УДК 57.086.83:591.3:57.085.2]:636.4 https://doi.org/10.7124/FEEO.v39.1840

ТРОЦЬКИЙ П. А.✉
ЩЕРБАК О. В.
КОВТУН С. І.

Інститут розведення та генетики тварин імені М. В. Зубця НААН,
Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський район, с. Чубинське, вул. Погребняка, 1
✉ *trotskiy_pa@ukr.net*

ВИКОРИСТАННЯ РІЗНИХ КУЛЬТУРАЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ РОЗВИТКУ ЕМБРІОНІВ СВИНЕЙ *IN VITRO*

Мета. Вивчити вплив різних культуральних середовищ на ефективність одержання та розвиток ембріонів свиней *in vitro*. ***Методи.*** Застосовано біотехнологічні, ембріологічні та морфологічні методи, а також методи статистичної обробки даних. ***Результати.*** Встановлені стабільні показники дроблення ембріонів свиней у середовищах «CDM» та «Sage 1-Step» без вірогідної різниці між ними на ранніх стадіях розвитку. Подальше культивування до стадії ранньої морули вказує на незначну перевагу середовища «CDM» (відповідно 16,4 ± 3,5% та 12,9 ± 3,0%). Проаналізовано коефіцієнт та індекс дроблення *in vitro* ембріонів за використання різних культуральних середовищ для *in vitro* розвитку ембріонів свиней. Показано, стабільний початковий розвиток ембріонів *in vitro* в обох середовищах. ***Висновок.*** Встановлено, що використання середовища «CDM» для культивування *in vitro* ембріонів свиней сприяє збільшенню кількості отриманих 9–16-клітинних ембріонів на 3,5%, порівняно із середовище «Sage 1-Step».

Ключові слова: ооцит-кумулюсний комплекс, культуральне середовище, дозрівання ооцитів, запліднення *in vitro*, ембріон.

Допоміжні репродуктивні технології (отримання ембріонів *in vitro*, кріоконсервація та трансплантація) стали основою для ембріологічної моделі у сфері біомедичних підходів (наприклад ксенотрансплантації) та стимулювали інтенсифікацію досліджень, спрямованих на підвищення ефективності репродуктивних технологій у свиней.

Загалом, технологія отримання ембріонів *in vitro* свиней здійснюється за принципами, спільними для більшості видів сільськогосподарських тварин. Вона включає послідовні етапи: відбір яєчників, отримання ооцитів, морфологічна оцінка, дозрівання та запліднення ооцитів, а потім культивування ембріонів до стадії бластоцисти. Попри значні зусилля науковців щодо удосконалення цієї технології, досі спостерігається низький рівень цитоплазматичного дозрівання ооцитів, високий рівень поліспермії, обмежена здатність ембріонів розвиватися до стадії бластоцисти та їхня низька життєздатність (Valadão et al., 2020; Slezec-Frick et al., 2026; Linh and Hiep, 2020).

Одним із найважливіших етапів процесу *in vitro* отримання ембріонів є дозрівання ооцитів свиней поза організмом, що забезпечує їхню здатність до запліднення та ембріональний розвиток. Завдяки дослідженням, спрямованим на відбір ооцитів та оптимального складу середовища для дозрівання ооцитів свиней *in vitro,* вдалося значно підвищити відсоток клітин, що досягають стадії MII мейозу. Модифікація середовищ для екстракорпорального запліднення зменшує рівень поліспермного запліднення. Крім того, удосконалення умов для культивування ооцитів свиней покращує якість ембріонів та їхню здатність до розвитку. Сучасні репродуктивні технології ґрунтуються на базових методах дозрівання та запліднення ооцитів, проте розробка й удосконалення ембріологічних підходів залишаються актуальним завданням (Poniedziałek-Kempny, 2020; Lin et al., 2015).

Основними умовами отримання ембріонів *in vitro* є якість ооцитів, дозрілих *in vitro*, активність сперми після капацитації та життєздатність таких ембріонів. Беручи до уваги постійний розвиток біотехнологічних та біомедичних досліджень, проведених на свинях, спостерігається стабільне зростання попиту на зрілі ооци-

© 2026 Троцький П. А., Щербак О. В., Ковтун С. І. This work is licensed under CC BY 4.0. To view a copy of this license, visit https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

ти та ембріони свиней (Chen et al., 2022). Умови культивування *in vitro* є важливим фактором, що впливає на якість та кількість ембріонів свиней, отриманих поза організмом. Тому протягом останніх десятиліть проводилися дослідження з метою оптимізації складу поживних середовищ, а також оптимізації умов культивування. Однак методи та технології екстракорпорального запліднення, а також умови культивування ембріонів *in vitro* все ще потребують додаткових досліджень. Водночас, модифікації середовищ культивування ембріонів свиней, отриманих *in vitro*, призвели до підвищення ефективності отримання бластоцист (Garcia-Canovas et al., 2024; Chen et al., 2021).

Кожен етап методики культивування (від дозрівання ооцитів до розвитку ембріонів) постійно оптимізується відповідно до специфічних потреб гамет свиней. Оскільки середовище для *in vitro* культивування залишається неоптимальним, важливо досліджувати ембріогенез свиней поза організмом у різних аспектах, щоб визначити шляхи вдосконалення. Розуміння метаболічних характеристик ембріонів свиней та їх порівняння з іншими видами ссавців є необхідним для оптимізації умов культивування (Romar et al., 2019; Balogun and Machaty, 2025).

Таким чином, значна кількість інформації щодо взаємодії ембріонів із середовищем культивування, способів модифікації технології культивування для покращення життєздатності ембріонів та важливих метаболічних особливостей, які можна використовувати для отримання ембріонів, залишається недостатньо дослідженим. Для удосконалення допоміжних репродуктивних технологій необхідно вивчення та всебічне розуміння факторів, що впливають на розвиток ембріонів свиней *in vitro*. Тому метою наших досліджень було вивчити вплив різних культуральних середовищ на ефективність одержання та подальшого розвитку ембріонів свиней *in vitro*.

Матеріали і методи

Отримані яєчники свинок транспортували до лабораторії у фізіологічному розчині (0,9% NaCl), доповненому пеніциліном (100 МО/мл) і стрептоміцином сульфатом (100 мкг/мл), за температури близько +38 °С упродовж 1–1,5 год. Ооцит-кумулюсні комплекси свинок (ОКК) отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко (D 5773 «Sigma-Aldrich»), виловлювали ембріологічною піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками під мікроскопом (МБС-9, USSR). В дослідженнях використовували ооцити свинок з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом Ковтун С.І. та ін. (2010).

Потім відібрані ОКК (n = 234) тричі промивали середовищем для дозрівання та культивували в чотирьохлункових планшетах упродовж 45 годин за температури _+38,5 °С, 5% CO_2 у повітрі, в краплях середовища 199 (M 2520 «Sigma-Aldrich») з 10% (об./об.) сироватки крові корів (F 7524 «Sigma-Aldrich»), яку попередньо інактивували за температури +56 °С упродовж 30 хвилин, 2,5 мкг/мл ФСГ, 1,0 мкг/мл естрадіолу (E 2758 «Sigma-Aldrich»), 2,5 МОд/мл лютеінізуючого гормону, 2,0 мМ натрію пірувату (P 5280 «Sigma-Aldrich»), 2,92 мМ кальцію лактату (L 2000 «Sigma-Aldrich»), 40 мкг/мл гентаміцину. Швидкість дозрівання визначали як кількість ооцитів з очевидним полярним тільцем відносно загальної кількості проаналізованих ооцитів. Ооцити на стадії M II мейозу з першим полярним тільцем характеризували як зрілі ооцити і вони підлягали заплідненню *in vitro*. Після *in vitro* дозрівання (IVM) ооцити звільняли від клітин кумулюсу обережним піпетуванням, а отримані оголені ооцити (n = 234) використовували для *in vitro* запліднення.

Для запліднення *in vitro* яйцеклітин свинок використовували заморожену сперму кнура. Розморожування гранул сперми проводили на водяній бані (+37 °С) в 2 мл середовища «Sperm-TALP» (Parrish et al., 1989) упродовж 10–12 с. Відокремлення сперматозоїдів від сім'яної плазми та розріджувача проводили методом «swim-up». Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) в середовищі «Sperm-TALP». Перед осіменінням ооцити, що дозріли поза організмом, частково звільняли від оточуючих їх клітин кумулюса механічним способом (піпетуванням через піпетку меншого діаметру). Спільне інкубування яйцеклітин і сперматозоїдів, з концентрацією приблизно $1–3\times10^6$ сперматозоїдів/мл проводили в термостаті за температури 38,5 °С, 5% CO_2, у краплях середовища Fert.-TALP (Parrish et al., 1989). Після 12–18 годин спільного інкубування ймовірні зиготи відмивали від прилиплої сперми і переносили в краплі середовища «CDM» (culture development medium) та «Sage 1-Step» (Origio, Данія) для подальшого культивування

після запліднення *in vitro* за температури 38,5 °С, 5% CO_2 у повітрі. Середовище «CDM» складалося з ТСМ 199, доповненого 20% (об./об.) сироватки крові корів (F 7524 «Sigma-Aldrich»), 2,0 мМ натрію пірувату (P 5280 «Sigma-Aldrich»), 2,92 мМ кальцію лактату (L 2000 «Sigma-Aldrich»), 40 мкг/мл гентаміцину. «Sage 1-Step» є комерційним середовищем (Origio, Данія).

Класифікували ембріони з більш ніж 16 клітинами як морули та ембріони з бластоцелем як бластоцисти. Цитогенетичні препарати гамет після запліднення *in vitro* готували наступним чином: ембріони поміщали на 2 хв. у 0,8% гіпотонічний розчин 3-х заміщеного цитрату натрію і фіксували сумішшю метанол : льодяна оцтова кислота : деіонізована вода = 3:2:1 на сухому знежиреному склі і фарбували 2,0%-вим розчином барвника Giemsa (32884 «Fluka») з наступним аналізом під світловим мікроскопом (Jenaval «Carl Zeiss»).

Усі експериментальні групи були проаналізовані у трьох повторах (n = 3). Статистичну обробку даних проводили за критерієм відповідності χ^2 з використанням пакету програм ×7 версії 2.0.0.9.

Результати та обговорення

Проведено порівняльний аналіз різних культуральних середовищ «CDM» (М-199 доповнене піруватом натрію, лактатом кальцію та 20% фетальної сироватки теляти) та «Sage 1-Step» (Origio, Данія) на формування та розвиток ембріонів свиней поза організмом. Встановлено, що рівень формування ембріонів із 234 запліднених яйцеклітин був на рівні 50,0% (табл.). Подальший рівень дроблення *in vitro* ембріонів свиней в різних середовищах після запліднення був 45,5 ± 4,7% (110 яйцеклітин у «CDM») та 43,5 ± 4,5% (124 яйцеклітини у «Sage 1-Step»), відповідно. Це вказує на стабільний початковий розвиток у обох середовищах – вірогідна різниця відсутня.

Подальше культивування забезпечило дроблення ембріонів до стадії ранньої морули на рівні 16,4 ± 3,5% та 12,9 ± 3,0%, відповідно у середовищах «CDM» та «Sage 1-Step» (різниця невірогідна). Отримані дані вказують на незначну перевагу середовища «CDM» під час культивування ембріонів свиней, а саме на забезпечення дроблення ембріонів до більш просунутих стадій розвитку.

При дослідженні коефіцієнта дроблення 2-клітинних ембріонів свиней у різних культуральних середовищах (рис. 1) встановлено, що коефіцієнт дроблення (кількість ембріонів на відповідній стадії розвитку від загальної кількості ембріонів) ембріонів був майже однаковий за використання середовища «CDM» та «Sage 1-Step», відповідно 35,4% та 36,5%. Через 48 годин культивування коефіцієнт дроблення ембріонів за використання цих середовищ був відповідно 31,6% та 31,8%. Подальше культивування ембріонів до 72 год. призводить до зменшення коефіцієнта дроблення відповідно – 21,5% та 22,4%. На четверту добу культивування ембріонів в різних культуральних середовищах, отриманих з нативних, дозрілих та запліднених поза організмом яйцеклітин свинок спостерігали подібний коефіцієнт дроблення від 9,4% до 11,4%.

Крім коефіцієнта дроблення зародків після запліднення *in vitro* не меншу інформативність має й індекс дроблення ембріонів (співвідношення кількості ембріонів певної стаді до наступної стадії їх розвитку). Аналізуючи подальше дроблення ембріонів свиней отриманих з нативних яйцеклітин свинок, що були прокультивовані за використанні різних культуральних середовищ (рис. 2) встановлено значні коливання індексу дроблення. Індекс дроблення 3–4 клітинних ембріонів був майже однаковим 89,3% та 87,1% відповідно за використання середовищ «CDM» та «Sage 1-Step». Подальше

Таблиця. Використання різних культуральних середовищ для *in vitro* формування та розвитку ембріонів свиней

Середовище культивування	Кількість клітин, що підлягали заплідненню *in vitro*	Кількість ембріонів на стадіях							
		2 клітин		3–4 клітин		5–8 клітин		9–16 клітин	
		n	%	n	%	n	%	n	%
«CDM»	110	56	50,9[a] ± 4,8	50	45,5[a] ± 4,7	34	30,9[a] ± 4,4	18	16,4[a] ± 3,5
«Sage 1-Step»	124	62	50,0[a] ± 4,5	54	43,5[a] ± 4,5	38	30,6[a] ± 4,1	16	12,9[a] ± 3,0

Примітки: однакові суперскріпти вказують на недостовірність між показниками, n – кількість зразків, % – відсотки.

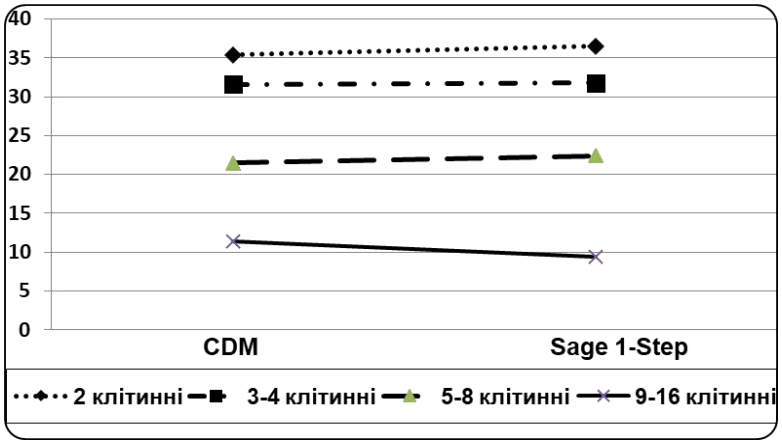


Рис. 1. Коефіцієнт дроблення *in vitro* ембріонів свиней за використання різних культуральних середовищ.

культивування до 5–8-клітинних ембріонів призводило до значного зменшення індексу дроблення (відповідно 68,0% та 70,4%). Найбільше зменшення індексу дроблення 9–16-клітинних ембріонів спостерігали в середовищі «Sage 1-Step» (42,1%).

Отримання ембріонів свиней *in vitro* залишається складним завданням, оскільки високий рівень поліспермії після запліднення *in vitro* є суттєвою перешкодою під час цього процесу. Підвищення ефективності успішного дозрівання ооцитів *in vitro*, забезпечує оптимальні умови запліднення та культивування *in vitro*, а також сприяє збереженню генофонду, а саме репродуктивного потенціалу (гамет та ембріонів) для програм селекції на перспективу.

Науковці постійно оптимізують кожен етап технології одержання ембріонів свиней поза організмом, від дозрівання ооцитів до ембріонального розвитку, відповідно до потреб біотехнологічних методів відтворення цього виду тварин. Тому необхідно проводити подальші дослідження щодо глибшого розуміння взаємодії гамет свиней із культуральним середовищем, а також шляхів його модифікації з метою підвищення життєздатності та покращення ембріонального розвитку.

Отже, в разі застосування середовища «CDM» для культивування ембріонів свиней отриманих із нативних яйцеклітин рівень дроблення ембріонів до стадії ранньої морули може сягати 16,4 ± 3,5%. Застосування середовища «Sage 1-Step» можливе як альтернатива на початкових стадіях культивування ембріонів. Застосовані біотехнологічні підходи щодо підвищення життєздатності ембріонів свиней забезпечили оптимальні умови для дроблення та розвитку зародків поза організмом.

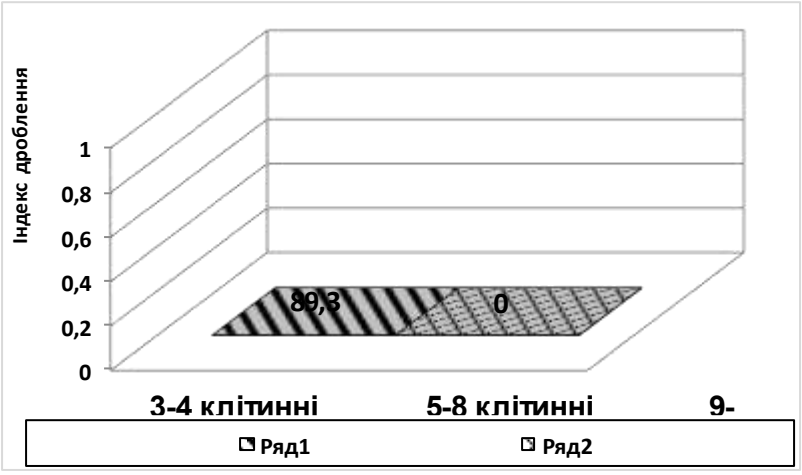


Рис. 2. Індекс дроблення *in vitro* ембріонів свиней за використання різних культуральних середовищ.

Висновки

Розроблено біотехнологічну модель ефективного одержання ембріонів свиней *in vitro* за застосування різних культуральних середовищ для культивування ембріонів поза організмом.

Встановлено, що за використання середовища «CDM» для культивування *in vitro* ембріонів свиней, одержаних із нативних яйцеклітин, сприяє збільшенню кількості отриманих 9–16 клітинних ембріонів на 3,5%, порівняно із середовищем «Sage 1-Step».

Інформація про фінансову підтримку, подяки: відсутня.

Конфлікт інтересів: автор Ковтун С. І. є членом редакційної колегії збірника наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». Інші автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

References

1. Balogun K., Machaty Z. Development of IVF porcine embryos in microwell culture system. *Animals.* 2025. Vol. 15, Iss. 17. 2528. https://doi.org/10.3390/ani15172528.
2. Chen P. R., Uh K., Redel B. K., Reese E. D., Prather R. S., Lee K. Production of pigs from porcine embryos generated *in vitro. Frontiers in Animal Science.* 2022. Vol. 3. 826324. https://doi.org/10.3389/fanim.2022.826324.
3. Chen P. R., Redel B. K., Kerns K. C., Spate L. D., Prather R. S. Challenges and considerations during *in vitro* production of porcine embryos. *Cells*. 2021. Vol. 10, Iss. 10. 2770. https://doi.org/10.3390/cells10102770.
4. Garcia-Canovas M., Parrilla I., Cuello C., Gil M. A., Martinez E. A. Swine *in vitro* embryo production: Potential, challenges, and advances. *Animal Reproduction Science*. 2024. Vol. 270. 107600. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107600
5. Lin T., Lee J. E., Shin H. Y., Oqani R. K., Jin D. I. Factors influencing the efficiency of *in vitro* embryo production in the pig. *Reproductive & Developmental Biology.* 2015. Vol. 39 (2). P. 29–36. https://doi.org/10.12749/RDB.2015.39.2.29.
6. Linh N. V., Hiep N. Effects of *in vitro* maturation media on *in vitro* fertility of porcine oocytes and early development of embryos. *Journal of Biotechnology.* 2020. Vol. 18, No. 3. P. 249–255. https://doi.org/10.15625/1811-4989/18/2/15020.
7. Parrish J. J., Susko-Parrish J. L., Handrow R. R., Sims M. M., First N. L. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biology of Reproduction*. 1989. Vol. 40, Iss. 5. P. 1020–1025. https://doi.org/10.1095/biolreprod40.5.1020.
8. Poniedziałek-Kempny K. *In vitro* Production of Porcine Embryos: Current Status and Possibilities – A Review. *Annals of Animal Science*. 2020. Vol. 20, No. 3. P. 775–796. https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0030/.
9. Romar R., Cánovas S., Matás C., Gadea J., Coy P. Pig *in vitro* fertilization: Where are we and where do we go? *Theriogenology.* 2019. Vol. 137. P. 113–121. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.045.
10. Slezec-Frick V., Lenoir G., Commin L., Buff S. Integrative assessment of gamete and embryo quality in porcine *in vitro* production: A comprehensive review. *Reproductive Biology*. 2026. Vol. 26, Iss. 2. 101207. https://doi.org/10.1016/j.repbio.2026.101207.
11. Valadão L., Silva H., Kajabova S. Moreirada da Silva F. *In Vitro* Production of Porcine Embryos: A Descriptive Approach, Limitations and Applications. 2020. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research.* Vol. 26 (2). P. 19876–19881. https://doi.org/10.26717/BJSTR.2020.26.004337.

TROTSKYI P. A., SHCHERBAK O. V., KOVTUN S. I.
Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M. V. Zubets of National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Ukraine, 08321, Kyiv region, Boryspil district, Chubynske vil., Pohrebniaka str., 1

USE OF DIFFERENT CULTURE MEDIA FOR *IN VITRO* DEVELOPMENT OF PIG EMBRYOS

Aim. To study the influence of different culture media on the efficiency of obtaining and developing pig embryos in vitro. ***Methods.*** Biotechnological, embryological and morphological methods, as well as methods of statistical data processing were applied. ***Results.*** Stable indicators of crushing of pig embryos in the media «CDM» and «Sage 1-Step» were established without a significant difference between them at the early stages of development. Further cultivation to the stage of early morula indicates a slight advantage of the medium «CDM» (16.4 ± 3.5% and 12.9 ± 3.0%, respectively). The coefficient and index of crushing in vitro embryos were analysed when using different culture media for in vitro development of pig embryos. It was shown that the initial development of embryos in vitro in both media is stable. ***Conclusion.*** It was found that the use of «CDM» medium for in vitro cultivation of pig embryos contributes to an increase in the number of 9-16-cell embryos obtained by 3.5%, compared to «Sage 1-Step» medium.
Keywords: oocyte-cumulus complex, culture medium, oocyte maturation, in vitro fertilization, embryo.

Надходження статті: 3 травня 2026 р.
Прийняття до друку після рецензування: 30 червня 2026 р.
Публікація: 30 листопада 2026 р.