

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ**

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ХІМІЇ ПОВЕРХНІ ІМ. О.О. ЧУЙКА**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ З КРІОКОНСЕРВАЦІЇ
СПЕРМАТОЗОЇДІВ ТА ООЦИТІВ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН І ФОРМУВАННЯ
ЕМБРІОНІВ *IN VITRO***

Чубинське – 2015

УДК 636: 57.086.13:591.391

ББК 45.2:28.63

К 56

Ковтун С.І. Методичні рекомендації з кріоконсервації сперматозоїдів та ооцитів сільськогосподарських тварин і формування ембріонів *in vitro* / Ковтун С.І., Галаган Н.П., Щербак О.В., Троцький П.А. – Чубинське, 2015. – 17 с.

В рекомендаціях узагальнено методичні підходи щодо кріоконсервації гамет (сперматозоїди, ооцити) сільськогосподарських тварин і формування ембріонів *in vitro* з використанням наноматеріалів, які синтезовані на основі високодисперсного кремнезему (ВДК) та біомолекул. Викладені принципові моменти іммобілізації біомолекул на поверхні ВДК та вивчення біологічної активності наноматеріалів. Розглянуті підходи щодо кріоконсервації епідидимальних сперматозоїдів та ооцитів свиней і формування ембріонів *in vitro* з використанням середовищ, які містять наноматеріали.

Рекомендації розраховані на спеціалістів у галузі тваринництва, біотехнологічних і кріобіологічних лабораторій, науковців, викладачів і студентів вищих навчальних закладів біологічного й аграрного профілю.

Рекомендації розробили:

Ковтун С.І. – доктор с.-г. наук (Інститут розведення і генетики тварин ім. М.В.Зубця НААН), Галаган Н.П. – кандидат біол. наук (Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України), Щербак О.В. – кандидат с.-г. наук, Троцький П.А. – кандидат с.-г. наук, (Інститут розведення і генетики тварин ім. М.В.Зубця НААН)

Рецензенти:

Дзіцюк Валентина Валентинівна – доктор с.-г. наук, головний науковий співробітник, в. о. завідувача лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН.

Вишневський Леонід Васильович – кандидат с.-г. наук, завідувач лабораторії біорізноманіття та банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН.

Методичні рекомендації розглянуто і схвалено вченою радою Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (протокол №440 від 11.06.2015 року).

© Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН, 2015 р.

ЗМІСТ

1. Концептуальні засади застосування наноматеріалів для кріоконсервації генетичних ресурсів тварин і формування ембріонів <i>in vitro</i>	4
2. Приміщення та обладнання для роботи з гаметами і ембріонами тварин	6
3. Імобілізація біомолекул на поверхні високодисперсного кремнезему та оцінка ефективності адсорбції	8
4. Вивчення біологічної активності наноматеріалів	10
5. Відбір придатків сім'яників, одержання епідидимальних сперматозоїдів та кріоконсервація гамет	10
6. Оцінка деконсервованих статевих клітин плідників	13
7. Кріоконсервація ооцитів свиней та одержання ембріонів <i>in vitro</i> при використанні середовищ, які містять наноматеріали	13
Рекомендована література	17

1. Концептуальні засади застосування наноматеріалів для кріоконсервації генетичних ресурсів тварин і формування ембріонів *in vitro*

Сучасні нанотехнології інтенсивно використовуються в різних галузях науки і техніки, а практичні розробки застосовуються з високим економічним ефектом. За допомогою нанотехнологій можна маніпулювати речовинами на атомному і молекулярному рівні і це дозволяє отримувати матеріали з новими властивостями. Відомо, що один нанометр (нм.) відповідає 10 атомам водню або 10^{-9} метра, а нанотехнологія – це область прикладної науки, яка використовує об'єкти розміром менше 100 нм. Необхідно зазначити, що в Україні в прикладному ветеринарно-медичному аспекті нанотехнології та отримання наноматеріалів для потреб ветеринарії розпочали розвиватися з 2007 року [2, 10]. Суть цих розробок полягає у використанні наноаквахелатів біогенних металів (Ag, Cu, Zn, Mg, Co) замість неорганічних солей і колоїдних розчинів, що дозволяє знизити їх токсичний вплив на організм тварин. Посилення резистентності організму тварин доведено з використанням вищезазначених наноматеріалів і це дозволяє боротися організму зі збудниками хвороб. Встановлено, що використання дуже малих доз наноаквахелатів металів має стимулюючу і лікувальну дію [2]. Також з 2007 року в Україні почали удосконалюватись біотехнологічні методи відтворення сільськогосподарських тварин з використанням наноматеріалів [3, 6]. Підбір середовищ для *in vitro* культивування гамет і ембріонів тварин, кріосередовищ для тривалого збереження їх генетичного матеріалу необхідно для забезпечення життєздатності і зменшення пошкоджень гамет і ембріонів.

Оптимізація середовищ за допомогою наноматеріалів, до яких належать високодисперсні речовини з розміром частинок не вище 100 нм., є сучасним напрямком розвитку біотехнології [10]. Серед таких речовин особливу увагу слід приділити високодисперсному кремнезему (ВДК). Цей компонент, як сорбент широкого спектру дії, давно використовується в різних лікарських препаратах. Також встановлено, що ВДК у стандартному середовищі для

заморожування стимулює життєздатність еякульованих сперматозоїдів бугаїв [5, 7]. Модифікація поверхні ВДК біомолекулами (моно- і олігоцукрами, альбуміном сироватки крові) дозволяє створювати наноматеріали з метою удосконалення кріосередощ для сперматозоїдів тварин. Поверхня ВДК організована так, що здатна заміщати свої гідроксильні групи на різні сполуки і біомолекули. В результаті цього нанорозмірні частинки ВДК (4 – 40 нм.) використовуються як матриця для синтезу наноматеріалів. Актуальність досліджень полягає у створенні наноматеріалів, які необхідно застосувати як добавки в стандартні середовища, для підвищення виживаності сперматозоїдів після їх низькотемпературної обробки та культивування ембріонів поза організмом (*in vitro*) в технології тривалого зберігання генофонду сільськогосподарських тварин.

Низькотемпературна обробка гамет та ембріонів проводиться із застосуванням спеціальних захисних кріосередовищ, до складу яких входять кріопротектори. До них належать речовини з відносно низькою (нижче 0°C) температурою замерзання, що захищає живі об'єкти від негативної дії низьких температур і які широко використовуються для кріоконсервації гамет та ембріонів. Вони забезпечують цілісність мембран від чисельних розривів, які мають місце внаслідок утворення всередині клітин кристалів льоду із внутрішньоклітинної води. Кількість ушкоджених таким чином клітин може сягати 40 – 50 %. Склад кріосередовищ удосконалюється, досліджуються нові кріопротектори та інші речовини, які дозволяють підвищити кількість життєздатних клітин після кріообробки.

Зважаючи на роль кремнію та його похідних в живих системах, Інститут хімії поверхні ім. О.О.Чуйка НАН України в свій час запропонував як домішку до лактозо-гліцеріно-жовткового (ЛГЖ) стандартного кріосередовища для заморожування сперми бугаїв використати так званий високодисперсний (нанорозмірний) кремнезем (ВДК), який широко відомий як компонент багатьох лікарських засобів. Фізико-хімічні властивості поверхні його наночасток при контакті із клітинами або біомолекулами

проявляють особливості, які пов'язані саме із зміною різних форм молекул води, що обумовлює можливість використання такого кремнезему в біотехнології, яка пов'язана якраз із кріоконсервацією. Виявилось, що саме незначні за концентрацією домішки ВДК до ЛГЖ-кріосередовища перед заморожуванням у ньому сперми бугаїв сприяло цілісності мембран гамет, що надалі зумовило підвищення рівня виживання після розморожування.

З метою підвищення виживаності гамет після їх кріоконсервації, зростання рівня формування ембріонів *in vitro* було запропоновано створити наноматеріали на основі ВДК завдяки іммобілізації на його поверхні деяких біомолекул, які використовуються як компоненти відомих кріосередовищ. Такий підхід забезпечує пролонговану дію речовин, які іммобілізуються на поверхні носія. Як біомолекули, які надалі були використані для закріплення на наночастках ВДК, була запропонована цукроза та білок (альбумін сироватки крові великої рогатої худоби, БСА). Відомо, що вуглеводи в природі виконують роль не тільки енергоємних речовин, але й кріопротекторів. В той же час білок БСА є поверхнево активною речовиною, яка знижує агрегативність наночасток, що важливо при роботі із клітинами.

На основі проведених досліджень щодо використання домішок наноматеріалів, створених на основі ВДК та цукрози або БСА (ВДК+цукроза та ВДК+БСА, відповідно), визначено, що вони можуть бути ефективними на етапі кріоконсервації сперми бугаїв та кнурів. Для культивування розморожених ооцит-кумулясних комплексів тварин нами застосовано ВДК, поверхня якого перед експериментом була оброблена упродовж 2 годин при температурі +200°C.

2. Приміщення та обладнання для роботи з гаметами і ембріонами тварин

Всі експерименти пов'язані з одержанням, кріоконсервацією і культивуванням деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів та сперматозоїдів, а також з формуванням ембріонів *in vitro* проводять у

стерильних умовах спеціально обладнаних боксах. Як бокси можна використовувати окремі ізольовані кімнати, які стерилізують опроміненням ультрафіолетом або інфрачервоними лампами. Для освітлення використовують лампи денного світла. Можна також використовувати ламінарні шафи. Необхідно мати бокс з передбоксником. У передбокснику встановлюють наступне обладнання та прилади: мийку, лабораторний стіл, сушильну шафу, шафу для посуду, шафу для реактивів, холодильник для зберігання поживних середовищ та препаратів, центрифугу, лабораторні та аналітичні ваги, рН-метр, осмометр, пристрій для фільтрування рідин, балони з газом (вуглекислим, киснем) або суміш (5 % CO_2), які обладнані редуктором, змішувачем та дозиметром.

Для ефективної роботи в боксі необхідно мати наступне обладнання в розрахунку на одного дослідника: CO_2 -інкубатор або хоча б біологічний термостат з ексікатором, біокулярна лупа (МБС-9 або МБС-10), інверсійний мікроскоп, аналітичні ваги, центрифуга, шафа для стерильного посуду. Загальна площа боксу з передбоксником повинна бути не менше 20 – 25 м². Стерильність у боксі і передбокснику підтримується за рахунок бактерицидних ламп і обов'язкового використання персоналом спеціального стерильного змінного одягу та взуття. До і після маніпуляцій з гаметами і ембріонами проводять ретельне вологе прибирання приміщень. Всі поверхні столів, обладнання і приладів протирають 70 %-вим розчином етилового спирту. Стерилізацію внутрішньої поверхні CO_2 -інкубатора, термостата і ексікатора проводять фламбуванням. Для підтримки стерильності повітря у боксі можна використовувати спеціальні протибактеріальні фільтри.

Для виділення ооцит-кумулясних комплексів із яєчників корів необхідно мати скальпель зі змінними лезами, або лезо безпечної бритви. Всі наступні маніпуляції з клітинами краще всього здійснювати за допомогою піпетки (діаметр кінчика 150 – 250 мкм.). Для приготування культуральних середовищ використовують флакони, або колби об'ємом 10 – 50 мл., дозатори. Культивування ооцит-кумулясних комплексів та ембріонів

найкраще проводити в стерильному одноразовому посуді. Ретельне оброблення посуду є необхідною умовою при роботі з гаметами та ембріонами тварин. Посуд використовують із нейтрального скла та пластику.

Інструмент для роботи з гаметами та ембріонами повинен бути чистим та стерильним (чашки Петрі, піпетки, дозатори з насадками, флакони, центрифужні пробірки та ін.). Перед стерилізацією скляний посуд ретельно миють, споліскують у проточній воді і тричі дистильованою водою, сушать і стерилізують. Стерилізацію кип'ятінням проводять тільки для скляних, металевих і гумових інструментів. Час кип'ятіння – 30 – 45 хв.

Металевий інструмент миють під проточною водою, потім спеціальним миючим засобом (типу 7X або 10X), споліскують дистильованою водою, висушують і стерилізують сухим жаром за температури +150 – +200°C. Інструменти промивають із миючим засобом, споліскують водопровідною та дистильованою водою, висушують і для стерилізації вміщують на 20 – 30 хв. в 70 %-вий розчин етилового спирту.

Вироби з гуми промивають проточною водою, потім миючим засобом, споліскують дистильованою водою і стерилізують методом кип'ятіння упродовж 20 – 30 хв. у дистильованій воді. Зберігають пробки і піпетки в 70 %-му розчині етилового спирту. Скло посуд після проведення експериментів промивають проточною водою, потім миючим засобом, споліскують дистильованою водою і кип'ятять 30 – 40 хв. Потім посуд підсушують у сушильній шафі вниз горловиною, щільно накладають алюмінієву фольгу та ставлять на стерилізацію сухим жаром за температури +180 – +200°C упродовж 1,5 – 2 год. Стерильний посуд зберігають у боксах.

3. Імобілізація біомолекул на поверхні високодисперсного кремнезему та оцінка ефективності адсорбції

В роботі використовують ВДК із гідроксильованою поверхнею (марка А-300) із $S_{\text{пит}}=285 \text{ м}^2/\text{г}$ (Україна, м. Калуш), олігоцукри – лактозу, цукрозу та рафінозу («Sigma») та БСА («Fluka»).

Імобілізацію зазначених біомолекул на поверхні ВДК проводять, використовуючи фізичну адсорбцію із водної фази відповідно загальноприйнятої методики. Співвідношення адсорбат:адсорбент становить 1:10; вихідні концентрації для олігоцукрів: для цукрози – 1,563 – 50 мкг/мл, для рафінози – 1,563 – 70 мкг/мл; для БСА – 1 – 14 мг/мл. Білок адсорбують при рН = 4,8. Час адсорбції для олігоцукрів та БСА – 2 год. при постійному струшуванні. Осад адсорбенту видаляють центрифугуванням 10 хв. при 3000 об/хв., висушують ($t = +37^{\circ}\text{C}$) та механічно подрібнюють для використання в подальших дослідженнях. В надосадовій рідині вимірюють концентрацію зазначених речовин за методами: для цукрози – [11], для білка – [9]. Розраховують величину адсорбції за формулою [12]: $A = (C_{\text{вих}} - C_{\text{рівн}})V/m$, де $C_{\text{вих}}$ і $C_{\text{рівн}}$ – відповідно вихідна та рівноважна концентрації в розчині, мг/мл; V – об'єм розчину, мл; m – маса адсорбенту, г. Виміри проводять на спектрофотометрі «Lambda-35» («Perkin-Elmer»), а також фотоелектроколориметрі «КФК-2».

Ефективність адсорбційних взаємодій біомолекул із адсорбентом оцінюють за ізотермами адсорбції. Розрахунок величин граничної адсорбції A_{∞} виконують згідно [1]. Десорбцію біомолекул із поверхні ВДК проводять за такими режимами, як і процес адсорбції. Для цього до наважок висушеного адсорбенту додають воду у зазначених вище співвідношеннях. Надалі процес обробки проб ідентичний як після адсорбції.

Для підтвердження даних адсорбційних експериментів використовують метод ІЧ-спектроскопії. Для цього досліджують наноматеріали в області довжин хвиль $4000 - 400 \text{ см}^{-1}$ на спектрофотометрі «Thermo Nicolet Nexus FTIR» із використанням приставки дифузного відбиття «SMART Collector». Їх зразки змішують із попередньо підсушеним KBr («Riedel-de Haen», Франція) в співвідношенні 1:19 (для білка) та 1:4 (для вуглеводів). При обробці спектрів використовують програмне забезпечення «Omnic». Ефективність взаємодії біомолекул із поверхнею ВДК оцінюють за

інтенсивністю смуг поглинання при 3750 см^{-1} , які характерні для силанольних груп [4].

4. Вивчення біологічної активності наноматеріалів

Біологічну активність наноматеріалів вивчають методом лазерно-доплеровської спектроскопії на атестованому програмно-апаратному комплексі «Spectrolas Instruments. Model LDS MQE» (Україна) за параметрами руху сперматозоїдів після їх розморожування в 2,9 %-му розчині цитрату натрію в умовах лабораторії. Діапазон досліджуваних концентрацій наноматеріалів становить 0,0025 % – 0,6 %. Співвідношення об'ємів розмороженої сперми та суспензій наноматеріалів – 1:3. Виміри проводять після інкубації сперми із наноматеріалом за $t = +37^\circ\text{C}$ упродовж 1 год. Гамети освічують лазером He-Ne із довжиною хвилі 632,8 нм у кюветах об'ємом 1 мл упродовж 3 хв. Дію наноматеріалу на клітини оцінюють за кількістю рухливих клітин (%), частотою їх обертання (гц.), швидкістю (мкм/сек.) та енергією руху (ум. од.) Параметр «енергія руху» відображує витрати енергії на рух клітин у в'язкому середовищі, що розраховується за формулою: $N = \gamma \cdot V^2$, де N – енергія руху, γ – коефіцієнт, який залежить від форми, розмірів спермій та властивостей середовища, а V – швидкість руху клітин. Результати одержують із урахуванням зниження активності гамет із часом за відношенням до контрольної проби, до якої не додавали наноматеріали. Параметри руху для контролю приймають за 100 %. Біоактивність наноматеріалів оцінюють за відношенням сумарних показників дослідного зразку та контролю за весь час вимірювання. В діапазоні зазначених вище концентрацій наноматеріалів методом фазово-контрастної мікроскопії досліджують процес їх агрегації в присутності сперматозоїдів.

5. Відбір додатків сім'яників, одержання епідидимальних сперматозоїдів та кріоконсервація гамет

Одразу після забою або кастрації кнурів, сім'яники відділяють від

мошонки. Сім'яники з додатками розміщують у стерильні марлеві серветки і транспортують за температури +4°C. Під час відбору додатків звертають увагу на сітку каналців хвоста додатка – відбирають лише з розвинутими каналцями. Після доставки сім'яників у лабораторію готують розбавник.

Для заморожування епідидимальних сперматозоїдів кнурів у формі відкритих гранул використовують ЛГЖ-середовище або «Біоконсан» (партія №247). Готують розбавник тільки на деіонізованій воді з рН не нижче 5. Штучні середовища готують з використанням сухих заготовок або компонентів у день розбавлення сперми, чітко дотримуючись умов стерильності. Розбавники використовують упродовж 3 – 4 год. з моменту приготування. Для приготування середовищ для розбавлення сперматозоїдів, які вилучають із епідидимісів, спочатку вливають деіонізовану воду, підігріту до +70 – +80°C, а потім вносять за рецептом всі компоненти, за виключенням гліцерину і жовтка курячого яйця, фільтрують через бактеріальний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. («Sigma», Z-359904). Після охолодження цього розчину до +35 – +40°C додають канаміцин сульфат (0,06 мг/мл, ВАТ «Київмедпрепарат»), жовток курячого яйця і 10 % гліцерину («Sigma», G-2025). Після доставки сім'яників у лабораторію здійснюють відокремлення додатків від сім'яників. Придаток сім'яника обробляють розчином 70 %-го етилового спирту.

Для зручності вилучення сперматозоїдів проводять відділення хвостової частини епідидиміса та звільнення звитих каналців від оболонки. Сперматозоїди одержують шляхом проведення паралельних щільних розрізань звитих каналців стерильним скальпелем, намагаючись не пошкодити кровоносні судини (рис. 1).

Суміш гамет, що виділяється, збирають за допомогою стерильного наконечника одноканальної піпетки змінного об'єму («Ленпипет Колор», кат. № 40270302) і переносять у стерильну пробірку з 1 мл. розбавника. Надрізи роблять не дуже глибокі, щоб в разі необхідності можна було повторити надрізи в поперечному напрямку.



Рис. 1. Вилучення епідидимальних сперматозоїдів кнурів із хвостової частини придатка

Для заморожування у формі відкритих гранул (150 – 200 млн. гамет у гранулі об'ємом 0,2 мл.) свіжоотриманих епідидимальних сперматозоїдів кнурів застосовують ЛГЖ-кріосередовище та «Біоконсан» з додаванням 10 % жовтка курячого яйця та 10 % гліцерину. Після розбавлення всього секрету із одного придатка досліджують рухливість і морфологію сперматозоїдів під мікроскопом. Пробірку залишають на 15 хв. за кімнатної температури (+20 – +21°C). Через 15 хв. пробірку переносять для еквілібрації сперматозоїдів у холодильник (+4°C) на 3 год. За цей період готують розбавник з 10 % гліцерину і переносять у холодильник. Через 3 год. суспензію перемішують, повертаючи пробірку “верх-дно” і додають розбавник з гліцериним 1:1.

До еякулюваних сперматозоїдів бугаїв і до епідидимальних сперматозоїдів кнурів після розморожування додають наноматеріали в концентрації 0,1; 0,01 і 0,001 % і візуально оцінюють активність і виживання гамет.

Заморожування здійснюють у рідкому азоті на фторопластовій пластині. Попередньо охолоджують у рідкому азоті пластину і розмістивши її в парах азоту, наносять суміш сперматозоїдів по 0,2 мл. для заморожування. Після розміщення гамет на фторопластову пластину вона перебуває до 5 хв. в парах азоту. Потім її занурюють у азот на декілька секунд, після чого знімають гранули з пластини пінцетом.

Через добу після заморожування епідидимальних сперматозоїдів перевіряють гамети на рухливість і виживаність у 2,9 %-му розчині цитрату натрію. Рухливість оцінюють одразу після розморожування і виживаність за температури +38°C.

6. Оцінка деконсервованих статевих клітин плідників

Активність деконсервованих гамет плідників визначають під мікроскопом при збільшенні 400 разів за температури +37°C та виражають у відсотках сперматозоїдів із прямолінійним поступальним рухом від загальної кількості. Виживаність сперматозоїдів визначають за температури +37°C під мікроскопом. Через кожні 30 хв. оцінюють загальну рухливість гамет і підраховують час до повного припинення руху.

Біологічну активність наноматеріалів визначають за параметрами активності руху гамет після додавання його до деконсервованої сперми. НМ у вигляді 0,01- та 0,001 %-ої концентрації додавали до 2,9 %-го розчину цитрату натрію в якому безпосередньо здійснювали розморожування сперми. Біологічну активність наноматеріалів визначають за співвідношенням сумарних показників у досліді до контролю за весь період визначення. До сперматозоїдів, які тривалий час зберігаються кріоконсервованими, безпосередньо перед заплідненням яйцеклітин *in vitro* або штучним осіменінням рекомендуємо додавати наноматеріали в певних концентраціях для забезпечення зростання динамічних характеристик таких сперматозоїдів, що обов'язково призведе до покращеного результату.

7. Кріоконсервація ооцитів свиней та одержання ембріонів *in vitro* при використанні середовищ, які містять наноматеріали

Відбір яєчників проводять від клінічно здорових самок (рис. 2, 3). Ооцити корів і свиней отримують шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів яєчників, вимивають середовищем Дюльбекко, виловлюють

пастерівською піпеткою та оцінюють за морфологічними ознаками. Для заморожування використовують оцити із гомогенною тонкозернистою ооплазмою, нешкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом (рис. 4).



Рис. 2. Яєчники корів на стадії фолікулярного росту



Рис. 3. Яєчники корів з пізнім жовтим тілом



Рис. 4. Зажиттєве фото придатних для культивування *in vitro* ооцит-кумулюсних комплексів свиней. Об. 10х, ок. 10х



Перед заморожуванням гамети обробляють 10 хв. еквілібраційним розчином (10 % гліцерин + 20 % пропандіол), потім переносять у вітрифікаційний розчин (25 % гліцерин + 25 % пропандіол). Еквілібраційний та вітрифікаційний розчини готують на середовищі Дюльбекко з додаванням 20 % сироватки крові корів («Sigma»), яку попередньо інактивують при +56°C упродовж 30 хв.

Після розморожування ооцитів виведення кріопротекторів проводять шляхом перенесення їх на 10 хв. у розчин 1,0 М сахарози. Потім клітини

тричі відмивають середовищем 199, оцінюють за морфологічними ознаками і переносять у середовище для культивування. Ооцити культивують у чотирьохлункових планшетах упродовж 44 год. за температури +38,5°C, 5 % CO₂ у повітрі, в краплях середовища 199 з 10 % попередньо інактивованою еструсною сироваткою крові корів, 2,0 мМ натрію пірувату, 2,92 мМ кальцію лактату, 40 мкг/мл гентаміцину. Деконсервовані ооцити після культивування поза організмом підлягають заплідненню *in vitro*.

Для запліднення *in vitro* яйцеклітин свинок використовують сперматозоїди кнурів. Капацитацію гамет здійснюють гепарином (100 од/мл). Після 18 год. спільного інкубування яйцеклітини і зиготи відмивають від сперми і переносять у краплі середовища для подальшого культивування після запліднення *in vitro* за температури 38,5°C та 5 %-му вмісті CO₂ в повітрі, з додаванням 20 % фетальної сироватки теляти («Sigma») та з використанням моношару клітин кумулюсу. Клітини кумулюсу отримують від ооцит-кумулясних комплексів під час постановки клітин на дозрівання. Моношар клітин кумулюса формується після попереднього 27 – 42-годинного культивування в середовищі 199 з додаванням 20 % фетальної сироватки теляти і 40 од/мл гентаміцину.

Для зростання рівня життєздатності і розвитку поза організмом ембріонів, отриманих з розморожених гамет додають наноматеріал ВДК 200°C (концентрація – 0,001 %). Ооцити розподіляють на дві групи: дослідну в якій ембріони культивують із додаванням ВДК 200°C та контрольну – без додавання НМ. Дію ВДК 200°C оцінюють упродовж 96-ти годинного культивування за морфологічним і цитогенетичним аналізами.

Цитогенетичні препарати готують за методом Ushijima M. та ін. Ембріони розміщують на 2 хв. у 0,8 %-ний гіпотонічний розчин 3-х заміщеного цитрату натрію і фіксують сумішшю метанол:оцтова кислота:деіонізована вода = 3:2:1 на сухому знежиреному склі та фарбують 2%-ним розчином барвника Гімза («Fluka») з наступним аналізом під світловим мікроскопом.

Отримання ооцитів, їх морфологічну оцінку та відбір, заморожування-розморожування, постановка на дозрівання поза організмом, запліднення *in vitro* та подальше культивування після запліднення проводять у стерильних умовах боксу. Температуру у боксі підтримували на рівні +20 – +25°C.

Отже, додавання ВДК 200°C в концентрації 0,001 % не тільки немає негативного впливу на формування зигот свиней та дроблення ембріонів, а ще й сприяє отриманню більшої кількості ембріонів розвинутих *in vitro* до стадії ранньої морули. Таким чином, встановлено, що додавання наноматеріалів, які синтезовано на основі високодисперсного кремнезему, забезпечує оптимізацію середовища для культивування *in vitro* ембріонів свиней і сприяє розвитку ембріонів до доімплантаційних стадій розвитку поза організмом.

Нами розроблено елементи біотехнологічної моделі застосування наноматеріалів у технології формування *in vitro* ембріонів свиней. Доведено, що додавання ВДК 200°C в $C = 0,001$ % сприяє отриманню більшої кількості ембріонів розвинутих *in vitro* до стадії ранньої морули. Для стабільного та результативного рівня одержання та розвитку *in vitro* ембріонів свиней можна успішно застосовувати наноматеріали у складі середовища для культивування зародків поза організмом, оскільки кремнезем контактуючи із біологічними системами на різних етапах природних процесів бере пряму участь у життєвих процесах.

Рекомендована література

1. Айвазов Б.В. Практикум по химии поверхностных явлений и адсорбции.-М.: Высшая школа, 1973. – 208 с.
2. Борисевич В. Б. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії / В. Б. Борисевич, В. Г. Каплуненко, М. В. Косінов та ін. – К. : ВД «Авіцена», 2010. – 416 с.
3. Буркат В.П., Ковтун С.И., Галаган Н.П. Нанобиотехнологические методы для сохранения генофонда // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных» – Дубровицы – Быково, 2007. – С. 450 – 452.
4. Гунько В.М., Туров В.В., Горбик П.П. Вода на границе раздела фаз. К.: Наук. думка, 2009. – 694 с.
5. Ковтун С. І. Вплив наноматеріалів на ефективність ембріогенезу *in vitro* / С. І. Ковтун // Вісн. аграр. науки. – 2009. – № 1. – С. 49 – 53.
6. Ковтун С.І., Куновський Ю.В., Галаган Н.П. Вплив наноматеріалів на заплідненість яйцеклітин свиней // Тваринництво України. – 2007. – №2. – С.72 – 74.
7. Ковтун С.І., Галаган Н.П., Кліменко Н.Ю. Использование нанобиоматериалов в технологии криоконсервирования генетических ресурсов животных / материалы международной научно-практической конференции «Достижения и перспективы зоотехнии, биотехнологии и ветеринарной медицины» – Максимовка – Молдова, 2011 – С. 386 – 390.
8. Ковтун С.І. Використання наноматеріалів для ефективного формування ембріонів свиней *in vitro* / Ковтун С.І., Щербак О.В., Зюзюн А.Б., [та ін.] // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. пр. – 2012. Т. 4. – С. 513 – 518.
9. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии.-М.: Высшая школа, 1980. – 215 с.
10. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния /Под редакцией А.А.Чуйко – Київ, Наукова думка. 2003. – 415с.
11. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. – К.: Наук. Думк, 1976. – 334 с.
12. Чуйко А.А., Власова Н.Н., Давиденко Н.К., Погорелый В.К. Адсорбционное взаимодействие высокодисперсного кремнезема с биомолекулами // В кн. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния/ Под ред. А.А.Чуйко.- К.: Наук. Думка, 2003.- С.116 – 152.