. Показано, що ооцити одержані із фолікулів діаметром від 2 до 6 мм проявляють вищу здатність до перетворення хроматину в мейозі і розвитку ембріонів, ніж ооцити з менших фолікулів [5]. Різна якість ооцит-кумулюсних комплексів свиней, отриманих із фолікулів різного розміру, або від різновікових тварин, може бути основною причиною кардинальних відмінностей при одержанні ембріонів свиней *in vitro* [9]. Дослідження у цій галузі також спрямовані на вивчення механізмів, що контролюють ядерне та цитоплазматичне дозрівання ооцитів, penetрацію сперматозоїдів та ранній розвиток ембріонів до стадії бластоцисти.

Встановлено, що для отримання ембріонів великої рогатої худоби поза організмом сумісну інкубацію гамет необхідно проводити протягом 18 год [3], а зменшення тривалості сумісного перебування яйцеклітин та сперматозоїдів призводить до різкого зменшення частоти запліднення. Також показано, що ефективним є сумісне культивування гамет великої рогатої худоби поза організмом у середовищі запліднення не менше 45 год [4] і навіть 65 год [3] для уникнення маніпуляцій з ембріонами у критичні періоди розвитку. Важливим чинником для успішного отримання ембріонів свиней поза організмом,

враховуючи вищу проблемність такого біотехнологічного методу для цього виду сільськогосподарських тварин, є визначення оптимальної тривалості сумісної інкубації гамет поза організмом.

**Матеріали і методи досліджень.** Яєчники відбирали від забитих свинок препубертатного віку, або у свиноматок великої білої породи. Відбирали ооцити діаметром 120 – 130 мкм із щільним темним кумулюсом, неушкодженою прозорою оболонкою і гомогенною невакуолізованою ооплазмою правильної округлої форми без морфологічних ознак просунутої атрезії. При культивуванні ооцит-кумулясних комплексів використовували свіжоотримані клітини гранульози в концентрації  $3\text{--}5 \times 10^6$ . Осіменіння дозрілих *in vitro* яйцеклітин свиней проводили з використанням кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів, одержаних із придатків сім'яників статевозрілих кнурів [1]. Видалення розріджувача та відбір рухливих чоловічих гамет проводили методом спливання (swim-up) у модифікованому середовищі TALP без іонів  $\text{Ca}^{2+}$  [7]. Епідидимальні сперматозоїди спільно інкубували з яйцеклітинами в середовищі TALP-IVF [7] з додаванням суміші PHE (20 мкМ пеніциламіну, 10 мкМ гіпотаурину та 1 мкМ епінефрину) і розчину гепарину (10 мкг/мл) протягом 4 та 18 годин при концентрації рухливих сперматозоїдів 250 млн/мл. Зиготи культивували *in vitro* у середовищі NCSU-23. Культивування ембріонів свиней *in vitro* до доїмплантаційних стадій проводили протягом 2 діб.

Для аналізу рівня дозрівання ооцитів *in vitro* та аналізу стану хроматину ядер ембріонів готували сухоповітряні препарати за допомогою модифікованого методу Тарковського. Фарбування препаратів проводили з використанням 2%-ного розчину барвника Гімза. Одержані препарати аналізували під світловими мікроскопами Carl Zeiss з фотовиводом „Axiostar Plus”.

**Результати досліджень.** На даному етапі досліджень ми вивчали ефективність отримання ембріонів свиней поза організмом при використанні різних часових параметрів сумісної інкубації (4 та 18 год) дозрілих *in vitro* ооцитів свиноматок із заморожено-відталеними епідидимальними сперматозоїдами кнура. Співкультивування гамет свиней поза організмом протягом 18 годин було використано у зв'язку зі встановленням оптимального часу для ефективного отримання *in vitro* зародків великої рогатої худоби, а 4-годинне співкультивування було обумовлене дослідженням виживаності розморожених епідидимальних сперматозоїдів кнурів, яка становила 3 год. Також показано, що 4-годинне перебування сперматозоїдів із дозрілими поза організмом яйцеклітинами свиней забезпечує високий рівень запліднення з низьким рівнем поліспермії.

Умови *in vitro* культивування ОКК свиней були забезпечені нами так, що відмінностей за рівнем дозрівання яйцеклітин поза організмом не спостерігалось і кількість гамет, що досягли стадії метафази II мейозу, була на однаково високому рівні (табл.).

Результати досліджень свідчать, що 4- та 18-годинне співкультивування поза організмом сперматозоїдів кнурів та яйцеклітин свиноматок забезпечує отримання однаково високого рівня (майже 60 %) запліднених яйцеклітин. Вибрана нами концентрація сперматозоїдів та досліджувані часові параметри співкультивування гамет не впливали на рівень поліспермного запліднення яйцеклітин, який не перевищував 12,4 % від загальної кількості досліджуваних жіночих гамет свиней.

Розвиток зародків *in vitro* (рис. 1, 2) також не відрізнявся суттєво після 4- або 18-годинного співкультивування гамет поза організмом, але отримання

більшої абсолютної кількості зародків після 18-годинного співкультивування гамет, виключення маніпуляцій із зиготами у критичні періоди розвитку, порівняно із 4-годинним перебуванням, дає змогу констатувати, що оптимальним часом культивування *in vitro* сперматозоїдів з яйцеклітинами при отриманні зародків свиней є 18 годин.

**Вплив часових параметрів співкультивування гамет свиней  
при отриманні зародків поза організмом**

| Час співкультивування гамет, год | Всього ооцитів, n | Дозрівання ооцитів до метафази II, n (%) | Кількість запліднених яйцеклітин, n (%) |                            | 2-4-клітинні зародки, n (%) |
|----------------------------------|-------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|                                  |                   |                                          | всього                                  | поліспермно                |                             |
| 4                                | 223               | 156 <sup>a</sup> (70,0±3,1)              | 129 <sup>b</sup> (57,8±3,3)             | 26 <sup>c</sup> (11,7±2,2) | 86 <sup>d</sup> (38,6±3,3)  |
| 18                               | 275               | 194 <sup>a</sup> (70,5±2,8)              | 162 <sup>b</sup> (58,9±3,0)             | 34 <sup>c</sup> (12,4±2,0) | 120 <sup>d</sup> (43,6±3,0) |

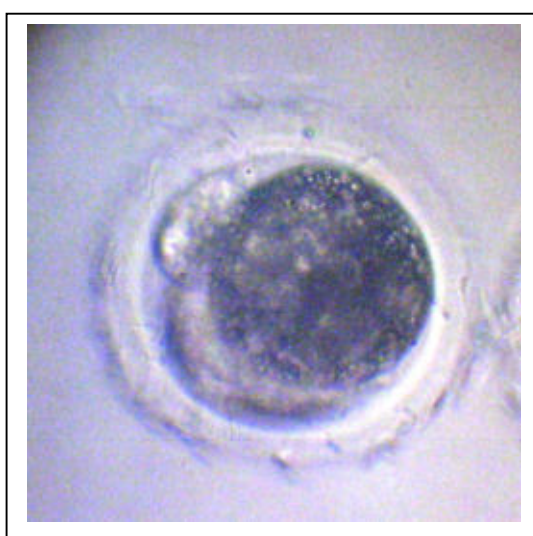
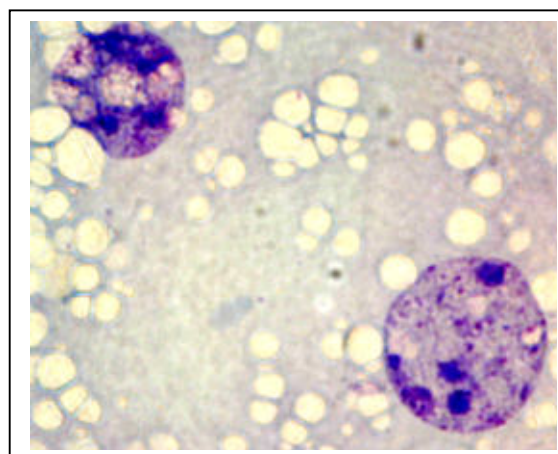


**Рис. 1. Зажиттєве фото двоклітинного зародка свиней, одержаного поза організмом із добре помітним першим полярним тілом, об.10х, ок.10х.**

**Рис. 2. Морфологічно нормальні ядра з ядерцями отриманого *in vitro* двоклітинного зародка свиней.**

Сухоповітряний препарат пофарбований розчином барвника Гімза, об.90х, м. ім., ок.10х.



**Висновок.** При вивченні генетичних механізмів запліднення *in vitro* яйцеклітин свиней нами комплексно досліджено підходи до визначення основних етапів технології. Так встановлення оптимального часу сумісної інкубації гамет (18 год) забезпечує ефективне формування ембріонів *in vitro*. Також на основі отримання та аналізу цитогенетичних препаратів зигот свиней та 2 – 4-клітинних ембріонів на різних стадіях розвитку дає можливість аналізувати стан хроматину ядер та прогнозувати подальший ембріогенез.

### Бібліографічний список

- 1.Ковтун С.І., Мелешко Н.Я., Куновський Ю.В. Стан та перспективи використання епідидимальних сперматозоїдів сільськогосподарських тварин для одержання зародків *in vitro* //Наук. праці Полтавської держав. аграр. академії. – 2002. – Т. 1. – С.122 – 124.
- 2.Культивирование созревших и оплодотворенных *in vitro* ооцитов в средах с клетками воспроизводительного тракта /Н.И Смыслова, Н.И. Сергеев, Т.Е. Тарадайкин, Г.Н. Сингина //Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 1999. – №2. – С. 47 – 49.
- 3.Рекомендації по одержанню ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* /В.Є. Кузнецов, М.Я. Єфіменко, І.Б. Кузнецова, Б.Є. Подоба – К.: ТОВ "Міжнар.фін. агенція", 1998. – 33 с.
- 4.Addition of penicillamine, hypotaurine and pinephrine (PHE) or bovine – 20 oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine *in vitro* fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate /G. F. Miller, D. W. Gliedt, J. M. Rakes, R. W. Rorie //Theriogenology. – 1994. – Vol. 41. – P. 689 – 696.
- 5.Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro* /M. Yoshida, Y. Mizoguchi, K. Ishigaki et. al. //Theriogenology. – 1993. – Vol. 39. – P. 1303 – 1311.
- 6.Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes /R. Marchal, C. Vigneron, C. Perreau et. al. //Theriogenology. – 2002. – Vol. 57, N. 5. – P. 1523 – 1532.
- 7.Katska L., Smorag Z., Rynska B. Instrukcja wdrozeniowa nr 2/93. Produkcja zarodkow bydlecych metodami *in vitro*. – Krakow. – 1993. – 18s.
- 8.Nagaj T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes //Theriogenology. – 2001. – N. 55. – P.1291 – 1301.
- 9.Prather R.S., Day B.N. Practical considerations for the *in vitro* production of pig embryos //Theriogenology. – 1998. – Vol. 49. – P. 23 – 32.

### ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ СОВМЕСТНОГО ИНКУБИРОВАНИЯ ГАМЕТ НА ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ СВИНЕЙ IN VITRO

С.И. Ковтун, Ю.В. Куновский, Институт разведения и генетики животных УААН

*Представлены результаты исследований по установлению оптимального времени совместного культивирования in vitro яйцеклеток и сперматозоидов свиней. Установлено преимущество применения 18-часового совместного пребывания гамет в условиях in vitro, которое обеспечивает избежание отрицательного влияния манипулирования с зиготами свиней в период их развития вне организма.*

*Ключові слова: свиньи, яйцеклетки, эпидидимальные сперматозоиды, оплодотворение in vitro, сокультивирование гамет, эмбрион*

### SIMULTANEOUS GAMETE INCUBATION TERM IMPACT ON IN VITRO EMBRYO DEVELOPMENT OF THE PIGS

Kovtun S., Kunovskiy Yu., the institute of breeding & genetics of the animals

*This article highlights the experimental research results on simultaneous in-vitro ovary cells & pig sperm cultivation. The optimal cultivation term was calculated. 18-hour simultaneous gamete in-vitro cultivation proved to affect positively the pig zygotes during embryonic development.*

*Key words: pigs, egg cells, epididymis sperm, in-vitro fertilization, simultaneous gamete cultivation, embryo.*