

ЗАСТОСУВАННЯ РІЗНИХ КУЛЬТУРАЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ У ПРОЦЕСІ ОТРИМАННЯ *IN VITRO* ЕМБРІОНІВ СВИНЕЙ

О.П.Гончарук

Інститут розведення і генетики тварин УААН

У статті викладено результати досліджень із запліднення in vitro яйцеклітин свиноматок, що дозріли поза організмом у різних культуральних середовищах (DMEM, M-199, DME/Ham-F-12, Ham-F-10) та отримання ембріонів свиней.

біотехнологія, яєчники, ооцити, ембріон, in vitro

Сучасний розвиток сільського господарства не можна уявити без використання біотехнологічних методів відтворення тварин. Одержання *in vitro* ембріонів із дозрілих та запліднених поза організмом ооцитів має видоспецифічну залежність. Нині даний метод розроблено достатньою мірою для малоплідних видів сільськогосподарських тварин, таких як велика рогата худоба та вівці [1-3]. Значно менше уваги приділяється розробці методу отримання *in vitro* зародків свині, враховуючи багатоплідність цієї тварини. Однак бурхливий розвиток таких новітніх біотехнологічних напрямів, як клонування та трансгенез, спонукає до подальшої розробки й удосконалення методу одержання *in vitro* ембріонів сільськогосподарських тварин, у тому числі й свиней, як джерела великої кількості повноцінних яйцеклітин, зигот та ембріонів різних стадій розвитку [4-7]. Сучасні методи отримання *in vitro* ембріонів сільськогосподарських тварин, у тому числі й свиней, передбачають використання дуже широкого спектра поживних середовищ (Menezo, BWW, SOF, RPMI) на різних етапах культивування (дозрівання поза організмом ооцитів до метафази-2 мейозу, зародків ранніх стадій дроблення до доїмплантаційних стадій тощо). Відмічається дуже значна різноманітність результатів експериментальних досліджень з отримання *in vitro* ембріонів свиней [8-10], яка зумовлена, мабуть, різними чинниками (кваліфікацією окремих експериментаторів, різницею між окремими популяціями тварин – гамети одних більш придатні до маніпуляцій *in vitro*, ніж від інших), в тому числі важливу роль відіграють умови культивування, серед яких ключовою ланкою є культуральне середовище.

Метою досліджень було проведення порівняльного аналізу запліднення *in vitro* яйцеклітин свиноматок, що дозріли поза організмом у різних культуральних середовищах.

Матеріал і методи досліджень. Досліди проводили на фолікулярних ооцитах, одержаних з яєчників свиноматок. Ооцит-кумулюсні комплекси отримували з яєчників шляхом надрізу антральних фолікулів. Вимивали середовищем Дюльбекко з 1 од/мл гепарину і 40 од/мл гентаміцину, виловлювали пастерівською піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками під контролем мікроскопа МБС-9. Процедура дозрівання здійснювали в чотирилункових планшетах протягом 45 годин у накритих вазеліновим маслом краплях

поживного середовища при температурі 38,5°C та 5% CO₂ у повітрі. В експериментах використовували 4 типи поживних середовищ: DMEM (“Sigma”, кат. № D5648), M-199 (“Sigma”, кат. № M2520), DME/Ham-F-12 (“Sigma”, кат. № D8900), Ham-F-10 (“Sigma”, кат. № N1387) [11]. Для запліднення *in vitro* яйцеклітин свиноматок використовували свіжоотриману сперму кнурів. Підготовку сперматозоїдів до запліднення проводили за схемою, запропонованою Nagai T. et all. [12]. Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J. et all. Спільне інкубування яйцеклітин і сперматозоїдів проводили у краплях середовища Fert. – TALP. Після 10–18 годин спільного інкубування яйцеклітини і зиготи відмивали від прилиплої сперми і переносили в краплі середовища CDM для подальшого культивування протягом 72 годин.

Результати досліджень. Попередні наші дослідження з дозрівання поза організмом ооцитів свиноматок в середовищах DMEM, Ham-F-10, M-199, DME/Ham-F-12 виявили різну ефективність використання цих середовищ. Але найбільш об’єктивним критерієм повноцінності дозрівання ооцитів поза організмом, безумовно, є їх успішне запліднення *in vitro* (таблиця).

Використання різних культуральних середовищ при отриманні ембріонів свиней в умовах *in vitro*

Варіанти досліду	Поживне середовище	Термін культивування, год.	Кількість прокультивованих клітин	Кількість ембріонів:											
				2-клітинних		3-клітинних		4-клітинних		5-клітинних		6-клітинних		всього	
				n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	DMEM	72	143	2	1,4	1	0,7	–	–	–	–	–	–	3	2,1 ^a
2	M-199	72	108	10	9,3	4	3,7	7	6,5	1	0,9	2	1,8	24	22,2 ^c
3	DME/Ham-F12	72	134	13	9,7	2	1,5	2	1,5	–	–	–	–	17	12,7 ^b
4	Ham-F-10	72	122	12	9,8	3	2,5	5	4,1	–	–	1	0,8	21	17,2 ^{bc}

Примітка. a:b, a:c, b:c - P<0,001

Після запліднення *in vitro* яйцеклітин свиноматок, що дозріли у різних культуральних середовищах і подальшого культивування протягом 72 годин, спостерігали різний рівень їх дроблення. Так, у 1-му і 3-му варіантах досліду, в яких на етапі мейотичного дозрівання поза організмом ооцитів свиноматок використовували відповідно поживні середовища DMEM і DME/Ham-F-12, загальна кількість *in vitro* отриманих зародків (відповідно 2,1% і 12,7%) була вірогідно меншою (P < 0,001), ніж у 2-му і 4-му варіантах досліду, в яких відповідно використовували середовища M-199 і Ham-F-10, а показник загальної кількості зародків становив – відповідно 22,2% і 17,2%.

Крім того, у 2-му і 4-му варіантах досліду був вищий і показник подальшого дроблення ембріонів (співвідношення зародків, в яких спостерігали більше 2-х бластомерів від загальної кількості отриманих ембріонів),

відповідно 58,3% і 42,9% проти 33,3% та 35,3% відповідно в 1-му та 3-му варіантах досліду.

Висновок. Поживні середовища M-199 і Ham-F-10 є більш придатними для відновлення і завершення мейотичного дозрівання поза організмом ооцитів свиноматок та отримання після запліднення *in vitro* і подальшого культивування зародків свиней, порівняно із середовищами DMEM та DME/Ham – F – 12.

Бібліографічний список

1. Hoshi H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer// Theriogenology. – 2003. – V. 59. – I.1. – P. 675 –685.
2. Current status of embryo technologies in sheep and goat /Y.Cognie, G.Baril, N.Poulin, P.Mermillod //Theriogenology.– 2003.– V.59.– I.2.– P.171 –188.
3. Bovine embryo technologies/ G.Galli, R.Duchi, G. Crotti et all// Theriogenology. – 2003. – V. 59. – I.2. – P. 599–616.
4. Безуглий М.Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин. – Х., 2002. - 155 с.
5. Abeydeera L.R. In vitro production of embryos in swine //Theriogenology. – 2002. – V. 57. – I.1. – P. 257 –273.
6. Transgenic swine for biomedicine and agriculture/ Prather R.M., Hawley R.J., Carter D.B. et all. // Theriogenology. – 2003. – V. 59. – I.1. – P. 115 –123.
7. Enucleation of porcine oocytes / Fulka J., Moor R.M., Loi P., Fulka J. // Theriogenology. – 2003. – V. 59. – I.8. – P. 1879 –1885.
8. Тарадайник Т., Сиротник А. Факторы, влияющие на созревание ооцитов свиней вне организма //Свиноводство .– 1996 .– №4. – С. 30–31.
9. Effect of the volume of medium and number of oocytes during in vitro fertilization embryo development in pigs / Gil M.A., Abeydeera L.R, Day B.N. et al. // Theriogenology. – 2003. – V. 60. – I.4. – P. 767 –776.
10. Effects of oviductal and cumulus cells on in vitro fertilization and embryo development of porcine oocytes fertilized with epididymal spermatozoa / Romar R., Coy P., Ruiz S. et al. //Theriogenology. – 2003. – V. 59. – I.3-4. – P. 975 –986.
11. Nagai T., Niwa K., Iritani A. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes // J. Reprod. Fert. – 1988. – V.70.– P. 271 – 275.
12. Capacitation of bovine sperm by heparin / J.J. Parrish, J.L. Parrish, M.A. Winer, N.L. First // Biol. Reprod. – 1988. – V.38. – P. 1171– 1180.

В статье изложены результаты исследований по оплодотворению in vitro яйцеклеток свиноматок, созревших вне организма в различных культуральных средах (DMEM, M-199, DME/Ham-F-12, Ham-F-10) и получению эмбрионов свиней.

Experimental material on in vitro fertilization of porcine oocytes matured in vitro in various culture medium (DMEM, M-199, DME/Ham-F-12, Ham-F-10) and receiving pigs embryos, has been accounted.