

PACS numbers: 81.16.Fg, 82.39.Rt, 83.80.Lz, 87.17.Uv, 87.18.-h, 87.85.jf, 87.85.Rs

Застосування наночастинок діоксиду кремнію в технології формування ембріонів свиней *in vitro*

О. В. Щербак¹, Н. П. Галаган², П. А. Троцький¹, С. І. Ковтун¹

¹Інститут розведення і генетики тварин ім. М. В. Зубця НААН України,
вул. П. Л. Погребняка, 1,

08321 Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., Україна

²Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України,

вул. Генерала Наумова, 17,

03164 Київ, Україна

Високодисперсний кремнезем (ВДК; ultrafine silica—UFS) широко застосовується при виготовленні лікарських засобів як допоміжна речовина, тому що в межах певних концентрацій є фізіологічно нешкідливим і сумісним із біологічною системою. Він має розвинену вкриту гідроксильними групами поверхню, яка виявляє високі адсорбційні властивості щодо багатьох речовин. Заміщення гідроксилів синтетичними або природними сполуками дає можливість створювати на його основі іммобілізовані біологічно активні наноматеріали пролонгованої та адсорбційної дії. Закріплення на поверхні ВДК деяких вуглеводів або білку уможливило одержати наноматеріали, які при додаванні їх до стандартних кріосередовищ сприяли зростанню виживаності розморожених сперматозоїдів бугаїв. Представлені нижче результати експериментальних досліджень щодо взаємодії репродуктивних клітин з наночастинками ВДК є продовженням зазначених досліджень, які стосуються технології не тільки кріоконсервації гамет, але й одержання ембріонів свиней *in vitro*. Встановлено, що рівень формування *in vitro* ембріонів свиней досягає 37,5% (27 із 72 штучно запліднених яйцеклітин) в результаті додавання 0,001% ВДК до середовища культивування ембріонів. Загальний час виживаності розморожених еякульованих сперматозоїдів кнурів після додавання 0,001% ВДК подовжено до 5,5 годин. Здійснено оцінку *in vitro* біологічної активності 0,001%-ї концентрації ВДК ембріонів свиней. Показано перспективність використання ВДК для удосконалення середовищ культивування гамет та ембріонів *in vitro*.

Ultrafine silica (UFS) is widely used in medicine production in a form of additives as, at certain concentration, it is physiologically harmless and compatible with biological system. It is developed the covered with hy-

droxyl groups' surface, which has high adsorption properties towards many substances. Substitution of hydroxyls with synthetic and natural compounds allows creating, on its base, immobilized biologically active nanomaterials with prolonged and adsorptive effect. Fixing at UFC surface some carbohydrates or protein enable to have nanomaterials, which, at adding to standard cryomedia, facilitate better survival rate of melted bulls' spermatozoas. Given below experimental-study results on interaction of reproductive cells with UFS nanoparticles are the extensions of mentioned investigation, which concerns not only gametes' cryoconservation technology, but also *in vitro* swine embryos getting as well. As stated, the level of *in vitro* swine embryo forming reaches 37.5% (27 out of 72 inseminated eggs) because of 0.001% UFS addition to embryo cultivating medium. Total time of melted ejaculated boars' spermatozoa survival after 0.001% UFS addition is prolonged till 5.5 hours. *In vitro* biologic activity of swine embryos with 0.001% UFS concentration is tested. The perspective of the UFC uses to improve gametes' and *in vitro* embryos' cultivating media is shown.

Высокодисперсный кремнезём (ВДК; ultrafine silica—UFS) широко применяется при изготовлении лекарственных средств как вспомогательное вещество, так как в пределах определённых концентраций является физиологически безвредным и совместимым с биологической системой. Он имеет развитую покрытую гидроксильными группами поверхность, которая проявляет высокие адсорбционные свойства ко многим веществам. Замещения гидроксидов синтетическими или природными соединениями даёт возможность создавать на его основе иммобилизованные биологически активные наноматериалы пролонгированного и адсорбционного действия. Закрепление на поверхности ВДК некоторых углеводов или белка позволило получить наноматериалы, которые при добавлении их к стандартным криосредам способствовали повышению выживаемости размороженных сперматозоидов быков. Представленные ниже результаты экспериментальных исследований по взаимодействию репродуктивных клеток с наночастицами ВДК являются продолжением указанных исследований, касающихся технологии не только криоконсервации гамет, но и получения эмбрионов свиней *in vitro*. Установлено, что уровень формирования *in vitro* эмбрионов свиней достигает 37,5% (27 из 72 оплодотворённых яйцеклеток) в результате добавления 0,001% ВДК к среде культивирования эмбрионов. Общее время выживаемости размороженных эякулированных сперматозоидов хряков после добавления 0,001% ВДК продлено до 5,5 часов. Осуществлена оценка *in vitro* биологической активности 0,001%-й концентрации ВДК относительно эмбрионов свиней. Показана перспективность использования ВДК для усовершенствования сред культивирования гамет и эмбрионов *in vitro*.

Ключові слова: наночастишки діоксиду кремнію (високодисперсного кремнезему), збереження генофонду свиней, еякульовані сперматозоїди кнурів, зародки свиней *in vitro*, криоконсервація, криосередовища.

Key words: nanoparticles of silica (ultrafine silica), preservation of the

gene pool of pigs, ejaculated boars' spermatozoa, *in vitro* swine embryo, cryopreservation, cryomedia.

Ключевые слова: наночастицы диоксида кремния (высокодисперсного кремнезёма), сохранение генофонда свиней, эякулированные сперматозоиды хряков, зародыши свиней *in vitro*, криоконсервация, криосреды.

(Отримано 1 грудня 2016 р.; після доопрацювання — 5 грудня 2016 р.)

1. ВСТУП

Сучасне тваринництво в технології розведення сільськогосподарських тварин широко використовує їх криоконсервованій генетичний матеріал, а саме репродуктивні клітини та ембріони [1, 2]. Їх заморожування відбувається здебільшого за температури рідкого азоту в спеціальних криосередовищах, які застосовуються для збереження життєздатності клітин за дії на них низьких температур. Однак, не зважаючи на це, відсоток нежиттєздатних клітин може досягати 50% та більше за рахунок утворення із внутрішньоклітинної води льоду, який значно пошкоджує клітинні мембрани. Тому оптимізація криосередовищ за рахунок підбору речовин, які сприяють зниженню кількості пошкоджених клітин в процесі їх низькотемпературної обробки, є однією із задач технології довгострокового збереження генофонду сільськогосподарських тварин.

Виявилось [3], що нанорозмірний кремнезем (НК) (високодисперсний кремнезем (ВДК), діоксид кремнію колоїдний безводний, техн. аеросил) можна використовувати як домішку до лактозо-глицерин-жовткового (ЛГЖ) криосередовища при низькотемпературному заморожуванні сперми бугаїв, що сприяло більшій виживаності їх гамет після розморожування. Слід відзначити, що НК (ВДК) широко застосовується для виготовлення лікарських засобів як допоміжна речовина [4], тому що в межах певних концентрацій є фізіологічно нешкідливим і сумісним із біологічною системою. Він має розвинену, вкриту гідроксильними групами поверхню, яка виявляє високі адсорбційні властивості щодо багатьох речовин. Заміщення гідроксилів синтетичними або природними сполуками дає можливість створювати на основі НК іммобілізовані біологічно активні препарати пролонгованої та адсорбційної дії [5]. Закріплення на поверхні кремнезему деяких вуглеводів або білку дозволило одержати нанокомпозити (НК), які при додаванні їх до криосередовища сприяли зростанню виживаності розморожених сперматозоїдів [6].

Останні десятиріччя в тваринництві визначились порушенням налагодженої раніш на Україні інфраструктури відтворення різ-

номаніття порід сільськогосподарських тварин. Це стосується різних його галузей, в тому числі і свинарства, як традиційної для нашої країни. Відомо [7], що технологія кріоконсервування генофонду великої рогатої худоби більш розвинена, ніж для такої галузі, як свинарство. Це зумовлює розробку підходів до більш ефективного вирішення цієї проблеми, зокрема і оптимізації кріосередовищ. Зважаючи на позитивні результати щодо використання такого наноматеріалу, як діоксид кремнію, у складі ЛГЖ-кріосередовища в технології збереження генофонду великої рогатої худоби [3], було започатковано визначення його дії на життєздатність деконсервованих гамет кнурів та ембріонів свиней в разі додавання до середовищ культивування.

Тому наші дослідження були спрямовані на оцінку ембріонального розвитку свиней *in vitro* із використанням кріоконсервованих гамет свиней за застосування 0,001%-ої концентрації ВДК.

2. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено в лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН.

З цією метою в дослідах вивчали вплив НК марки А-300 із $S_{\text{шт}} = 285 \text{ м}^2/\text{г}$ (м. Калуш, Україна) як на деконсервовану сперму кнурів, так і на формування ембріонів свиней *in vitro*. НК попередньо прожарювали 2 години за температури 200°C , а потім додавали в середовища культивування гамет в кінцевій концентрації 0,001%. Для оцінки біологічної активності в експериментах застосовувались кріоконсервовані еякульовані сперматозоїди трьох кнурів миргородської породи із Банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН. Дія ВДК на сперматозоїди оцінювалась у відсотках за показником життєздатності у відповідності з їх активним рухом.

Для заморожування використовували ооцит-кумулясні комплекси свиней породи ландрас і велика біла із гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом. Перед заморожуванням гамети обробляли 10 хв. еквілібраційним розчином (10% гліцерин + 20% пропандіол) потім переносили у вітрифікаційний розчин (25% гліцерин + 25% пропандіол). Група К, в якій ооцит-кумулясні комплекси свинок не заморожували, була контрольною. Після розморожування гамет свинок виведення кріопротекторів проводили шляхом перенесення їх на 10 хв. у розчин 1,0 М сахарози. Ооцит-кумулясні комплекси свинок культивували протягом 44 год. при температурі $+38,5^\circ\text{C}$, 5% CO_2 у повітрі, в краплях середовища 199 з 10% попередньо інактивованою еструсною сироваткою корів, 2,0 мМ натрію пірувату, 2,92 мМ кальцію ла-

ктату, 40 мкг/мл гентаміцину. Деконсервовані гамети свинок після культивування поза організмом підлягали заплідненню *in vitro*. Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J.J. *et al.* [8]. Вплив ВДК оцінювали за результатами дроблення поза організмом ембріонів, отриманих з деконсервованих гамет. Зиготи розділяли на дві групи: група — А, в якій культивування проводили в середовищі, яке містило ВДК у 0,001%-й концентрації і група — Б, культивування проводили без додавання наноматеріалу. Цитогенетичні препарати гамет свинок після запліднення *in vitro* та зародків свиней готували за методом Ushijima M. *et al.*, забарвлювали 2,0%-м розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що після розморожування сперматозоїдів середня активність проявилась на рівні $16,7 \pm 3,33\%$. Цей показник у контролі знизився упродовж 30 хв. лише на 1,7% ($15,0 \pm 2,89\%$). Після перебування сперматозоїдів у середовищі, що містило ВДК у 0,001%-ій концентрації упродовж 30 хвилин відбулося зниження активності гамет на 3,4%. Загальний час виживаності сперматозоїдів у контролі сягав — п'ять годин, а в дослідній групі перевищив цей показник на 30 хвилин. Додавання ВДК у концентрації 0,001% до середовища, яке містило деконсервовані сперматозоїди вплинуло на активність та загальний час виживаності гамет.

Наступні наші дослідження були спрямовані на оцінку ембріонального розвитку свиней *in vitro* із використанням криоконсер-

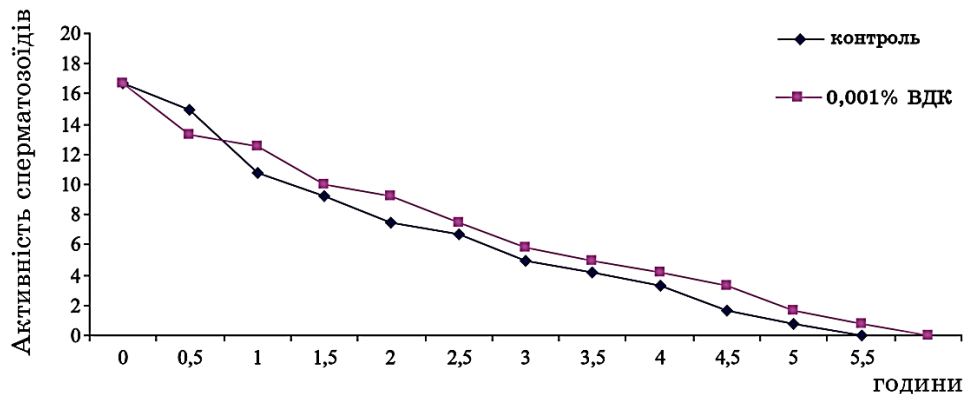


Рис. Вплив ВДК у 0,001%-й концентрації на життєздатність деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів.¹

вованих гамет свиней за застосування вищевказаної концентрації ВДК.

Для заморожування використовували ооцит-кумулюсні комплекси свиней порід ландрас (табл. 1) та велика біла (табл. 2) з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом. Вплив ВДК оцінювали за результатами дроблення поза організмом ембріонів, одержаних з деконсервованих гамет. Зиготи роз-

ТАБЛИЦЯ 1. Вплив ВДК на ефективність розвитку *in vitro* ембріонів свиней, отриманих із деконсервованих яйцеклітин свинок породи ландрас.²

Варіанти дослідів	Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадіях:							
		2 клітин		3–4 клітин		5–8 клітин		9–16 клітин	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
А	72	27	37,5 ^a ± 5,7	22	30,6 ± 5,4	13	18,1 ± 4,5	6	8,3 ± 3,3
Б	66	19	28,8 ^b ± 5,6	13	19,7 ± 4,9	8	12,1 ± 4,0	3	4,5 ± 2,6
К	51	28	54,9 ^c ± 6,9	22	43,1 ± 6,9	15	29,4 ± 6,4	8	15,7 ± 5,1

Примітка: В цій таблиці різні суперскрипти вказують на вірогідну різницю між показниками. $a \div b$, $a \div c$ — $P < 0,05$; $b \div c$ — $P < 0,01$, критерій Стьюдента.

ТАБЛИЦЯ 2. Вплив ВДК на ефективність розвитку *in vitro* ембріонів свиней, отриманих із деконсервованих яйцеклітин свинок породи велика біла.³

Варіанти дослідів	Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадіях:							
		2 клітин		3–4 клітин		5–8 клітин		9–16 клітин	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
А	83	30	36,1 ^a ± 5,3	24	28,9 ± 4,9	15	18,1 ± 4,2	7	8,4 ± 3,1
Б	82	19	23,3 ^b ± 4,7	14	17,1 ± 4,2	9	10,9 ± 3,5	4	4,9 ± 2,4
К	63	34	53,9 ^c ± 6,3	23	36,5 ± 6,1	16	25,4 ± 5,5	8	12,7 ± 4,2

Примітка: $a \div b$, $a \div c$ — $P < 0,05$; $b \div c$ — $P < 0,01$, критерій Стьюдента.

діляли на дві групи: дослідна (ландрас $n = 72$; велика біла $n = 83$) в якій культивування проводили в середовищі, яке ВДК і контрольна (ландрас $n = 66$; велика біла $n = 82$), в якій культивування проводили без додавання наноматеріалу.

Встановлено, що рівень дроблення *in vitro* ембріонів свиней породи ландрас в дослідній групі був вищим на 8,7%, порівняно з контролем (28,8%, 19 із 66). Також встановлено, що додавання ВДК у середовище для культивування *in vitro* ембріонів свиней сприяло збільшенню на 3,8% кількості отриманих зародків на більш пізніх стадіях розвитку (рання морула), порівняно із контролем (4,5%, 3 із 66).

Результати розвитку *in vitro* ембріонів свиней, отриманих із деконсервованих яйцеклітин свинок породи велика біла за додавання 0,001% -ї концентрації ВДК співпали з встановленою тенденцією отримання ембріонів з деконсервованих і дозрілих гамет свинок породи ландрас. Так, в дослідній групі ембріонів свиней породи велика біла спостерігали збільшення кількості зародків як після 24 годин культивування так і після 96 годин, відповідно на 12,8% та 3,5%, порівняно із контролем (23,3%, 19 із 82 та 4,9%, 4 із 82).

Таким чином, проведений порівняльний аналіз впливу ВДК в концентрації 0,001% на кріорезистентні властивості ооциткумулюсних комплексів свинок порід ландрас та велика біла виявив збільшення кількості формування ембріонів *in vitro*, що також призвело до одержання більшої кількості зародків, які розвинулися до стадії придатної для трансплантації.

4. ВИСНОВКИ

Показана можливість застосування діоксиду кремнію (SiO₂) в технології формування ембріонів свиней *in vitro* для стабілізації та підвищення результативності маніпуляцій із репродуктивними клітинами тварин.

Нами встановлено, що рівень формування ембріонів свиней *in vitro* за використання ВДК в концентрації 0,001% із кріоконсервованих яйцеклітин досягає 37,5% (27 із 72), а загальний час виживаності кріоконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів подовжено до 5,5 годин.

У представлених дослідженнях нами застосовано метод кріоконсервації гамет свиней та встановлено ефективність використання ВДК для підвищення життєздатності таких клітин.

Таким чином, ВДК в концентрації 0,001% вплинув на кріорезистентні властивості гамет свиней, внаслідок чого збільшилась кількість сформованих ембріонів *in vitro*, що також призвело до отримання більшої кількості ембріонів та подовжено загальний

час виживаності кріоконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА—REFERENCES

1. A. M. Belous, V. I. Grishhenko, and Yu. S. Parashchuk, *Kriokonservatsiya Reproduktyvnykh Klitok* [Cryopreservation of Reproductive Cages] (Kyiv: Naukova Dumka: 1986) (in Ukrainian).
2. V. P. Burkat and S. I. Kovtun, *Biotekhnologiya*, **1**, No. 3: 7 (2008) (in Ukrainian).
3. V. E. Nedava, A. A. Chuiko, L. A. Begma, A. A. Begma, and V. I. Bogomaz, *Zootekhnologiya*, **8**: 63 (1990) (in Russian).
4. M. T. Alyushin and M. N. Astakhova, *Farmatsiya*, **6**: 73 (1971) (in Russian).
5. A. A. Chuiko, V. K. Pogorelyi, A. A. Pentyuk, M. A. Andreychin, and L. A. Belyakova, *Meditinskaya Khimiya i Klinicheskoe Primenenie Dioksida Kremniya* [Medical Chemistry and Clinical Application of Silicon Dioxide] (Ed. A. A. Chuiko) (Kyiv: Naukova Dumka: 2003) (in Ukrainian).
6. N. P. Galagan, *Materialy II Vseross. Nauch. Konf. 'Sorbenty kak Faktor Kachestva Zhizni i Zdorov'ya'* (Moscow–Belgorod: 2006), p. 55 (in Russian).
7. A. D. Kurbatov, E. M. Platov, N. V. Korban, L. G. Moroz, and V. A. Nauk, *Kriokonservatsiya Spermy Sel'skokhozyaistvennykh Zhivotnykh* [Cryopreservation of Sperm of Farm Animals] (Leningrad: Agropromizdat. Leningr. otd-nie: 1988) (in Russian).
8. J. J. Parrish, J. L. Susko-Parrish, R. R. Handrow, M. M. Sims, and N. L. First, *Biol. Reprod.*, **40**: 1020 (1989).

¹*Institute of Animal Breeding and Genetics named after M. V. Zubets of the National Academy of Agrarian Science of Ukraine, 1 Pogrebnyak Str., 08321 village Chubinske, Borispol District, Kyiv Region, Ukraine*
²*O. O. Chuiko Institute of Surface Chemistry, N.A.S. of Ukraine, 17 General Naumov Str., 03164 Kyiv, Ukraine*

¹ Fig. Effect 0.001% UFS concentration on viability thawed ejaculated boars' spermatozoa.

² TABLE 1. Effect UFS on efficiency of *in vitro* development of swine embryos derived from frozen-thawed oocytes pigs Landrace breed.

³ TABLE 2. Effect UFS on efficiency of *in vitro* development of swine embryos derived from frozen-thawed oocytes pigs' large white breed of pigs.