

ЗАСТОСУВАННЯ НАНОМАТЕРІАЛУ В ЕМБРІОГЕНЕТИЧНІЙ СИСТЕМІ *IN VITRO* ОТРИМАННЯ ЕМБРІОНІВ СВИНЕЙ

Наразі сучасні нанотехнології інтенсивно використовуються в різних галузях науки та техніки, і такі інноваційні наукоємні розробки ефективно застосовуються з високим економічним ефектом. Доведено, що за допомогою нанобіотехнологій можливо маніпулювати речовинами на атомному та молекулярному рівнях, що в свою чергу забезпечує отримання матеріалів із новими властивостями.

Однак слід зазначити, що, незважаючи на інтенсивні дослідження наноматеріалів (НМ), питанням безпеки їх застосування приділялося досить мало уваги. На думку спеціалістів з Королівського товариства та Королівської інженерної академії Великої Британії, у 2004 р. такий напрям досліджень не мав розвитку у нанотехнологічній індустрії (Department for Environment, Food and Rural Affairs, 2007). З того часу дослідження негативного впливу НМ на живі організми та екологію активізувалося в усіх країнах світу. Показано, що НМ можуть спричиняти цитотоксичні ефекти, оксидативний стрес та запальну відповідь [1–3]. Шляхом утворення вільних радикалів і активних форм кисню НМ можуть викликати перекисне окиснення ліпідів у клітинах, денатурацію білків і ушкодження нуклеїнових кислот. Це призводить до зниження життєздатності клітин з подальшими фізіологічними, біохімічними, морфологічними змінами [4, 5]. На рівні органів вплив НМ можна помітити майже спочатку, клітинний рівень ушкодження має прихований характер. Важливим завданням нанобіотехнології є вплив НМ на геном та ДНК з метою встановлення не лише механізму їх позитивної дії, але й аналізу стану досліджень у галузі наноембріології. Тому питання безпеки застосування НМ залишається наразі актуальним [6, 7].

Найчастіше дія НМ вивчається в експерименті на тваринах або на культурах клітин [8, 9, 10].

Показано, що НМ можуть взаємодіяти із ДНК під час мітозу, коли цілість ядерної мемб-

рани порушується до утворення у дочірніх клітинах. Потрапляючи безпосередньо до ядра клітини, НМ можуть взаємодіяти з молекулою ДНК або з ядерними білками, що призводить до фізичного ушкодження генетичного матеріалу [11, 12]. Пошкодження ДНК може бути посереднім, у тому випадку коли НМ взаємодіють не з ДНК, а з білками клітини, які задіяні у процесах поділу клітин. НМ також можуть індукувати інші реакції в клітинах (оксидативний стрес, запалення, порушення в ланцюгу внутрішньоклітинної передачі сигналу), які, в свою чергу, призводять до негативних ефектів.

Оптимізація моделі культивування соматичних та статевих клітин тварин на основі застосування НМ, наразі є актуальним завданням у системі розробки та удосконалення ефективних способів отримання *in vitro* яйцеклітин, доїмплантаційних ембріонів, ембріональних та стовбурових клітин [13–15].

Потенціальними структурними одиницями культуральних середовищ є наноматеріали на основі високодисперсного кремнезему (ВДК). За умови збереження індивідуальних властивостей ВДК при консолідації з біомолекулами можна створювати наноматеріали з унікальними якостями, не притаманними аналогам. Новою тенденцією до синтезу наноматеріалів є біологічний синтез із використанням полімерних матриць, які нетоксичні і можуть бути легко синтезовані в будь-якій формі, необхідній для певного способу застосування. До подібних матриць можна віднести такі різні біополімери, як крохмаль, хітозан, циклодекстрин та високодисперсний кремнезем котрі діють в якості стабілізатора та відновлювального агента. Застосування біополімерів у виробництві НМ має кілька переваг порівняно зі звичайними синтетичними реагентами. Високомолекулярні ланцюги таких біополімерів володіють великим числом гідроксильних груп. Такі структури можуть утворювати комплекси з цільовими молекулами, які забезпечують контроль

розміру, форми і дисперсності НМ, що і робить їх менш токсичними до клітин ссавців [16, 17]. Високодисперсний кремнезем володіє унікальним комплексом фізико-хімічних і медико-біологічних властивостей (висока сорбційна ємність до білків, токсинів, відсутність алергенної та шкідливої дії на клітини, активація репаративних процесів).

Метою наших досліджень було вивчення впливу НМ (ВДК/N-Gal) на мейотичні перетворення ооцитів свиней при дозріванні в умовах *in vitro* та їх подальший розвиток поза організмом.

До поверхні ВДК був імобілізований аміноцукор N-галактозамін. Галактозамін є похідним від гексозаміна галактози. Ці аміноцукри є складовою частиною деяких глікопротеїнових гормонів, таких як фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) і лютеїнізуючого гормону (ЛГ). Інші цукрові компоненти ФСГ і ЛГ включають глюкозамін, галактозу і глюкозу. Саме ці гормони відіграють ключову роль в дозріванні яйцеклітин ссавців. Передбачалось, що додавання НМ на основі ВДК та N-Gal призведе до еквілібрації гормонального фону культурального середовища для дозрівання ооцитів ссавців поза організмом, що в свою чергу сприятиме формуванню більшої кількості дозрілих яйцеклітин і підвищенню рівня дроблення ембріонів.

Матеріали і методи

Дослідження проведено в лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, дослідний зразок НМ (ВДК/N-Gal) синтезовано в Інституті хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України.

Для проведення досліджень яєчники одержували від забитих клінічно здорових свинок віком 6–8,5 міс. Ооцит-кумулясні комплекси (ОКК) вилучали шляхом розсічення стінок антральних фолікулів. Відібрані ооцити ($n = 261$) дозрівали *in vitro* упродовж 46 годин в середовищі ТСМ 199 (Sigma, М-5017) з 20 % еструсної сироватки крові корів (ЕС) і $3\text{--}5 \times 10^6$ клітин гранулози/мл. Для культивування поза організмом відбирали ооцити із щільним та розпушеним кумулюсом. Гамети культивували за температури $+38,8^\circ\text{C}$ і 4 % CO_2 у повітрі. Вилучені ОКК свиней розділяли на дві групи: дослідну, в якій культивування проводили в середовищі, що містило 0,001 %-ну концентрацію ВДК/N-Gal і контрольну, в якій культивування ОКК проводили без додавання наноматеріалу. Критерієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів була на-

явність першого полярного тільця. Для запліднення *in vitro* яйцеклітин свинок використовували кріоконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура. Співкультивування дозрілих *in vitro* яйцеклітин свиней та відібраних методом swim-up сперматозоїдів кнура проводили у модифікованому середовищі Тіроде (TALP) упродовж 18 годин. Після співкультивування зиготи переносили в середовище NCSU-23 (North Carolina State University-23).

Рівень дозрівання ооцитів *in vitro*, запліднення та аналіз стану хроматину ядер ембріонів вивчали шляхом аналізу цитогенетичних препаратів, які готували за модифікованим методом А. Тарковського [18, 19]. Препарати фарбували 2 %-ним розчином барвника Гімза і аналізували під світловим мікроскопом Jenaval, Carl Zeiss окЧ10, обЧ100. Статистичну обробку одержаних даних проводили з використанням критерію Ст'юдента.

Результати та обговорення

Враховуючи встановлений попередніми дослідженнями позитивний вплив використання асоційованих з ВДК моноцукрів, які були додані в 0,001 %-ій концентрації до кріоконсервованих сперматозоїдів бугаїв [20], наступні дослідження були спрямовані на вивчення ефективності додавання тієї ж концентрації ВДК/N-Gal у середовище для культивування *in vitro* ооцитів свиней.

Після культивування *in vitro* упродовж 46 годин за морфологічною оцінкою та даними цитогенетичного аналізу встановлено вірогідну різницю між контрольною та дослідною групою ($p < 0,05$, критерій Ст'юдента), в кількості ооцитів, які не відновили мейотичне дозрівання та залишились на стадії диплотени (табл. 1). Кількість таких гамет склала 19,4 % в контрольній групі, а в дослідній групі цей показник не перевищив 8,9 % (рис. 1, 2). Отримані результати вказують, що додавання 0,001 %-ої концентрації ВДК/N-Gal сприяє кращому цитоплазматичному дозріванню ооцитів свиней в умовах *in vitro*.

Найбільша частина ооцитів, в обох групах, після культивування упродовж 46 годин досягла стадії ядерного дозрівання телофази I пізньої – метафази II, що вказує на достатньо високий загальний рівень дозрівання (75,9 %). Встановлено вірогідну різницю між досліджуваними групами в кількості ооцитів, які досягли стадії метафази II в умовах *in vitro*, так у дослідній групі (із додаванням 0,001 %-ої концентрації ВДК/N-Gal) цей

Вплив ВДК/N-Gal на ефективність мейотичних перетворень ооцитів свиней *in vitro*

Група	Всього ооцитів, n	Стадії розвитку ОКК <i>in vitro</i>			Дегенерованих ооцитів, n (%)
		диплотена, n (%)	телофаза, n (%)	метафаза II, n (%)	
контрольна	160	31 ^a (19,4 ± 3,1)	5 ^c (3,1 ± 1,4)	113 ^d (70,6 ± 3,6)	11 (6,9 ± 2,0)
дослідна (0,001 % ВДК/N-Gal)	101	9 ^b (8,9 ± 2,8)	2 ^c (2,0 ± 1,4)	85 ^e (84,2 ± 3,6)	5 ^e (4,9 ± 2,1)

Примітки: a, b, d, e – різниця статистично вірогідна порівняно до максимального значення з $P < 0,05$, критерій Ст'юдента. Різні суперскрипти у межах однієї колонки вказують на вірогідну різницю між показниками.

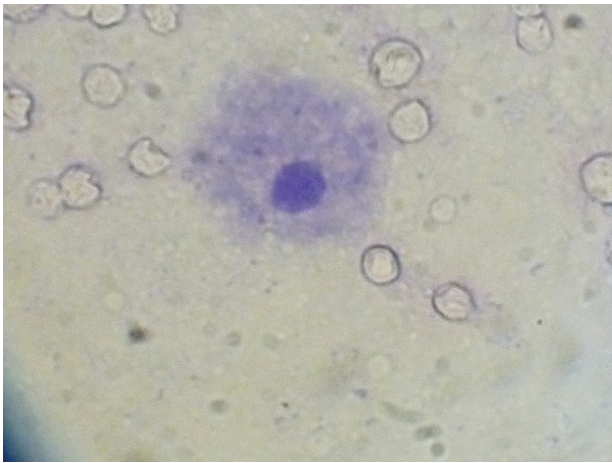


Рис. 1. Цитогенетичний препарат ооциту свині на стадії диплоти. Збільшення в 1000 раз

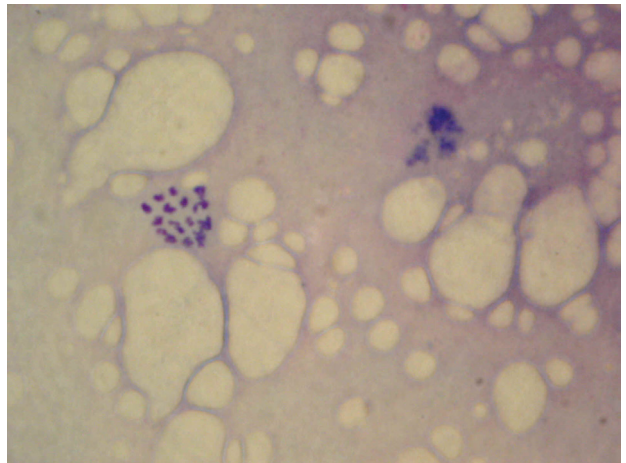


Рис. 2. Цитогенетичний препарат ооциту свині після дозрівання *in vitro* на стадії пізньої телофази. Збільшення в 1000 раз

показник був на 13,6 % вище, порівняно з контрольною (70,6 % ± 3,6).

Слід відмітити, що загальна частина гамет з дегенерованим хроматидним матеріалом не перевищувала 6,1 % і суттєво не різнилась між порівнюваними групами.

З метою дослідження повноцінності дозрівання *in vitro* ооцитів свиней проводили їх запліднення кріоконсервованими сперматозоїдами кнура. За результатами експериментальних досліджень встановлено вірогідну різницю між рівнем формування поза організмом зигот і кількістю ембріонів (рис. 3, 4) у досліджуваних групах ($p < 0,05$, критерій Ст'юдента). Встановлено, що у дослідній групі зигот було сформовано поза організмом на 11,0 % більше ніж в контрольній (31,8 % ± 4,9), також вищий на 15,1 % рівень дроблення ембріонів (табл. 2) спостерігали в дослідній групі, порівняно із контрольною (18,2 % ± 4,1).

Отже, додавання 0,001 %-ої концентрації ВДК-N-Gal до середовища для дозрівання ооцитів свиней не тільки не виявляє негативного

впливу на дозрівання та формування зигот у свиней, а й забезпечує більш ефективний розвиток ембріонів поза організмом. Додавання 0,001 %-ої концентрації ВДК/N-Gal сприяє підвищенню рівня ооцитів, які розвинулись до метафази II в умовах *in vitro* до 84,2 % (85 із 101), завдяки забезпеченню активізуючих умов в середовищі для дозрівання ооцитів. Додавання ВДК/N-Gal у 0,001 %-вій концентрації забезпечило повноцінне дозрівання ооцитів свиней, що дозволило збільшити рівень дроблення ембріонів *in vitro* на 15,1 %.

Таким чином, встановлено, що додавання наноматеріалу, який синтезовано на основі вискодисперсного кремнезему та аміноцукру, забезпечує оптимізацію середовища для культивування *in vitro* ооцитів свиней і сприяє кращому розвитку ембріонів поза організмом.

Висновки

1. Розроблено систему оптимізації в умовах *in vitro* біологічної активності наноматеріалів та удосконалено методи біотехнологічних маніпу-

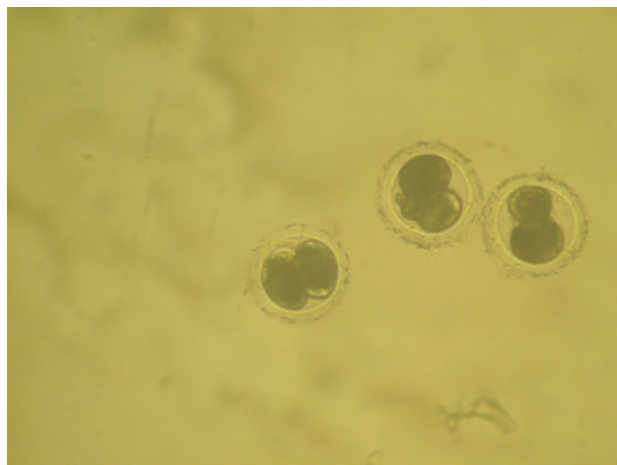


Рис. 3. Двохклітинні ембріони свиней отримані *in vitro*. Збільшення в 100 раз

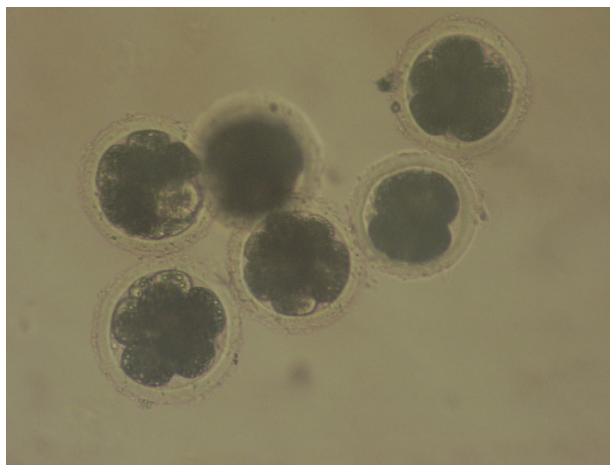


Рис. 4. Ембріони свиней на стадії ранньої морули. Збільшення в 100 раз

Таблиця 2

Вплив ВДК/N-Gal у 0,001 %-ній концентрації на розвиток ембріонів свиней *in vitro*

Група	Запліднено ооцитів, n	Кількість, n (% ± m)		
		зигот	2-4-клітинних ембріонів	ранніх морул
Контрольна	88	28 ^a (31,8 ± 4,9)	16 ^b (18,2 ± 4,1)	5 ^c (5,7 ± 2,4)
Дослідна (0,001 % ВДК/N-Gal)	63	27 ^a (42,8 ± 6,2)	21 ^c (33,3 ± 5,9)	9 ^e (14,2 ± 4,4)

Примітки: b:c, – різниця статистично вірогідна порівняно до максимального значення з P<0,05, критерій Ст'юдента.

ляцій із гаметами самиць у системі раціонального використання та відтворення вітчизняних порід сільськогосподарських тварин.

2. Апробована розроблена методика оцінки в умовах *in vitro* біологічної активності наноматеріалу.

Показано, що 0,001 %-ва концентрація наноматеріалу (ВДК/N-Gal) додана до середовища дозрівання *in vitro* ооцитів свиней забезпечила формування ембріонів свиней на рівні 33,3 % (21 ембріон із 63 осіменених яйцеклітин).

ЛІТЕРАТУРА

- Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel // Science. – 2006. – N 311 (5761). – P. 622–627.
- Sayes C.M., Reed K.L., Warheit D.B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles // Toxicology Science. – 2007. – N 97 (1). – P. 163–180.
- Stone V., Kinloch I.A., Clift M., Fernandes T., Ford Alex., Christofi N., Griffiths A. and Donaldson K. Nanoparticle toxicology and ecotoxicology: the role of oxidative stress. In: Y. Zhao, H.S. Nalwa (Eds.) Nanotoxicology: interactions of nanomaterials with biological systems, American Scientific Publishers. 2006. –300 p.
- Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles // Environ. Health Perspect. – 2005. – N 113 (7). – P. 823–839.
- Москаленко В.Ф., Яворовський О.П. Екологічні і токсиколого-гігієнічні аспекти біологічної безпеки нанотехнологій, наночастинок та наноматеріалів // Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О.О. Богомольця. – 2009. – № 3. – С. 25–35.
- 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, December 14–16. – К., 2006. – P. 62.
- Coy P., Ruiz S., Romar R., Campos I., Gadea J. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different system // Theriogenology. – 1999. – 51. – P. 799–812.
- Михайленко В.М., Михайленко П.М., Слейко Л.О. Нанотехнології – перспективи застосування та ризику для здоров'я людини // Онкологія. – 2008. – № 10 (4). – С. 420–426.
- Landsiedel R., Kapp. M.D., Schulz M., Wiench K., Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations – many questions, some answers // Mutat. Res. – 2009. – N 681 (2–3). – P. 241–258.

10. Lindberg H.K., Falck G.C., Suhonen S., Vippola M., Vanhala E., Catalan J., Savolainen K., Norppa H. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells *in vitro* // *Toxicol. Lett.* – 2009. – N 186 (3). – P. 166–173.
11. Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schurch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Im Hof V., Heyder J., Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells // *Environ. Health Perspect.* – 2005. – N 113 (11). – P. 1555–1560.
12. Liu L., Takenaka T., Zinchenko A.A. Cationic silica nanoparticles are efficiently transferred into mammalian cells // *International Symposium on Micro-Nanomechanics and Human Science*, 11–14 Nov. – Nagoya, 2007. – P. 281–285.
13. Галаган Н.П., Клименко Н.Ю., Орел И.Л., Новикова Е.А., Туров В.В. Биофункциональные наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема, белка и аминокислот // *Biopolymers and Cell.* – 2010. – 26, N 3. – P. 205–213.
14. Галаган Н.П., Ковтун С.І., Грищенко І.В. Вплив нанокмозиту з білком на життєздатність кріоконсервованих гамет кнурів // *Матеріали ІХ Укр. біохімічного з'їзду.* – 2006. – 2 – С. 144–145.
15. Ковтун С.І., Галаган Н.П. Влияние наноматериалов на получение эмбрионов свиней вне организма // *Материалы II Всерос. науч. конф. с международным участием «Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья».* – М. – Белгород, 2006. – С. 106–109.
16. Буркат В.П., Ковтун С.І., Галаган Н.П. Нанобиотехнологические методы для сохранения генофонда // *Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных».* – Дубровицы – Быково, 2007. – С. 450–452.
17. *Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния* / под ред. А.А. Чуйко. – К.: Наукова думка, 2003. – 415 с.
18. Prather R.S. Nuclear control of early embryonic development in domestic pigs // *J. Reprod. Fertil.* – 1993. – 48. – P. 17–29.
19. Tarkowski A.K. An air – drying method for chromosome preparation from mouse eggs // *Cytogenetics.* – 1966. – N 5, 3. – P. 394–400.
20. Галаган Н.П. Наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема и биомолекул в средах с репродуктивными клетками // *Материалы II Всерос. науч. конф. с международным участием «Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья».* – М.; Белгород, 2006. – С. 55–59.

ZYUZYN A.B.¹, SHCHERBAK O.V.¹, OSYPCHUK O.S.², KOVTUN S.I.¹, DZITSYUK V.V.¹

¹ Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V. Zubets of National Academy of Agrarian Science of Ukraine,

Ukraine, 08321, Kiev Region, Borispol District, v. Chubinske, Pogrebnyaka str., 1, e-mail: aza.zyuzyun@yandex.ua

² LLC «Biopharma Invest»,

Ukraine, 09100, Kiev region, Bila Tserkva, Kiev str., 37, e-mail: vky@biofarma.ua

USING OF NANOMATERIALS IN EMBRYOGENETIC SYSTEM FOR RECEIVING PIGS EMBRYOS *IN VITRO*

Aims. The optimization model culturing somatic and germ cells of animals through the use of nanomaterials currently is an important task in the system of development and improvement of effective ways to get *in vitro* oocytes preimplantant embryos and embryonic stem cells. **Methods.** To research the oocyte-cumulus complexes (OCC), pigs were divided into two groups: the experimental group, in which cultivation was carried out in a medium containing 0.001 % concentration of UFS / N-Gal and the control group, in which cultivation OCC conducted without the addition of nanomaterials. Ejaculated cryopreserved sperm of boar was used for *in vitro* fertilization of pig's oocytes. **Results.** Morphological and cytogenetic analysis showed that the level of maturation of oocytes *in vitro* in the experimental group was 13.6 % higher compared to the control group (70.6 % ± 3.6). To investigate the *in vitro* maturation of oocytes pigs spent their fertilization of cryopreserved boar sperm. The quantity of zygotes in the experimental group was formed outside the body by 11.0 % more than in the control group (31.8 % ± 4.9), also level splitting of embryos was higher at 15.1 % in the experimental group compared with controls (18.2 % ± 4.1). **Conclusion.** The system of optimization in conditions of *in vitro* biological activity of nanomaterials was developed and the methods of biotechnological manipulation of gametes females in the system of rational use and reproduction of native breeds of farm animals were improved.

Keywords: oocytes, *in vitro* fertilization, embryos, nanomaterial, N-galactosamine, cytogenetic analysis.