

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

УДК 636.2.082.453:611-013-046.48

«ПОВОДЖЕНО» Декан факультету ветеринарної
медичини

«ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ»
Завідувач кафедри акушерства,
гінекології та біотехнології відтворення
тварин

Цвіліховський М.І.

(назва кафедри)

(підпис)

(ПШБ)

Вальчук О.А., к.вет.н., доцент

(ПШБ, науковий ступінь та вчене звання)

« »

20

р

(підпис)

« »

20

р

КВАЛІФІКАЦІЙНА МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА
08.03 – МР.1895 "С" 2020.12.01.014

на тему: «Кріоконсервація ооцитів великої рогатої худоби»

Спеціальність 211 – «Ветеринарна медицина»

Освітня програма «Ветеринарне забезпечення скотарства, вівчарства та
козівництва»

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Керівник магістерської роботи

Доктор ветеринарних наук, доцент

(науковий ступінь та вчене звання)

Ковпак Віталій Васильович

(підпис)

О.О. (ПШБ)

Виконав

Далчихін Олександр Ігорович

(підпис)

(ПШБ студента)

Консультант з економічних питань

к.вет.н., доцент

(науковий ступінь та вчене звання)

Ситник В.А.

(підпис)

(ПШБ)

КИЇВ – 2021

Термін подання завершеної роботи на кафедру _____

15.11.2021 р.

(рік, місяць, число)

Вихідні дані до магістерської роботи – Дослідження за темою магістерської роботи виконували на базі Навчально-наукової лабораторії «Центр репродуктології тварин з банком сперми та ембріонів» кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України, відбір яєчників проводили на забійному пункті ООО «Тульчинм'ясо» місто Тульчин, Вінницької області.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Відпрацювати методика вилучення ооцит-кумулясних комплексів з яєчників корів після забою.
2. Оволодіти методикою оцінки ооцит-кумулясних комплексів та ооцитів.
3. Дослідити ефективність використання вітрифікаційних середовищ різних виробників (Kitazato, Cryotech, Irvine Scientific) для криоконсервування ооцитів корів.
4. Дослідити життєздатність ооцитів корів за різного часу еквалібрації ооцитів під час їх вітрифікації.

Дата видачі завдання «01» грудня 2020 р.

Керівник кваліфікаційної магістерської роботи _____

Ковпак В.В.

(підпис)

(ПІБ)

Завдання прийняв до виконання _____

Панчихін О.І.

(підпис)

(ПІБ)

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

НУБІП України

ВКМ – внутрішньоклітинна маса

ВРХ – велика рогата худоба

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЕГ – етиленгліколь

ЕФР – епідермальний фактор росту

ІФР – інсуліноподібний фактор росту

ОКК – ооцит-кумулясний комплекс

ПВП – полівінілпіралідон

ПД – пропандіол

ПГ – пропіленгліколь

ТЕ – трофобластодерм

ТФР – трансформуючий фактор росту

ЧРО – Метод часткового розсічення прозорої оболонки ооцитів

ICSI – метод ін'єкція сперматозоїдів в ооплазму

ORU – Ovary Pick-Up (англ.), трансвагінальна пункція антральних фолікулів

НУБІП України

НУБІП України

РЕФЕРАТ

НУБІП України

Магістерська робота складається із чотирьох розділів. Загальний обсяг роботи 63 сторінки, використаних літературних джерел 54. Робота ілюстрована

2 таблицями, 12 рисунками та 2 схемами.

НУБІП України

В першому розділі магістерської роботи було здійснено огляд літературних джерел за тими основними темами: виділення ооцитів із яєчників *in vitro*, характеристика дозрівання відібраних яйцеклітин, морфологічний стан

НУБІП України

отриманих ооцитів корів та критерії їх класифікації, методи кріоконсервування ооцитів. Також визначено мету порівняти ефективність використання різних вітрифікаційних середовищ для заморожування ооцитів корів.

В другому розділі було ознайомлено з матеріалами та методами дослідження. В експериментах було використано 42 яєчники. Вилучення ооцит-кумулясних комплексів здійснювали з яєчників різних фаз розвитку. Встановлено наступні етапи експериментальної роботи.

1. Дослідження життєздатності ооцитів корів після їх вітрифікації з використанням середовищ різних виробників (Kitazato, Cryotech, Irvine Scientific).

2. Дослідження впливу еквілібрації ооцитів на їх життєздатність після розморожування.

В третьому розділі проводили відбір яєчників на забійному пункті ООО «Тулчинм'ясо» місто Тульчин, Вінницької області та доставляли у лабораторію для отримання ооцит-кумулясних комплексів. Позбавляли ооцитів клітин кумулюсу. Заморожували ооцитів методом вітрифікації. Аналізували ефективності вітрифікації ооцитів за використання різних вітрифікаційних середовищ (Kitazato, Cryotech, Irvine Scientific). Дивлячись на результати, найбільш ефективним для заморожування ооцитів корів виявилось середовище Cryotech. За використання середовищ даного виробника нами було отримано 91,7 % життєздатних ооцитів після розморожування. При заморожуванні

ооцитів з використанням середовищ Kitazato, життєздатність становила 83,5%. Достовірно найнижчий показник життєздатних ооцитів нами було отримано за використання середовищ Irvine scientific, а саме цей показник становив 64,3%.

Можна зробити висновок, що для вітрифікації ооцитів ВРХ можна використовувати середовища та протоколи заморожування для ооцитів та

ембріонів людини. При цьому ефективність кріоконсервування суттєво відрізняється залежно від вітрифікаційних середовищ. Аналізували ефективності вітрифікації ооцитів за різної еквалібрації. Дивлячись на результати, тривалість

еквалібрації за кріоконсервування істотно впливає на життєздатність ооцитів після їх розморожування. Найоптимальнішою виявилась еквалібрація тривалістю 15 хвилин, нами було отримано **94,2%** життєздатних ооцитів. Цей показник на 3% вищий порівняно із стандартною еквалібрацією (10 хвилин).

В четвертому розділі аналіз і узагальнення одержаних результатів.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І

ТЕРМІНІВ 4

НУБІП України

РЕФЕРАТ 5

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

 9

Вступ 9

НУБІП України

1.1. Біотехнологічні методи відтворення поголів'я 10

1.2. Критерії відбору корів-донорів ооцитів 12

1.3. Спосіб проведення трансвагінальної аспірації ооцитів 14

НУБІП України

1.4. Виділення ооцитів із яєчників *in vitro* 15

1.5. Характеристика дозрівання відібраних яйцеклітин 16

1.6. Морфологічний стан отриманих ооцитів корів та критерії їх класифікації 17

НУБІП України

1.7. Методи криоконсервування ооцитів 18

1.8. Запліднення дозрілих ооцитів *in vitro* та культивування ембріонів 27

1.9. Висновок з огляду літератури 33

РОЗДІЛ 2

НУБІП України

НАПРЯМИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

 37

2.1. Матеріали і методи дослідження 37

2.1.1. Матеріали 37

НУБІП України

2.1.2. Методи 42

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

 44

3.1. Отримання ооцит-кумулясних комплексів з яєчників після забою тварин	45
3.2. Позбавлення ооцитів клітин кумулюсу	46

3.3. Заморожування ооцитів методом вітрифікації	48
---	----

3.4. Аналіз ефективності вітрифікації ооцитів за використання різних вітрифікаційних середовищ	52
--	----

3.5. Аналіз ефективності вітрифікації ооцитів за різної еквалібрації	53
--	----

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ, ЇХ ЕКОЛОГІЧНЕ ТА ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	55
---	----

ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	61
---	----

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	62
-----------------------------------	----

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

НУБІП України

Вступ

Упродовж трьох десятиліть вивчено зростає популярність трансплантації ембріонів. Вона отримала «друге дихання» з відкриттям

можливостей: заміни ризикованої в інфекційному плані торгівлі племінною худобою на біотехнологічний експорт-імпорт племінних ресурсів, отримання сексованих (із замовленою статтю) ембріонів, технології вимивання яйцеклітин (ооцитів), їх екстракорпорального запліднення *in vitro*. Технологія кріоконсервації ооцитів та ембріонів, а також створення національних банків

спадкового матеріалу племінних тварин дозволить значно знизити витрати на закупівлю імпортої ВРХ, збільшити поголів'я худоби за рахунок підвищення швидкості відтворення, що покращить рентабельність племінних господарств.

Успішне застосування методу вітрифікації для кріоконсервації ооцитів та ранніх ембріонів протягом останніх 10 років змінило ефективність застосування допоміжних репродуктивних методів у медицині, а також суттєво покращило можливість створення кріобанків гамет, ембріонів та соматичних клітин тварин. Замінивши собою у більшості випадків традиційне повільне заморожування, вітрифікація дозволила отримати високі відтворювані рівні виживання (до 99%) та запліднення (до 93%) ооцитів, а також приживлюваності отриманих ембріонів

(до 65,2%) у людини. Однак, незважаючи на всі успіхи застосування цього методу при кріоконсервації ооцитів людини та миші, досі не існує єдиного протоколу вітрифікації ооцитів великого рогатої худоби (ВРХ), а результати, отримані різними групами дослідників, помітно відрізняються.

Зважаючи на вище згадане, дослідження методів кріоконсервації ооцитів корів є досить важливим.

НУБІП України

Тому *метою* магістерської роботи було порівняти ефективність використання різних вітрифікаційних середовищ для заморожування ооцитів корів.

Для цього були поставлені наступні *завдання*:

1. Відпрацювати методику вилучення ооцит-кумулясних комплексів з яєчників корів після забою.

2. Оволодіти методикою оцінки ооцит-кумулясних комплексів та ооцитів.

3. Дослідити ефективність використання вітрифікаційних середовищ різних виробників (Kitazato, Cryotech, Irvine Scientific) для криоконсервування ооцитів корів.

4. Дослідити життєздатність ооцитів корів за різного часу еквілібрації ооцитів під час їх вітрифікації.

1.1. Біотехнологічні методи відтворення поголів'я

Стабільне відтворення поголів'я є складним та економічно важливим питанням у технології виробництва тваринницької продукції. Воно є головною умовою інтенсивного розвитку галузі. З кожною новою твариною, яка включена в процес відтворення, визначають рівень, ефективність та якість виробництва продукції у період, що залежить від тривалості господарського використання тварин та інтервалу між поколіннями [3].

Велика рогата худоба має важливе значення у виробництві тваринницької продукції, але вона належить до одноплідних видів тварин. Її чисельність та плодючість відносяться до чинників, що обмежують відтворення, і як наслідок – виробництво м'яса та молока. Сучасні біотехнологічні методи дають змогу впливати на відтворювальний потенціал самок, значно підвищити кількість високопродуктивних особин, і у результаті збільшити виробництво продукції тваринництва [4].

Важливою проблемою скотарства в Україні є низький рівень відтворення тварин через зниження чисельності поголів'я за зростання його продуктивності.

За даними Державної служби статистики України у 2017 році вихід телят становив 69 голів на 100 корів. Це є наслідком природного біологічного антагонізму між надоем і відтворювальною здатністю корів. До інших факторів зниження репродуктивної здатності також відноситься зростання кількості післяродових ускладнень (ендеметрики, субінволюція матки), які зумовлені зниженням професійного рівня техніків зі штучного осіменіння корів і телиць та ветеринарних фахівців. Отже кадрове питання є основним для більшості господарств [2].

Біотехнологія відтворення тварин є важливим розділом наукового напрямку, що пов'язаний із кріоконсервуванням гамет, ембріонів, інших клітин, у яких закладена морфофункціональна інформація про біологічний об'єкт. Сьогодні біотехнологія разом з нано- та інформаційно-комунікаційними технологіями опинилися на найвищому місці досягнень людства як наслідок технологічної еволюції. Даний напрям досліджень забезпечує широкий діапазон інноваційних перетворень, що створюють умови для прискорення прогресивних змін як у тваринництві, так і у економіці взагалі. Провідні країни світу вже мають потужну біоіндустрію. Однак, в Україні діапазон застосування біотехнологічних підходів є значно вузьким, їх використання носить фрагментарний характер. Таким чином, ключовими задачами є створення належних умов для впровадження й функціонування біотехнологічних методів на сучасній науковій основі, їх масове поширення у тваринництві, а також посилення впливу економічних та соціальних чинників на розвиток біотехнологічної галузі [18, 22].

Наразі одним з найбільш перспективних сучасних біотехнологічних прийомів з гаметами сільськогосподарських тварин є запліднення попередньо відібраних та дозрілих поза організмом ооцитів корів *in vitro*. Вдале запліднення деконсервованих яйцеклітин та розвиток зародків після їх культивування є об'єктивним критерієм успішного кріоконсервування гамет самиць. Було доведено, що на життєздатність деконсервованих гамет впливає не лише технологія глибокого заморожування і деконсервації, а також якість та стадія

розвитку гамет перед кріоконсервуванням. Результати досліджень надшвидкого заморожування клітин можуть забезпечити життєздатність гамет корів на високому біологічному рівні без застосування дорогої кріобіологічної техніки [31, 34].

За останні роки було успішно досліджене та проведене дозрівання й запліднення *in vitro* нативних та деконсервованих гамет, отриманих з антральних фолікулів сільськогосподарських тварин. Були розроблені технології отримання та необхідні умови зберігання ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) з яєчників тварин, далі проводилося їх культивування та запліднення поза організмом. Це дає можливість одержувати значно більшу кількість ембріонів для наукових і для практичних цілей від різних видів тварин з високим генетичним потенціалом.

1.2. Критерії відбору корів-донорів ооцитів

З метою поліпшення продуктивності тварин з покоління в покоління дуже важливим селекційним методом є добір високопродуктивних корів.

Використовуючи кріоконсервацію ооцитів та подальше отримання ембріонів значення добору зростає, тому що різко збільшується кількість нащадків, що можуть стати як поліпшувачами, так і погіршувачами поголів'я [5].

Донор (від латинського *dono* – дарую) – це корова чи телиця парувального віку, яка має високу племінну цінність і від якої після гормональної стимуляції суперовуляції, отримують ооцити [21].

До основних критеріїв при обиранні корів-мадонорів є їх висока генетична цінність і здатність передавати бажані ознаки нащадкам. Необхідно враховувати їх походження, тривалість господарського використання, продуктивність батьків, їх відтворні якості. Зазвичай, продуктивність донора повинна бути на 50–60 % вище стандарту по породі, а вміст жиру в молоці може бути таким самим чи вищим стандарту [18].

Корови-донори з високою відтворюючою здатністю мають відповідати вимогам класу еліта-рекорд за селекційними ознаками і бути стійкими до технологічних стресів. Як правило, на роль донорів використовують високопродуктивних тварин молодого віку, які за останні 3 роки мали не менше

2-х нормальних отелень з відповідною тривалістю міжотельного періоду. За умови гарної племінної цінності та доброго стану здоров'я у якості донорів можна використовувати вибракуваних корів, але якщо причина вибракування не пов'язана з їх відтворюючою здатністю. Телиці парувального віку відбираються на донорів за наявності відмінного родоходу та доброго фізичного стану. Однак, лактуючі корови краще реагують на гормональні обробки [21].

Усім донорам оформлюють ветеринарне свідоцтво в господарствах, які безпечні на інфекційні захворювання (хламідіоз, лейкоз, туберкульоз, інфекційний ринотрахеїт, бруцельоз, лептоспіроз, кампілобактеріоз, трихомоноз, ящур). Корови мають бути вакцинованими згідно інструкцій до протиепізоотичних заходів для даної зони. Добір проводять комісійно [21].

Кожного донора обов'язково клінічно обстежують. Донорів з інших господарств попередньо карантинують. В анамнезі не має бути маститів, патологічних родів, затримання посліду, післяродових ускладнень, статеві цикли повинні бути повноцінними. За ректального дослідження у корови визначають стан яєчників, розміри і тонус матки. Тварин, що мають патологічні зміни статевих органів, неповноцінні статеві цикли, захворювання кінцівок, ознаки остеомалачії виключають з числа донорів [21].

Для доброї відтворюючої здатності, перш за все, потрібна повноцінна годівля корів, враховуючи їх фізіологічний стан та продуктивність. Незбалансований раціон призводить до порушення обміну речовин та репродуктивної функції.

Отже, корів-донорів важливо годувати доброякісними кормами за індивідуальним раціоном, включаючи концентровані корми, якісне сіно та соковиті трави у мінімальній кількості [22].

Донорів утримують в індивідуальних боксах у сухих і світлих приміщеннях із обов'язковим дотриманням санітарних і ветеринарних вимог [5].

Отримання ооцитів в однієї тварини може проводитися з інтервалом в 1-2 тижні [21].

1.3. Спосіб проведення трансвагінальної аспірації ооцитів

Вперше трансвагінальна аспірація ооцитів OPU (Ovum Pick-Up), у великої рогатої худоби була проведена командою датських дослідників у чолі з Callesen Н. В 1987 році, за результатами якої після пункції 38 фолікулів у 7 телиць, стимульованих на суперовуляцію, було отримано 16 ооцитів [8].

Для проведення прижиттєвої трансвагінальної аспірації ооцитів з фолікулів яєчника використовують апарат OPU. Даний прилад складається з ультразвукового сканера, вакуумної помпи, пункційної насадки, голки діаметром 18G. Технічно процедура виглядає наступним чином. Тримач зонду з ультразвуковим датчиком поміщають у піхву та розташовують перед шийкою матки. Ультразвуковий датчик забезпечує візуалізацію яєчника та розташованих в кірковій зоні фолікулів. Далі одну руку вводять у пряму кишку тварини і маніпулюють яєчником відносно передньої частини піхви в безпосередній близькості від шийки матки. Іншою рукою у вагіну просовують тримач зонду, і за висування голки вперед вона проводиться через стінку піхви та направляється у фолікули. Фолікулярна рідина з ооцитами, що отримали з фолікулів, по системі трубок потрапляє у приймач та накопичується у ємкості, що підігривається. У якості середовища для короткочасної локалізації ОКК використовується фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко з додаванням 100 од./мл гентаміцину, гепарину і 2% BSA або фетальної сироватки. Транспортування ОКК доцільно здійснювати в транспортному інкубаторі у середовищі для дозрівання із дотриманням температурного режиму та концентрації CO₂ [5, 7, 20].

Варто зазначити, що отримання ооцитів методом трансавагінальної аспирації сприяє не лише більш ефективному використанню тварин, що мають цінне господарське значення, але також дає можливість отримання більшої кількості компетентних ооцитів з однаковим фізіологічним статусом. Даний фактор визначає успіх методу [22].

1.4. Виділення ооцитів із яєчників *in vitro*

Після оваріектомії морфологічно нормальні яєчники доставляють в лабораторію. Якщо транспортування яєчників до лабораторії займає нетривалий час (2-3 години), температура розчину, в якому знаходяться яєчники, повинна бути у межах 30-35°C. Якщо транспортування потребує більш тривалого часу (більше 6 годин), температура розчину повинна знаходитися в межах 20-25°C [20].

Виділення ооцитів проводиться в стерильних умовах з використанням нагрівальних поверхонь. У чашку Петрі або конічний фільтр поміщається невелика кількість попередньо приготованого та підігрітого до температури +37°C розчину середовища Дюльбекко з додавання фетальної сироватки та антибіотиків. Яєчник в цьому середовищі фіксується пінцетом. Потім за допомогою стерильного леза розсікають тканини яєчника, після чого місця розрізів ретельно промивають підготованим розчином середовища [22, 29].

В технології отримання ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* потрібні ооцити, які здатні відновлювати мейоз, дозрівати та запліднюватися *in vitro* з отриманням життєздатних ембріонів, придатних для подальшої трансплантації [21].

За відбору ооцит-кумулясних комплексів звертають увагу на такі морфологічні параметри, як: наявність кумулюсу та його якість, розмір ооцита, гомогенність та клір ооплазми, ширина та рівномірність зони целлюлиди, тургор. Локалізацію ооцит-кумулясних комплексів проводять за допомогою

сітчастого фільтра, візуалізацію та оцінку якості ооцитів здійснюють з використанням стереоскопічного мікроскопа [14].

1.5. Характеристика дозрівання відібраних яйцеклітин

Усі технологічні процедури з ооцитами для отримання ембріонів *in vitro* мають проводитися згідно прийнятих протоколів з дотриманням правил асептики [8].

Після отримання та відбору ооцити поміщають у середовище дозрівання та витримують упродовж 22-24 годин у газових інкубаторах за вологості 98% та температури $+38,5^{\circ}\text{C}$. Розроблені різні методи дозрівання ООК *in vitro*. Вирішальним фактором культивування ооцитів тварин для їх повноцінного дозрівання і подальшого запліднення є вибір складу культуральних середовищ.

Наприклад, додавання до середовища 199 на розчині Ерла для культивування 0,001% наноматеріалу ВДК/D-галактозаміну або ВДК/N-галактози позитивно впливає на динаміку мейотичного дозрівання ооцитів *in vitro*, через що вихід дозрілих ооцитів збільшується [10, 13].

Культивування відібраних ооцитів можна проводити впродовж 24-х годин в чашках Петрі (по 25–30 ООК у 1 мл) у середовищі для дозрівання – 199 на розчині Ерла (Sigma, M 2017), яке доповнюють 20% інактивованою нагріванням (56°C , 30 хвилин) еструсною сироваткою корів, 0,068 мг/мл канаміцин сульфату, 0,11 мг/мл пірувату натрію і 0,1 мг/мл глютаміну. Для культивування до середовища необхідно додавати клітини гранульози у кількості $3-5 \times 10^6$ на 1 мл, які вилучають із антральних фолікулів без ознак атрезії. Критерієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів є наявність першого полярного тільца [8].

Також дозрівання ооцит-кумулясних комплексів поза організмом можна проводити в присутності клітин гранульози за концентрації $3-6 \times 10^6$ клітин у 1 мл культурального середовища, в чотириланкових планшетах протягом 27 годин

при температурі $38,5^{\circ}\text{C}$ та 5%-ному вмісті CO_2 в повітрі, у краплях середовища 199 з 10%-ною попередньо інактивованою сироваткою корів, $1,0$ мкг/мл естрадіолу, $2,5$ МОд/мл лютеїнізуючого гормону, $2,0$ мМ натрію пірувату, $2,92$ мМ кальцію лактату, 40 мкг/мл гентаміцину [13].

Для того, щоб оцінити стадії мейотичного дозрівання поза організмом деконсервованих і нативних ООК корів та виявлення у них хромосомних порушень протягом дозрівання, частина гамет із загальної кількості, обраних для культивування, підлягає цитогенетичному аналізу. Для цього готують сухоповітряні препарати за модифікованим методом А.К. Tarkowski. Ооцит-кумулясні комплекси спершу механічно, піпетуванням, звільняють від клітин кумулюса, далі переносять у 0,9% гіпотонічний розчин 3-х замщеного цитрату натрію при кімнатній температурі на 10 хвилин і фіксують на попередньо знежиреному сухому склі фіксатором Карнуа (метанол:льодяна оцтова кислота = 3:1). Препарати забарвлюють 2,0% розчином барвника Гімза [45, 41].

1.6. Морфологічний стан отриманих ооцитів корів та критерії їх класифікації

За результатами досліджень ООК різних видів тварин було встановлено, що більш доцільним є використання яєчників на стадії фолікулярного росту, тому що з них можна вилучити більшу кількість придатних до культивування *in vitro* ооцитів і менше дегенерованих гамет [Зюзюн, 2016].

Вилучені із антральних фолікулів яєчників ооцити, залежно від стану кумулюса та ооплазми, розподіляють на чотири групи:

1. Ооцити, які оточені щільним багат шаровим кумулюсом, із однорідною невакуолізованою ооплазмою – найкращі для культивування поза організмом;
2. Ооцити, які оточені розпушеним шаром кумулюса та однорідною невакуолізованою ооплазмою – придатні до культивування поза організмом;

3. Ооцити, що частково втратили кумулюс, але з невакуолізованою однорідною ооплазмою – умовно придатні до культивування поза організмом.

4. Ооцити – атретичні, денудовані, з вакуолізованою ооплазмою, які непридатні до подальшого розвитку та до культивування в умовах *in vitro* [14].

За мікроскопії ооцитів необхідно звертати увагу на морфологічні варіанти веретена поділу. Веретено поділу може: бути компактным, ромбоподібним, з чіткими краями; мати змінену форму та розмиті края; слабо візуалізуватися; візуалізуватися на межі полярного тіла і цитоплазми; не візуалізуватися; мати зміну орієнтації осі відповідно до полярного тіла; бути збільшеним в розмірі.

Кут розміщення веретена поділу відносно полярного тіла також може відрізнятися (від 0° до 180°) [6].

Ембріони, які отримують з ооцитів з чіткою візуалізацією веретена поділу, краще запліднюються, розвиваються та імплантуються, у порівнянні з тими ооцитами, в яких веретено не візуалізується. Морфологія веретена яйцеклітини має взаємозв'язок із еуплоїдністю ембріона. Розташування мейотичного веретена корелює з рівнем запліднення, дробленням ембріона, та його якістю по відношенню до першого полярного тіла також. Згідно до світових даних, з

ооцитів, в яких візуалізується чітке, правильної форми веретено, отримують більше euploidних ембріонів, в порівнянні з ооцитами, в яких веретено візуалізується слабо або взагалі відсутнє. Кріоконсервація може викликати зміни морфологічних характеристик мейотичного веретена та призводити до його руйнації через те, що воно є дуже чутливим до різноманітних факторів кріоконсервування [6, 15].

1.7. Методи кріоконсервування ооцитів

Біологічний матеріал може зберігатися за температури -196°C тривалий час, не втрачаючи своєї життєздатності, оскільки за цієї температури метаболічні процеси практично призупинені (Mazur, 1970). Це теоретичне положення

підтверджується на практиці отриманням нащадків із заморожених ембріонів, що знаходилися в кріобанку декілька десятків років (Glenister, Thornton, 2000) [5].

Заморожування та відтаювання живих клітин представляє собою комплексний фізико-хімічний процес, що регулюється тепло- та водообміном між клітиною та зовнішнім середовищем, протягом якого рідка фаза біооб'єктів переходить в тверду та навпаки. Життєздатність клітин за охолодження та заморожування залежить від ряду факторів, таких як швидкості охолодження, поверхнево-об'ємного відношення, проникності клітинних мембран, температурних коефіцієнтів проникності [11].

Для більш повного розуміння механізму заморожування та відтаювання клітин необхідно розуміти деякі термодинамічні процеси, які відбуваються в клітині в цей період. Відомо, що більше 20% клітинної субстанції знаходиться у твердому стані, всі інші клітинні компоненти знаходяться у водному розчині, що перебуває у рівновазі із навколишнім середовищем. Тому, якщо звичайна вода замерзає при 0°C , то присутність в клітинній субстанції іонів розчинених в ній солей, за мінусових температур близьких до 0°C , знижує точку замерзання, тобто розчин охолоджується нижче точки свого замерзання без утворення льоду. За подальшого охолодження відбувається спонтанне утворення центрів кристалізації, що супроводжується наростанням фронту кристалізації та різким підвищенням температури, оскільки зміна агрегатного стану змінює накопичену між частинками клітини теплову енергію, яка в залежності від утворення кристалів або їх відтаювання відповідно віддається або поглинається. При утворенні кристалів частина води виморожується, а концентрація речовин в розчині підвищується, що призводить до дестабілізації осмотичної рівноваги. На ці зміни клітина відповідає осмотичною реакцією, тобто віддачею води в екстрацелюлярне середовище для вирівнювання осмосу з наступним утворенням інтрацелюлярного льоду. Однак, з віддачею клітиною води у зовнішнє середовище, підвищується концентрація солей у самій клітині, тому від того, з

якою швидкістю клітина віддає або поглинає воду, залежить збереженість клітинних структур і навіть самої клітини під час кріоконсервації [5, 33, 42].

Перші дослідження із заморожуванням були проведені на ембріонах у 1978 році С.М. Уілраден, К. Полдж і Л.Е. Роусон. С.П. Лейбо у 1984 році удосконалив дану методику. Однак для використання цих розробок на сільськогосподарських тваринах знадобилося ще 20 років досліджень. До недавнього часу широко використовувався метод повільного одноступінчастого заморожування, але відносно ооцитів його ефективність була невисокою – лише у 50% яйцеклітин вдавалось відновити життєдіяльність, решта руйнувалася через кристалики льоду. У 2000 році японський дослідник Масаріше Куваяма розробив новий спосіб швидкого заморожування ооцитів – метод вітрифікації, за якого спостерігалось до 98% вдалих розморожувань [1, 35].

Низькотемпературна консервація ооцитів сільськогосподарських тварин є необхідним для науково-дослідної роботи і практичних цілей. Отримані яйцеклітини дають змогу використовувати їх для різних біотехнологічних досліджень, наприклад у генетичній інженерії або клонуванні. Кріоконсервування гамет *in vitro* є джерелом біологічного матеріалу для розробки передових методів зберігання та використання генетичного потенціалу у тваринництві. На ембріонах, отриманих *in vitro*, вивчають особливості перебігу раннього ембріогенезу. Крім того, отримати ембріони, які були сформовані в організмі тварини, можливо лише хірургічним методом або після забою тварини, що не завжди є зручним та доцільним [1, 38].

Передумовою кріобіологічної технології статевих клітин та ембріонів став принцип зберігання ізольованих клітин у суспензіях, наприклад, спермійів, клітин крові і різних ліній культивованих клітин. Однак, різні типи і колонії клітин мають власний режим охолодження та відтаювання, тому їх можна змінювати відповідно до специфіки клітини [30].

Кріоконсервація жіночих гамет більшості видів ссавців, на відміну від заморожування сперматозоїдів, до сих пір викликає труднощі. Ооцит – дуже

велика за розміром клітина з водонепроникними зовнішніми шарами, тому кріопротекторам важко проникнути всередину клітини через цитоплазматичну мембрану. Саме тому, генетичні ресурси лабораторних тварин частіше зберігають у вигляді заморожених ембріонів або сперматозоїдів, ніж у вигляді ооцитів (Glenister, Thornton, 2000; Landel, 2005; Agca, 2012) [1, 23].

Одна з основних проблем, яка виникає за заморожування жіночих гамет – затвердіння прозорої оболонки (zona pellucida). Ця еластична глікопротеїнова оболонка оточує яйцеклітину, відділяє її від навколишнього середовища та виконує ряд життєво важливих функцій. Після проникнення сперматозоїда в ооциті запускається каскад біохімічних реакцій, який викликає викид назовні вміст кортикальних гранул. Ці реакції модифікують прозору оболонку, яка перетворюється на так звану оболонку запліднення, що перешкоджає поліспермії – проникненню в яйцеклітину більш одного сперматозоїда. Процеси

замороження/розмороження призводять до мимовільного спорожнення кортикальних гранул, які ускладнюють або унеможливають подальше запліднення таких ооцитів (Matson et al., 1997) [1, 37].

Інша не менш серйозна проблема полягає в тому, що яйцеклітини більшості ссавців після овуляції знаходяться в стані незавершеного мейозу, тонкі механізми якого часто пошкоджуються процедурами кріоконсервації, що також запобігає подальшому заплідненню. Веретено поділу яйцеклітини є дуже чутливим до дії низьких температур, що може призвести до порушення розходження хромосом за поділу ооцита після відтаювання. Таким чином, дуже важливу роль відіграє підготовка ооцитів до заморожування, їх захист від осмотичних та температурних пошкоджень [38].

Внаслідок перерахованих вище причин, методи заморожування ооцитів не є рутинною процедурою, однак, технології кріоконсервації яйцеклітин ссавців інтенсивно розроблюються і прогресують (Noyes et al., 2010) [5].

Найважливіший фактор у процесі заморожування ооцитів – швидкість охолодження, яка для багатьох клітин становить 1°C за одну хвилину. Значний

вплив на життєздатність клітин має також швидкість відтаювання, яка залежить від швидкості охолодження. За повільного охолодження рівень виживання вищий за умовою повільного відтаювання, швидке охолодження потребує швидкого відтаювання [17].

Краще переносять заморожування свіжі клітини, хоча за заморожування ооцитів нижче 0°C в них можуть виникати наступні ушкодження: утворюються кристалики криги, через що зникає вода і збільшується концентрація розчинених речовин у клітині (настає осмотичний шок). За використання дуже повільного заморожування кристалики криги не утворюються, проте відбувається зневоднення клітини, а швидке заморожування призводить до утворення кристаликів. Отже, для вирішення цієї проблеми необхідно використовувати кріопротектори. Вони поділяються на дві групи: внутрішні та зовнішні. До внутрішніх (проникаючих), тих, які вводять всередину клітини щоб запобігти створенню криги, відносяться диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин, етиленгліколь, пропандіол, етанол тощо. Для цих кріопротекторів характерні висока розчинність за великих концентрацій, а низька молекулярна маса обумовлює їх проникність до клітини. Зовнішні (не проникаючі) кріопротектори не потрапляють всередину клітини, але вони запобігають її осмотичному руйнуванню в той час, коли вода швидко потрапляє всередину клітини під час відтаювання, а внутрішній кріопротектор виходить назовні повільно, і цим викликає набухання і пошкодження клітини. Зовнішніми кріопротекторами є полівінілпіралідон (ПВП) та розчин сахарози, висока молекулярна маса яких не дозволяє їм проникати в клітини [23, 38].

Проникаючі до клітини кріопротектори можуть підрозділятися в залежності від типу клітин та складу зовнішнього середовища на ті, які структурують та деструктурують воду, що сприяє проникненню кріофілактитів до клітини. Захисна дія кріопротекторів починається лише після його повного проникнення до клітини у мультиполярній концентрації та хімічної еквілібрації [42].

Під час процесу заморожування спершу знижується температура в навколоклітинному середовищі. Тут поступово збільшується кількість криги, а в решті розчину зростає концентрація солей. Це сприяє виникненню різниці осмотичного тиску між позаклітинною та внутрішньоклітинною фазами. Вона може зрівноважитися шляхом віддачі води клітиною у позаклітинне середовище.

З метою уникнення кристалізації внутрішньоклітинної води у середовище додають кріопротектори диметилсульфоксид (ДМСО) чи гліцерин, а для того, щоб не допустити осмотичних зрушень, кристалізацію штучно стимулюють на певній стадії. Однак, введення до складу середовища з ооцитами кріопротектора, або його видалення, також може викликати осмотичні зрушення. Тому

еквілібрацію (насичення) виконують поступово, поміщаючи клітини на годинникових скельцях у чашках Петрі спочатку на 5-10 хвилин у 0,25 М розчин ДМСО, потім – в 0,5 М, 1,0 М і, в кінці, в 1,5 М розчин. В останньому розчині

ооцити витримують 15-20 хвилин. У випадку, коли кріопротектором є гліцерин, то ооцити спочатку поміщають на 10 хвилин у 3,3% його розчин, далі на 14 хвилин у 6,6% і на 30 хвилин у 10% розчин. Після розморожування клітин, їх

відмивають від кріопротектора, переводячи поступово з розчинів з більшою концентрацією кріопротектора у розчини з меншою концентрацією. Після

насичення кріопротектором, клітини розфасовують по 1-4 штуки у пробірки або пайети для заморожування, які закривають зволженим корком. Для того, щоб запобігти перепаду температур та уникнути осмотичних змін за температури 4-

5°C до початку утворення криги стимулюють кристалізацію додаванням до розчину кристалика йодистого срібла, шматочка криги або просто переохолодженого предмета [8, 23, 26].

Повільне заморожування та розморожування яйцеклітин можна проводити за різними методиками, що передбачають наступні дії: 1)

охолодження клітин від +20°C до -7°C зі швидкістю 1°C/хв.; 2) викликання кристалізації (торкання холодним предметом до пробірки чи ампули, наприклад переохолодженим у рідкому азоті пінцетом); 3) охолодження зі швидкістю

0,3°C/хв. до -36°C; 4) охолодження зі швидкістю 0,1°C/хв. до -60°C; 5) перенесення у скраплений азот для швидкого охолодження. Розмороження відбувається у спиртовій бані (скляній колбі) за температури -50°C, куди переносять пробірки або ампули з клітинами та розморожують за кімнатної температури зі швидкістю 4°C/хв. до 10°C. Далі їх поміщають на 5 хвилин у водяну баню за температури 20°C. Після цього ооцити нарешті переносять у середовище для видалення кріопротектора [37, 43].

Успішне застосування методу **вітрифікації** для кріоконсервації ооцитів та ранніх ембріонів упродовж останніх 10-15 років змінило ефективність застосування допоміжних репродуктивних методів у медицині, а також значно покращило можливості створення кріобанків гамет, ембріонів та соматичних клітин тварин. Сутність методу полягає у насиченні клітин комплексом кріопротекторів у високих концентраціях з наступним короткочасним охолодженням та зануренням у рідкий азот. Кріоконсервація в такому випадку проводиться без програмних заморозувачів та спеціальних приладів. Цей спосіб дозволяє скоротити тривалість заморожування до кількох хвилин [26, 39].

Замінивши собою у більшості випадків традиційне повільне заморожування, вітрифікація дозволила отримати високі відтворені рівні виживання (до 99%) та запліднення (до 93%) ооцитів, а також приживлення отриманих ембріонів (до 65,2%). Однак, не дивлячись на всі досягнення використання цього методу за кріоконсервації ооцитів, до сих пір не розроблений єдиний протокол вітрифікації ооцитів ВРХ, а результати різних груп дослідників помітно відрізняються [40].

Від самого початку принцип вітрифікації в мінімальному об'ємі дозволив збільшити відсоток бластоцист, які отримували після запліднення кріоконсервованих ооцитів ВРХ, до 15-25% від загальної кількості культивованих ембріонів, що значно перевищувало результати повільного заморожування за програмою (2-10%). Розробка нових методів вітрифікації, що дозволяє зберігати життєздатність ооцитів ВРХ на високому рівні після

криоконсервації, є перспективною для використання у програмах селекції та відтворення поголів'я, зберігання різноманіття порід та впровадження у практику сільського господарства біотехнологічних методів, наприклад клонування або трансгенезу [32].

Метод вітрифікації є легким у застосуванні, швидко використовується та не потребує контролю зміни температур [36].

Вітрифікація полягає у переході речовини з рідкого агрегатного стану у твердий аморфний без кристалізації. Для того, щоб досягти цього ефекту за криоконсервації біологічних об'єктів необхідні надвисокі швидкості її охолодження/нагрівання та висока концентрація кріопротекторів у розчинах вітрифікації. Надвисокі швидкості у більшості сучасних методів досягають застосуванням принципу охолодження в мінімально можливому об'ємі (<0,1 мкл) та прямого контакту зразка, що вітрифікується з рідким азотом [40, 44].

Основною властивістю вітрифікаційної суміші є висока концентрація внутрішніх кріопротекторів, які стають желеподібними за низької температури і через це застигають у склоподібній формі. Завдяки цьому в клітинах не утворюються кристали криги, що призводять до руйнування клітин у процесі криоконсервації. Хоча ооніти корів мають підвищену чутливість до процесів заморожування-відтаювання, вітрифікація забезпечує кращу виживаність, ніж повільне заморожування. Недоліком цього методу є токсичність кріопротекторів у вітрифікаційному розчині через їх високі концентрації під час еквілібрації, яка потрібна для проникнення кріопротектора всередину клітин для запобігання формування внутрішньоклітинної криги. Досліджуючи токсичність різних внутрішніх кріопротекторів під час дії на моруди мишей, було доведено, що найменш токсичним є етиленгліколь – ЕГ (98% виживаності *in vitro*), а більша токсичність спостерігалася для гліцерину – 88%, ДМСО – 68%, пропіленгліколю – 16%. Таким чином, серед вказаних кріопротекторів кращим за проникністю є етиленгліколь. Важливою характеристикою для проникаючих агентів є їх здатність до швидкого потрапляння у клітини, що забезпечує менш тривалу

еквілібрацію. Завдяки тому, що дифузія води із клітини пройде швидко, зменшиться ризик осмотичних пошкоджень і токсичного впливу на клітини. До вітрифікаційних розчинів додають також і зовнішні агенти, які мають значний осмотичний ефект. Серед них найчастіше використовується сахароза [27, 36, 40].

Найчастіше, за вітрифікації ооцитів та ембріонів ссавців використовують з проникаючих кріопротекторів саме ДМСО та EG. Їх висока сумарна концентрація у розчинах еквілібрації та вітрифікації (15 і 30 % відповідно) дозволяє запобігти утворенню кристалів льоду всередині клітини. Однак в таких концентраціях за тривалої інкубації кріопротектори є токсичними для ооцитів ссавців. У той самий час через те, що ооцит великої рогатої худоби досить великий (діаметром близько 120 мкм), для повноцінного та рівномірного насичення всієї ооплазми проникаючими кріопротекторами, потрібен триваліший період еквілібрації, у порівнянні з клітинами меншого діаметру. З

метою дотримання обох необхідних умов – зменшити негативний вплив EG та ДМСО на ооцити ВРХ та забезпечити оптимальне насичення ооплазми кріопротекторами, знижують їх концентрацію у розчині еквілібрації у порівнянні з загальноприйнятим протоколом Kuwayama et al., а тривалість еквілібрації навпаки збільшують до 15 хвилин. Зниження концентрації проникаючих кріопротекторів в розчині еквілібрації також призводить до меншого зниження об'єму самих ооцитів, у порівнянні з обробкою за протоколом Kuwayama et al., що може позитивно впливати на їх здатність переносити кріоконсервацію методом вітрифікації [27, 39].

Відомо, що EG та ДМСО викликають швидке підвищення концентрації іонів Ca^{2+} в ооплазмі. Під впливом ДМСО збільшення цитоплазматичної концентрації іонів Ca^{2+} відбувається в основному через їх вихід з ендоплазматичного ретикулуму та майже не залежить від наявності цих іонів у навколишньому ооцит-розчині. Не дивлячись на те, що запаси іонів Ca^{2+} в ооцитах ВРХ скорочується у процесі дозрівання, кальцій з ендоплазматичного ретикулуму відіграє головну роль в активації ооцита після запліднення та

ініціації процесів, що ведуть до першого поділу дроблення. У той же час у випадку з EF видалення іонів Ca^{2+} з розчину інкубації призводить до зменшення даного ефекту. Підвищення концентрації іонів Ca^{2+} в ооциті може призводити до мимовільної активації ооцитів, передчасному запуску кортикальної реакції, а також опосередковано негативно впливати на нормальне функціонування цитоскелету (особливо мікротрубочок) та мітохондрій. Всі ці фактори можуть призводити до порушення процесів мейозу, запліднення та розвитку доімплантаційного ембріону, до несвоєчасної активації протеаз і фосфоліпаз, запуску апоптозу й деградації ооциту [27, 28].

1.8. Запліднення дозрілих ооцитів *in vitro* та культивування ембріонів

Вперше запліднення *in vitro* було здійснено у 1878 році Шенком на яйцеклітинах кролів й морських свинок. Перше теля за запліднення *in vitro* було отримано у 1981 році Брекетом, ооцит при цьому вилучали з яйцепроводу корови хірургічним шляхом. Перші телята, одержані після пересадження дуже ранніх ембріонів, не мали економічного ефекту. Нині ж відпрацьована методика і технологія запліднення ооцитів *in vitro*, що дає можливість проводити всі етапи отримання ембріонів. Розроблена технологія одержання телят завдяки заплідненню *in vitro* вже має широке практичне застосування. Наприклад, у Великобританії лише на одній фірмі «Енімал Байотехнолоджі Кембрідж лімітід» отримують 30-40 тисяч ембріонів ВРХ на рік [5, 8].

Запліднення яйцеклітин *in vitro* відбувається за таких етапів:

- 1) дозрівання ооцитів,
- 2) капацитація сперматозоїдів,
- 3) запліднення і забезпечення ранніх стадій розвитку ембріонів [8].

Запліднення яйцеклітин у ссавців відбувається в яйцепровадах, що ускладнює доступ дослідників до вивчення умов середовища, де відбувається даний процес. Отже, система запліднення *in vitro* є важливим аналітичним

інструментом з вивчення біохімічних та фізіологічних чинників, що приймають участь в процесі успішного злиття гамет. Окрім того, дана система широко застосовується в технології розведення тварин [21].

За запліднення *in vitro* велике значення має концентрація сперматозоїдів під час його виконання. Так, при заплідненні дозрілих поза організмом ооцитів корів суспензіями спермій з різною концентрацією чоловічих гамет найбільша кількість пенетрованих ооцитів спостерігалася за концентрації $1,0 \times 10^6$ Сп/мол. Запліднюваність ооцитів тварин *in vitro* також залежить від тривалості спільної інкубації зі сперматозоїдами. За спільної інкубації чоловічих та жіночих гамет ВРХ протягом 6, 12, 24 і 48 годин найбільший відсоток дроблення був отриманий після 24-годинного запліднення [5].

Дослідження щодо пошуку нових технологій одержання ембріонів *in vitro* викликають значний інтерес. За допомогою заточеної мікропіпетки можна полегшити пенетрацію яйцеклітин за ін'єкції в них спермій. Такі яйцеклітини можуть добре розвиватися *in vitro* до стадії бластоцисти, а пересаджування їх реципієнтам призводить до народження нащадків. Проблемою при цьому є загибель багатьох ооцитів через їх ушкодження в процесі мікроін'єкції. Проте, цей спосіб, за якого кананітація і акресомна реакція спермій не є необхідними, дозволяє використовувати для запліднення не тільки нормальні, а й мертві, нерухомі, дефектні спермії, або їх голівки. Була здійснена успішна спроба запліднення ооцитів корів *in vitro* шляхом ін'єкції в їх цитоплазму сперматозоїдів, що вважалися біологічно мертвими (по одному в кожную яйцеклітину), через втрату рухової активності після заморожування-відтаювання. За трансплантації морул і бластоцист, отриманих *in vitro* із запліднених цим методом яйцеклітин, було отримано телят. Крім того, ін'єкція сперматозоїдів в ооплазму (метод ICSI) може підвищити ефективність використання способу розподілу чоловічих гамет на X- та Y-спермії завдяки проточної цитометрії, результатом якої є невисока концентрація і знижена життєздатність відібраних у такий спосіб спермій [9, 21, 29].

Також є методи мікрomanipуляції з дозрілими ооцитами тварин, які засновані на порушенні цілісності їх прозорої оболонки з подальшим перенесенням жіночих гамет у суспензію капіцитованих спермій. Вони полягають у проколюванні (просвердлюванні) прозорої оболонки ооцитів або її механічному частковому розсіченні [8].

Проколювання оболонки здійснюють за допомогою мікроголки, а просвердлювання – за допомогою кислого розчину, що виділяється з кінчика мікропіпетки. Проколювання прозорої оболонки ооцитів миші після овуляції дозволяє перебороти *in vitro* нездатність спермій деяких генотипів до запліднення [29].

Для подолання незапліднюваності яйцеклітин може бути використано метод часткового розсічення прозорої оболонки (ЧРО) ооцитів. За розсічення мікроголкою невеликої ділянки прозорої оболонки зрілих ооцитів одноденного віку, які не запліднилися *in vitro* перший раз, майже половина яйцеклітин (45%) після повторного запліднення формували чоловічий і жіночий пронуклеуси, але 23% зигот при цьому були поліспермними. Кількість ооцитів, що розвивалися партеногенетичним шляхом, була незначною – 3,4%. ЧРО значно підвищує запліднюваність яйцеклітин спермою, яка має знижену концентрацію життєздатних чоловічих гамет, а також знижену рухливість і виживаність спермій [5].

Перед початком мікрomanipуляцій, яйцеклітини поміщають у гіпертонічний розчин сахарози для стискання ооплазми, і завдяки розширенню перивітелінового простору здійснюються маніпуляції без пошкодження плазматичної мембрани клітин. Надмірність сахарози призводить до зміни мембранної проникності й ушкодження оолеми, тому важливо встановити мінімальну концентрацію сахарози й оптимальну тривалість обробки. Крім розширення перивітелінового простору важлива роль сахарози полягає також у тому, що, розчин сахарози попереджає множинну пенетрацію ооцитів спермій після просвердлювання або ЧРО [22].

Культивування ембріонів in vitro. Останнім етапом отримання ембріонів є їх культивування у поживному середовищі, під час якого відбувається їх розвиток від зиготи до стадії морули або бластоцисти [18].

Для культивування зародків ВРХ застосовують різні середовища: Ham F-10, 199, Тірода й ін., до складу яких мають входити енергетичні компоненти: піруват натрію, лактат натрію й глюкоза [8].

В ембріонах на різних стадіях розвитку обмін речовин має свої особливості. Наприклад, для ембріонів корів на ранніх стадіях дроблення у якості енергетичного субстрату краще використовувати пірвіноградну кислоту. Після блок-стадії для метаболізму більш придатним субстратом є глюкоза через її засвоєння і переробку на стадії бластоцисти, що різко підвищуються у порівнянні з піруватом натрію [25].

Для культивування ембріонів у середовища додають 10-20% фетальної сироватки теляти. Середовища повинні бути збалансованими за концентрацією водневих іонів (рН 7,2-7,4) та осмолярністю (280-285 мОсм/кг). Зміна осмолярності унаслідок випарування води протягом інкубації призводить до порушення запліднення яйцеклітин і розвитку зародків, через це ооцити і ембріони культивують у зволоженій атмосфері повітря в чашках Петрі в краплях середовища під вазеліновою олією або в закритих культуральних судинах. Вазелінова олія, яка використовується для запобігання зміні осмолярності середовища, має бути попередньо зрівноважена середовищем культивування, інакше в ній можуть розчинятися деякі компоненти середовища. Газова суміш для культивування ембріонів складається з 5% O_2 , 5% CO_2 і 90% N_2 . Зародки культивують у середовищі за температури 39°C в умовах максимальної вологості [5, 8].

Однак, численні експерименти показали, що культивування ембріонів ВРХ, як правило, в культуральних середовищах призводить до зупинки дроблення ембріонів на 8-16 - клітинній стадії їх розвитку. Починаючи з одноклітинної стадії, спроби вдосконалення середовищ і методики

культивування ранніх ембріонів не призвели до вирішення цієї проблеми, лише поодинокі ембріони розвивалися до стадій морули і бластоцисти, тих стадій, за яких ембріони можуть бути пересаджені реципієнтам нехірургічним методом.

Другим критичним етапом у розвитку ембріонів великої рогатої худоби є перехід від морули до бластоцисти [4, 19].

Для подолання блокування дроблення пересаджують ембріони у яйцепровід проміжного реципієнта. Як проміжних реципієнтів, які забезпечують розвиток ранніх ембріонів ВРХ *in vivo* до морули-бластоцисти, використовують кролиць. Недоліком цього способу, що обмежує його масове застосування, відносяться використання в дослідах живих реципієнтів та необхідність проведення хірургічної трансплантації, а також можливі втрати ембріонів за їх вилучення з реципієнтів [21].

Культивування в ізолюваних яйцепровадах може стати ефективним способом розвитку ембріонів сільськогосподарських тварин. Наприклад, культивування запліднених яйцеклітин свиней в умовах органної культури в ізолюваних яйцепровадах мишей після індукції в них овуляції і спарювання із самцями, призвело до розвитку 78% зародків свиней і 23,8% і 24,0% зародків великої рогатої худоби до стадії морули-бластоцисти. Утворенню клітинами яйцепроводу мишей певних факторів росту для розвитку ембріонів сприяла гормональна обробка самок мишей. Серед цих речовин є інсуліноподібні фактори росту, що виявлені в яйцепровадах миші. У яйцепровадах корів під час проходження ембріонів знайдено пептид, подібний епідермальному факторові росту [24].

Культивування ембріонів *in vitro* у культуральному середовищі є найпростішим і дешевим способом їх розвитку до морули-бластоцисти. Для подолання блокування дроблення ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* потрібна наявність в середовищі культивування біологічно активного компонента, який вироблюється деякими клітинними системами [22].

Установлено, що для культивування розділених ембріонів великої рогатої худоби добре підходить система моношару ендометріальних фібробластів. Про сприятливий вплив трофобластичних пухирців 13,5-денних ембріонів ВРХ на розвиток інтактних і розділених на половинки 8-16-клітинних ембріонів великої рогатої худоби повідомили Р.Рейрі та ін. Розвитку 36% ембріонів ВРХ до 16-клітинної і більш пізніх стадій розвитку сприяло додавання маточних факторів – фібронектину і гепарину до середовища культивування. На можливість використання амніотичної порожнини ембріона курчати для розвитку ембріонів великої рогатої худоби до стадії морули-бластоцисти вказують Блейквуд й ін. До числа клітинних найбільш ефективних систем, які використовують для культивування ембріонів ВРХ, відносяться моношар епітеліальних клітин яйцепроводу і моношар клітин гранулези корів [8].

Без прямого контакту з моношаром епітеліальних кліток яйцепроводів корів може здійснюватися культивування запліднених яйцеклітин корів. Наприклад, при відділенні зародків мікропоровою мембраною або в середовищі, в якому попередньо культивували епітеліальні клітки яйцепроводу, а також, як показали недавні дослідження, у синтетичній рідині яйцепроводів [24].

Здатність моношару епітеліальних клітин яйцепроводів корів до підтримки розвитку ембріонів ВРХ *in vitro* до стадії бластоцисти пов'язана із секрецією клітин моношару в середовище культивування білків з різною молекулярною вагою. Встановлено, що низькомолекулярний білок, який секретується моношаром епітеліальних клітин яйцепроводів корів (< 10 кДа), як і фетальна сироватка теляти, впливає на перші розподіли дроблення ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* до 8-клітинної стадії, а білок з більш високою молекулярною вагою (> 10 кДа) сприяє розвитку ембріонів від 8-клітинної стадії до стадії бластоцисти [5].

Досліджено позитивний вплив різних факторів росту на розвиток ембріонів поза організмом. Фактори росту продукуються як самим ембріоном (аутокринні), так і, наприклад, епітелієм яйцепроводів і матки (паракринні). Так,

додавання до середовища культивування ембріонів інсуліноподібного фактора росту (ІФР) або епідермального фактора росту (ЕФР) сприяє розвитку ембріонів ВРХ до стадії бластоцисти. ІФР та інсулін сприяють дробленню і компактизації ембріонів, формуванню бластоцисти, стимулюють синтез білка в трофобластичній оболонці (ТЕ) і внутрішньоклітинній масі (ВКМ). ЕФР, ефективний у період розвитку від морули до бластоцисти, стимулює синтез білка в ТЕ; тромбоцитарний фактор росту сприяє розвитку ембріонів великої рогатої худоби в середовищі без сироватки до і після 8-клітинної стадії. Фактор росту, що трансформує (ТФР), і основний фактор росту фіброblastів сприяють формуванню бластоцисти; крім того, ТФР стимулює подовження ембріоном амінокислот і сприяє експансії бластоцисти [8].

Для великої рогатої худоби застосовують наступну схему запліднення *in vitro* і культивування ранніх ембріонів. Запліднення *in vitro* проводять у краплі модифікованого середовища Трода. Після дозрівання *in vitro* ооцити частково очищують від навколишніх кумулюсних клітин і переносять у кожну мікрокраплину по 5 ооцитів. Для досягнення у краплинах концентрації спермій 1,0-1,5 млн/мол, їх суспензію в об'ємі 2-5 мкл додають до середовища з ооцитами. За 44-48 годин після запліднення визначають наявність дроблення ооцитів. У подальшому ембріони поміщають на моношар епітеліальних клітин для наступного розвитку протягом 5 днів [3].

1.9. Висновок з огляду літератури

Кріоконсервація гамет та ембріонів широко використовується для збереження генетичних ресурсів лабораторних, сільськогосподарських та рідких видів тварин (Comizzoli et al., 2009; Амстиславский, Трукшин, 2010; Agca, 2012).

Не дивлячись на те, що вже успішно заморожені гамети та ембріони декількох десятків видів ссавців, а кріобанки генетичних ресурсів стали рутинною практикою роботи генетичних центрів, до сих пір не існує єдиного

універсального протоколу заморожування та відтаювання ембріонів навіть для мишей. В деяких генетичних центрах, в яких створені кріобанки, використовують програмне заморожування, в інших – виключно вітрифікацію.

Між тим, за минулі десятиріччя кріобіологія швидко розвивалась і досягла значного прогресу у розумінні механізмів кріопошкодження та кріозахисту.

Останнім часом, з'явилися нові підходи у дослідженні цих питань з використанням сучасних методів фізики.

На сьогоднішній день існує 2 основних способи заморожування біологічних об'єктів: програмне заморожування та вітрифікація. Перший спосіб полягає в охолодженні з відносно невеликими швидкостями, за спеціальною програмою, що складається з декількох стадій. Під вітрифікацією розуміють процес надшвидкого охолодження, коли кристали льоду взагалі не утворюються.

Вітрифікація відноситься до нерівноважного процесу, за якого відбувається утворення аморфної твердої фази.

За обох методів ключовим є використання кріопротекторів, які ділять на внутрішні (проникаючі) – ДМСО, гліцерин, пропіленгліколь, етиленгліколь, метанол, та зовнішні (непроникаючі) – різні оліго- та полісахариди: сахароза, трегалоза, фікол, рафіноза, фруктоза тощо.

Розроблення та використання методів заморожування клітин ускладнюється можливим їх ушкодженням за температурних та осмотичних змін.

Це було підтверджено П. Мейзуром, який є автором «двухфакторної гіпотези» ушкоджень, що виникають за глибокого охолодження різних біологічних об'єктів (Mazur, 1970; 1990). У разі надшвидкого охолодження клітина не встигає досягти достатнього ступеня зневоднення, в результаті чого зайва вода перетворюється на лід, що призводить механічного ушкодження. З іншого боку, якщо проводити охолодження дуже повільно, то через надмірне зневоднення та тривалій експозиції у висококонцентрованому розчині може розвинути інтоксикація клітини.

Для отримання ембріонів *in vitro* або створення кріобанку яйцеклітин для подальшого використання, ооцити насамперед відбираються від корів-донорів, які мають відповідати визначеним критеріям: за віком, естер'єром, фізичним станом, відтворювальною здатністю та показниками продуктивності.

Ооцити від обраних донорів можна отримати двома шляхами: прижиттєво за трансвагінальної пункції за допомогою ультразвука та помертло з яєчників хірургічним шляхом. Ооцитам обов'язково надається морфологічна характеристика. Вони повинні мати багатошаровий компактний кумулус (не менше 3-х шарів), що щільно прилягає до зони пеллюциду, ооплазма округлої форми, дрібнозерниста й рівномірно заповнює простір під прозорою оболонкою, яка рівномірно за товщиною, опалісцює і немає ніяких порушень.

Для успішного проведення робіт з отримання ембріонів поза організмом необхідно дотримуватися 2-х умов: ооцити мають досягти стадії запліднення, а сперматозоїди пройти процес капацитації.

Екстракорпоральне запліднення ооцитів включає ряд процесів, що забезпечують злиття гамет: контакт і пенетрацію оточуючих ооцитів сперматозоїдами, проникнення через зону пеллюцида, злиття мембран ооцита й сперматозоїда, злиття їх пронуклеїсів.

Існують різні методи запліднення яйцеклітин *in vitro*: поміщення яйцеклітин у середовище зі сперматозоїдами, ін'єкція сперматозоїдів всередину ооцитів мікропіпеткою, проколювання (просвердлювання) прозорої оболонки ооцитів або її механічне часткове розсічення з подальшим перенесенням жіночих гамет у суспензію капацитованих спермій.

Культивування ембріонів *in vitro* у культуральному середовищі є найпростішим і дешевим способом їх розвитку до морули-бластоцисти. В середовищі культивування потрібні біологічно активні компоненти, які вироблюється деякими клітинними системами. Для культивування ембріонів ВРХ застосовують різні середовища: Ham F-40, 199, Тірода й ін., до складу яких мають входити енергетичні компоненти: піруват натрію, лактат натрію й

НУБІП УКРАЇНИ
 глюкоза. Для культивування ембріонів у середовища додають 10-20% фетальної сироватки теляти. Середовища повинні бути збалансованими за концентрацією водневих іонів (рН 7,2-7,4) та осмолярністю (280-285 мОсм/кг). Газова суміш

для культивування ембріонів складається з 5% O₂, 5% CO₂ і 90% N₂. Зародки

НУБІП УКРАЇНИ
 культивують у середовищі за температури 39°C в умовах максимальної вологості.

Для подолання блокування дроблення ембріони пересаджують у яйцепровід проміжного реципієнта. Як проміжних реципієнтів, які забезпечують

розвиток ранніх ембріонів ВРХ in vivo до морули-бластоцисти, використовують

НУБІП УКРАЇНИ
 кролиць.
 Ефективним способом розвитку ембріонів сільськогосподарських тварин

може стати їх культивування в ізольованих яйцепроводах.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП України

РОЗДІЛ 2 НАПРЯМИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали і методи дослідження

НУБІП України

Дослідження за темою магістерської роботи виконували на базі Навчально-наукової лабораторії «Центр репродуктології тварин з банком сперми та ембріонів» кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України, відбір яєчників проводили на забійному пункті ООО «Тутьчинське м'ясо» місто Тутьчин, Вінницької області.

НУБІП України

Експерименти на тваринах проводили з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року), «Загальних етичних принципів експериментів над тваринами», схвалених Національним конгресом з біоетики і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) та «Положення про утримання та використання піддослідних тварин в віварії та клініці НАУ», розглянутого та затвердженого ректором НАУ 20.05.2001 р.

НУБІП України

Дослідження виконували протягом 2020–2021 років.

2.1.1. Матеріали

НУБІП України

В експериментах було використано 42 яєчники. Вилучення обит-кумулясних комплексів здійснювали з яєчників різних фаз розвитку (фазі фолікулярного росту; яєчників з ознаками овуляції; яєчники в лютеальній фазі) (Рис 2.1, Рис.2.2, Рис 2.3). Яєчники у яких відмічали кісти у експерименті не використовували.

НУБІП України

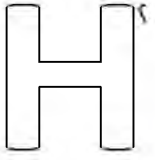
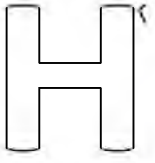


Рис. 2.1. Яечник корови на фазі фолікулярного росту.

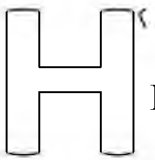
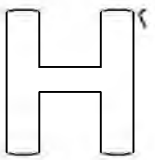
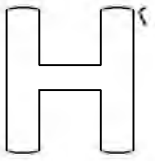


Рис. 2.2. Яечник корови з ознаками овуляції.

Н

Н

Н

Н



Рис. 2.3. Яєчник корови в лютеїновій фазі.

Поживні середовища, інші розчини та реактиви зберігали в побутовому холодильнику Nord (Україна) за температури 4 °С та -18 °С відповідно до настанов виробника. Центрифугування здійснювали на лабораторній центрифугі Elm SCM-6MT (Elm, Латвія). (Рис. 2.4)

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України



Рис. 2.4 Лабораторна центрифуга Elmi CM-6MT

Для підігрівання розчинів використовували лабораторний сухоповітряний термостат TC-200 СПУ (СКТБ СПУ, Росія).

Зважування реагентів здійснювали на аналітичних електронних вагах Radwag AS 220/K (Radwag, Польща). (Рис. 2.5)



Рис. 2.5 Аналітичні електронні ваги Radwag AS 220/X

Для стерилізації розчинів використовували шприцеві нітроцелюлозні фільтри (Millipore, США) з порами $d=0,22$ мкм. Пошук яйцеклітин здійснювали за допомогою стереомікроскопу при збільшенні 12-24 рази, оцінку ОКК та ооцитів здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопу Axiovert40 (Carl Zeiss, Німеччина). (Рис. 2.6)



Рис. 2.6 Інвертований мікроскоп Axiovert40

Фотографування здійснювали фотокамерою Canon DS126291 (Canon, Тайвань). Обладнання, що було використане у процесі досліджень, застосовували згідно інструкцій з їх експлуатації. Всі вимірні прилади проходили перевірку протягом 2020–2021 рр.

2.1.2. Методи

Маніпуляції з клітинним матеріалом виконували у ламінарному боксі біологічної безпеки II класу Esco SC2-4A1 (тип A2) (ESCO, Німеччина). Культивування клітин здійснювали в CO₂-інкубаторі CCL-170-B-9-P Esco серії CelCulture (ESCO, Німеччина), що забезпечував сталі умови культивування: t=38,5 °C, абсолютну вологість повітря та вміст у газовій суміші 5 % CO₂.

Експериментальна робота включала наступні етапи:

1. Дослідження життєздатності ооцитів корів після їх вітрифікації з використанням середовищ різних виробників (Kitazato, Cryotech, Irvine Scientific). Схема 2.1.

2. Дослідження впливу еквалібрації ооцитів на їх життєздатність після розморожування. Схема 2.2.

Схема досліду 2.1

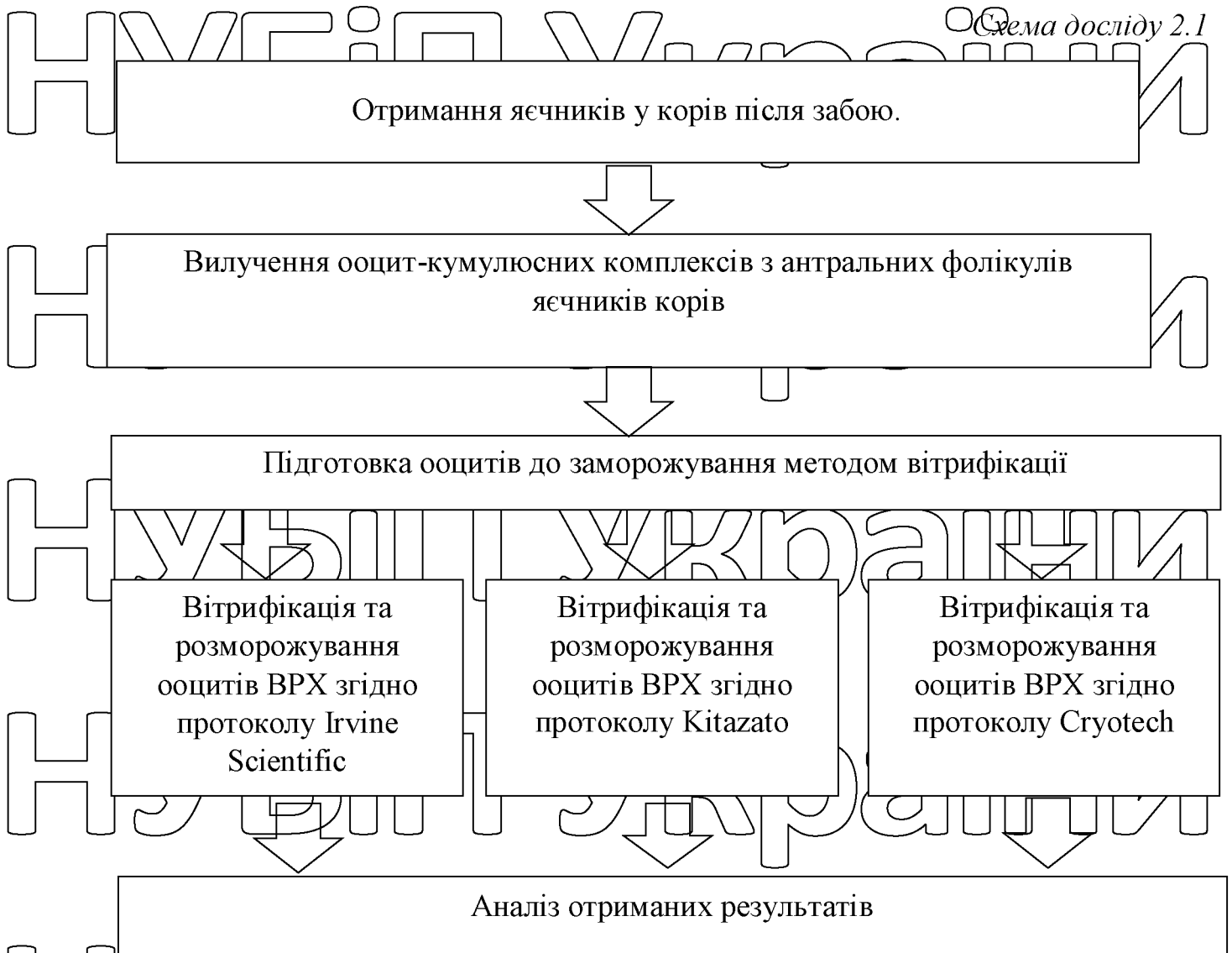
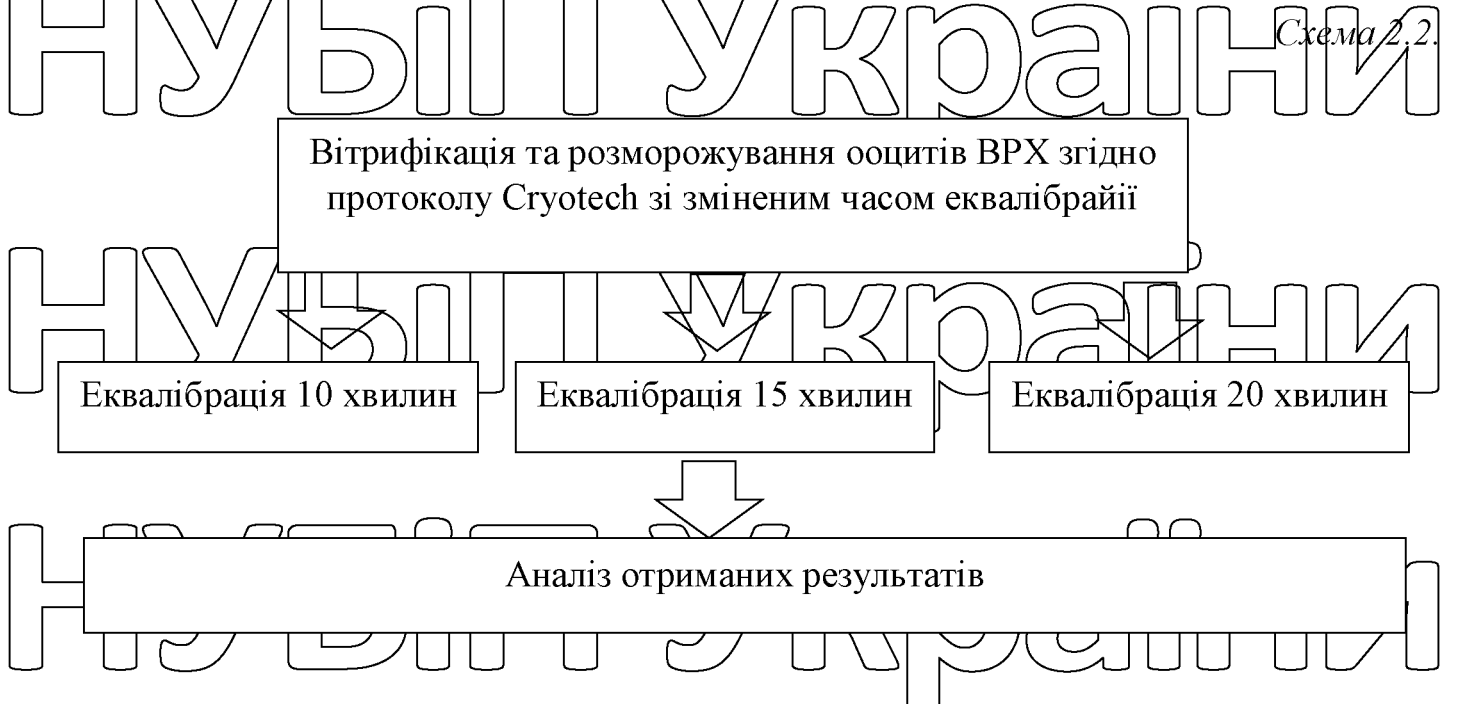


Схема 2.2.



РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

НУБІП України

Проблема збереження спадкового матеріалу цінних порід свійських тварин

не не вирішена. На ринку пропонуються різні методи кріоконсервації (вітрифікації) біологічного матеріалу (гамет та тканин), але в більшості випадків після розморожування реєструють значне зниження життєздатності та функціональної активності клітин. Залишається актуальним питання про ефективність кріопротекторів та їх вплив на збереження ДНК, клітинних мембран, органел під час заморожування та тривалого зберігання при ультранизьких температурах.

НУБІП України

Стандартним методом заморожування ооцитів для людини і тварин є

повільне заморожування з використанням середовища з додаванням компонентів

тваринного походження (сироватка ВРХ, альбумін) та різних кріопротекторів: пропандіолу (ПД), диметилсульфоксиду (ДМСО), етиленгліколю (ЕГ), пропіленгліколю (ПГ) поєднаннях та концентраціях. Кріопротектори ПД,

ДМСО, ЕГ та ПГ здатні проникати через мембрани ооцитів та клітин строми, вони забезпечують захист клітинних структур як усередині, так і навколо клітин.

Ці проникні кріопротектори часто використовують у комбінації з непроникними, такими як сахароза, глюкоза, гліцерин або сироватковий альбумін. Повільна

заморозка призводить до утворення кристалів льоду та пошкодження структури ооциту та знижує його життєздатність. Вважається, що якщо значно збільшити швидкість заморозки, і, отже, зменшити час контакту біоматеріалу з кріопротекторами, щоб уникнути токсичного ефекту, можна домогтися більшої

виживання розморожених (ревіталізованих) клітин і тканин.

НУБІП України

Існує всього кілька зарубіжних фірм, які представляють свою продукцію

для заморожування шляхом вітрифікації. Першими у створенні методу вітрифікації ооцитів були японські вчені. Ґрунтуючись на високоефективному методі вітрифікації яйцеклітин, першим був створений набір реагентів Cryotop

НУБІП України

(KITAIZATO, Японія), однак у його складі є білки тваринного походження та антибіотики. Японська фірма CryoTech Lab також випускає подібний набір для вітрифікації ооцитів та ембріонів. Однак він містить лише один кріопротектор і полісахарид, а також антибіотик та альбумін. Бельгійська компанія FertiPro N.V. випускає набір VitriFreeze/ThawES, містить людський альбумін, хоча не містить антибіотиків. Набір реагентів Irvine Scientific також є високоефективним для заморожування ооцитів та ембріонів. В той же час усі ці набори розроблені для заморожування методом вітрифікації ооцитів та ембріонів людини, а не для вітрифікації яйцеклітин та ембріонів ВРХ.

Тому нашим завданням було дослідити можливість використання вище згаданих наборів для заморожування ооцитів ВРХ.

3.1. Отримання ооцит-кумулясних комплексів з яєчників після забою тварин

Відбір яєчників проводили на забійному пункті ООО «Тулчинське м'ясо» місто Тульчин, Вінницької області та доставляли у лабораторію в термосі при температурі 30–33°C протягом 3–4 годин. В лабораторії яєчники промивали 4 рази в теплом (37–38°C) стерильному фосфатно-сольовому розчині Дюльбекко з 0,075 мг/мл канаміцин сульфату. Видалення ооцит-кумулясних комплексів з антральних фолікулів яєчників корів проводили в стерильних умовах шляхом розсічення фолікулів лезом безпечної бритви в середовищі 199 з Hepes.

Перед постановкою досліду проводили оцінку ооцит-кумулясних комплексів. Для подальших досліджень відбирали лише ооцит-кумулясні комплекси 120–130 мкм, з суцільним щільним кумулюсом, неушкодженою прозорою оболонкою та гомогенною невакуолізованою ооплазмою правильної округлої форми, без видимих морфологічних ознак атрезії (Рис. 3.1).

Отримані ОКК тричі відмивали в середовищі 199, із вмістом 25 мМ буфера Hepes, 10% ембріональної сироватки.

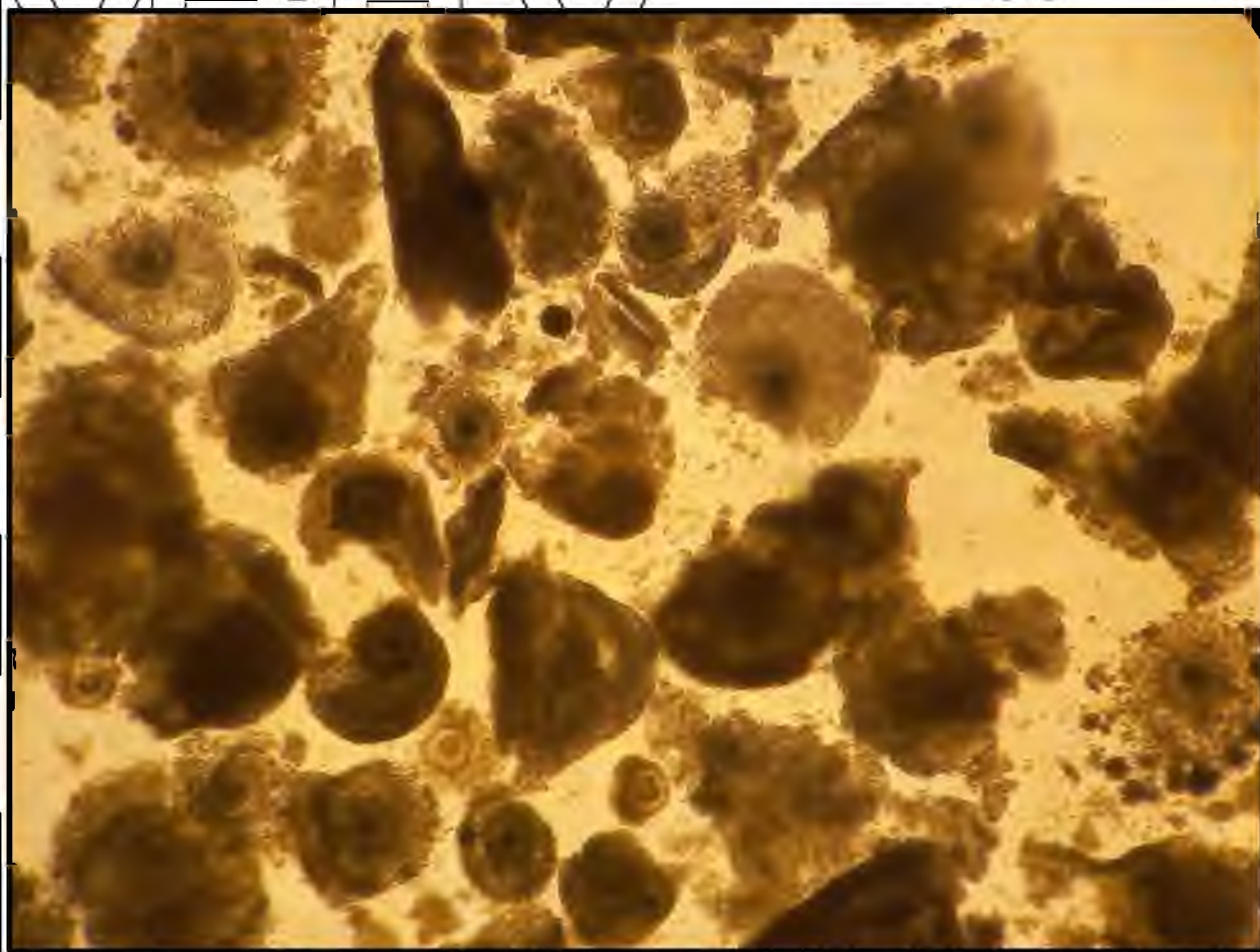


Рис. 3.1. Ооцит-кумулосні комплекси корови. Нативний препарат. 3б x100.

3.2. Позбавлення ооцитів клітин кумулюсу

Для позбавлення ооцитів клітин кумулюсу, останніх за допомогою пастерівської піпетки переносили до чашки Петрі з розчином гіалуронідази (Рис. 3.2).

Розчин ферменту попередньо підігрівали до температури 37°C. За допомогою стерильної Пастерівської піпетки робили краплі з ферменту об'ємом 0.2-0.3 см³ на Чашці петрі. В які розмішували ооцит-кумулосні комплекси по 20-30 шт у краплю. Ооцит-кумулосні комплекси витримували у розчині ферменту 40-60 секунд. Усі маніпуляції проводили на нагрівальному столику за температури 37°C.



Рис. 3.2. Розчин Гіалуронідази.

Після чого за допомогою денудуючої піпетки із внутрішнім діаметром 140 мікрометрів здійснювали механічну очистку боцитів від клітин кумулюсу (Рис.

3.3.)

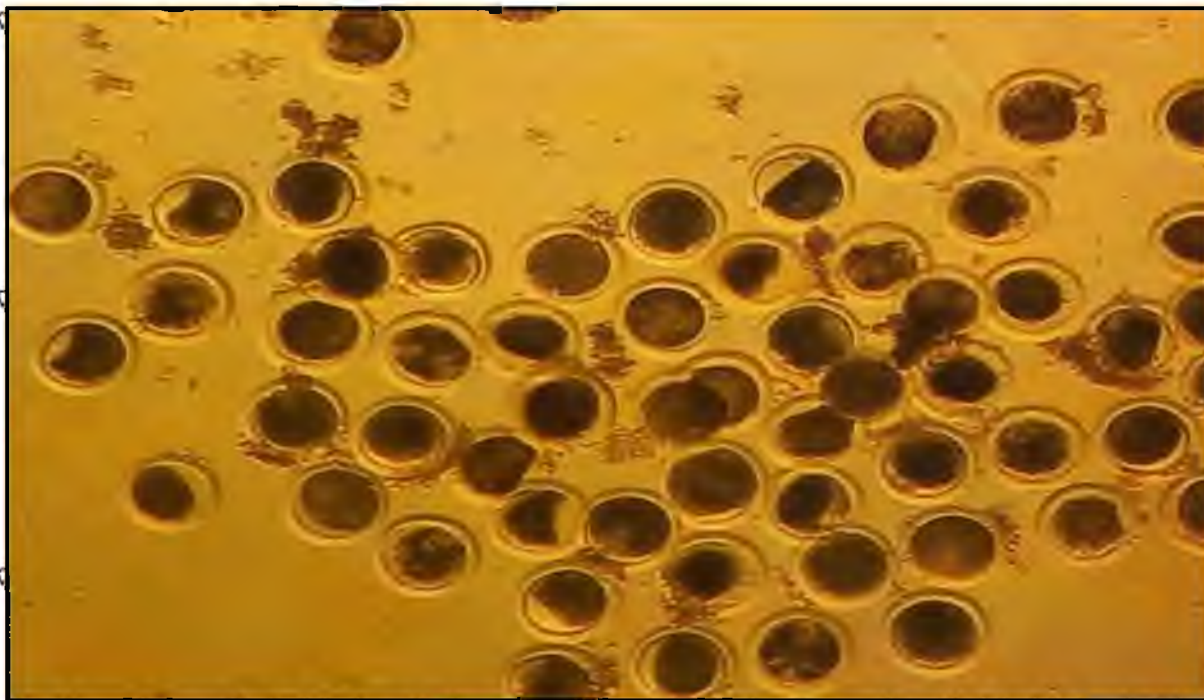


Рис. 3.3. Ооцити ВРХ. Нативний препарат. Зб. $\times 200$.

3.3. Заморожування ооцитів методом вітрифікації.

Послідовність заморожування ооцитів методом вітрифікації.

1. Усі маніпуляції виконувались при кімнатній температурі (25–27 °С).
2. Заповнювали контейнер (термос) рідким азотом.
3. Для ооцитів використовували денудуючу піпетку з капіляром діаметром 140–170 мкм.
4. У першу лунку планшета (Рис.3.4) вносили 300 мкл середовища для еквалібрації (ЕС), другу та третю лунки заповнюють 300 мкл середовищем для вітрифікації (ВС).
5. За допомогою піпетки розміщували ооцити на поверхню середовища для еквалібрації. Еквалібрацію проводили протягом 15 хвилин
6. Після еквалібрації аспірували ооцити з невеликою кількістю середовища для еквалібрації, та розміщували у другу лунку (середовище для вітрифікації), опускаючи ооцити на середину глибини середовища.

7. Промивали піпетку від середовища.

8. Ооцит спливає у даному середовищі, тому 5–6 разів аспірують його піпеткою та випускають на дно лунки.

9. Коли яйцеклітина перестане повністю спливати, її переміщували у третю лунку на середину глибини вітрифікаційного розчину.

10. Промивали піпетку свіжим розчином для вітрифікації, та переміщують розчин навколо ооцита, очікуючи повного осадження ооцита на дно лунки.

11. Проводять аспірацію ооцита з розчином для вітрифікації на кінчику піпетки та поміщають біля чорної мітки на крижолі в мінімальному об'ємі рідини (менше 0,1 мкл). У випадку більше 2 ооцитів формують окрему краплину для кожного.

12. Видаляють надлишок розчину для вітрифікації. Поміщали кінчик піпетки в нижню частину великої краплини розчину для вітрифікації. Пересували піпетку в горизонтальному напрямку, цим самим розтягнувши краплю та проводили аспірацію надлишку рідини максимально зменшуючи краплю.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ



Рис 3.4. Платшет та кріотоги для вітрифікації

Для заморожування ооцитів корів методом вітрифікації ми використовували комерційні набори для вітрифікації ооцитів та ембріонів людини. А саме Kitazato, Cryotech, Irvine Scientific (Рис. 3.5). Маніпуляції здійснювали згідно настанови виробника.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України



Рис. 3.5. Вітрифікаційні середовища.

НУБІП України

3.4. Аналіз ефективності вітрифікації ооцитів за використання різних вітрифікаційних середовищ

В першій серії дослідів нами було досліджено ефективність використання різних вітрифікаційних середовищ для заморожування ооцитів ВРХ. Критерієм ефективності був вихід життєздатних ооцитів після їх розморожування Рис. 3.6.



Рис.3/6. Ооцити ВРХ після розморожування. А – життєздатні, Б- дегенеровані. Нативний препарат. 35.x 300.

Результати дослідження представлені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Аналіз ефективності вітрифікації ооцитів за використання різних вітрифікаційних середовищ, $M \pm m$, $n=10$.

№п	Протокол вітрифікації	Всього ооцитів, шт.	Життєздатні ооцити, %.	Дегенеровані ооцити, %.
1	Kitazato	100	83,5±2.9	16,5±1.8
2	Cryotech	100	91,7±3,3**	8,4±2,2
3	Irvine scientific	100	64,3±6,2**	35,2±3,1

Примітка: ** – $P < 0,01$; порівняно з контролем. Контролем слугував протокол вітрифікації Kitazato.

Як видно із результатів дослідження представлених у таблиці 3.1. найбільш ефективним для заморожування ооцитів корів виявилось середовище Cryotech. За використання середовищ даного виробника нами було отримано **91,7 %** життєздатних ооцитів після розморожування. При заморожуванні ооцитів з

використанням середовищ Kitazato, життєздатність становила 83,5%. Достовірно найнижчий показник життєздатних ооцитів нами було отримано за використання середовищ Irvine scientific, а саме цей показник становив 64,3%.

Таким чином, можна зробити висновок, що для вітрифікації ооцитів ВРХ можна використовувати середовища та протоколи заморожування для ооцитів та ембріонів людини. При цьому ефективність кріоконсервування суттєво відрізняється залежно від вітрифікаційних середовищ.

3.5. Аналіз ефективності вітрифікації ооцитів за різної еквалібрації

В другій серії досліді нами було проведено дослідження щодо вивчення впливу еквалібрації ооцитів на їх життєздатність після розморожування.

При цьому ми використовували середовище Cryotech, яке виявилось найоптимальнішим серед досліджуваних нами, для заморожування ооцитів ВРХ. Нами було порівняно 3 варіанти еквалібрації ооцитів 10 хвилин (стандартна, згідно протоколу виробника), 15 хвилин та 20 хвилин.

Результати дослідження представлені у таблиці 3.2.

Аналіз ефективності вітрифікації ооцитів за різної еквалібрації,

$M \pm m, n=5$.

Пп	Протокол вітрифікації Cryotech		
	Всього ооцитів, шт	Життєздатні ооцити, %	Дегенеровані ооцити, %
Еквалібрація 10 хвилин	50	91,7±3,3	8,4±2,2
Еквалібрація 15 хвилин	50	94,2±2,2	5,6±1,3
Еквалібрація 20 хвилин	50	78,7±3,5**	21,4±1,6

Примітка. *** – $P < 0,001$; ** порівняно з контролем. Контролем слугувала еквалібрація 10 хв.

Як видно із результатів, представлених у таблиці 3.2, тривалість еквалібрації відіграє суттєву роль при вітрифікації ооцитів ВРХ. Так, за еквалібрації 15 хвилин, нами було отримано **94,2%** життєздатних ооцитів. Цей показник на 3% вищий порівняно із стандартною еквалібрацією (10 хвилин). В той же час, при збільшенні еквалібрації до 20 хвилин, нами відбічалося достовірне зниження життєздатності ооцитів (78,7%).

Таким чином, тривалість еквалібрації за кріоконсервування істотно впливає на життєздатність ооцитів після їх розморожування. Найоптимальнішою виявилась еквалібрація тривалістю 15 хвилин.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗІ УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ, ЇХ ЕКОЛОГІЧНЕ ТА ЕКОНОМІЧНЕ ОБґРУНТУВАННЯ

Незважаючи на те, що вже отримано потомство з деконсервованих і дозрілих *in vitro* ооцитів заморожених надшвидким методом, ефективність цих технологій залишається низькою. Більшість використовуваних для заморожування ооцитів кріопротектори є осмотично активними речовинами і при високих концентраціях істотно змінюють клітинний об'єм. Вітрифікація значно спрощує процедуру заморожування, оскільки не потребує контролю швидкості охолодження та наявності спеціальних дорогих спеціальних приладів – програмних заморожувачів. До того ж вітрифікація значно спрощує процес заморожування, при ній немає позаклітинної кристалізації – однієї з головних причин клітинних ушкоджень.

Вітрифікація – перехід рідини при пониженні температури в скловидний стан. Вітрифікація має відношення до фізичного процесу, при якому розчин кріопротекторних речовин при зниженні температури твердне без утворення кристалів. У твердому стані зберігається нормальний розподіл молекул і іонів, таке ж, як в рідкому стані, і він може розглядатися як вкрай в'язкий твердий склоподібний стан.

Хімічні речовини, які використовуються при заморожування біологічних об'єктів називаються кріопротекторами. Кріопротектори – речовини, що захищають живі об'єкти від шкідливої дії заморожування. Їх можна розділити на дві групи: проникаючі та непроникаючі кріопротектори; обидва види використовуються для методу повільного заморожування і методу вітрифікації.

До групи проникаючих кріопротекторів відносяться такі речовини: диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин, етиленгліколь (ЕГ); метанол; пропіленгліколь (ПГ).

У 1954 році Лавлок довів, що всі ці кріопротектори здатні проникати через мембрани ооцитів і ембріонів, вони забезпечують захист як всередині, так і зовні клітин.

До непроникаючих кріопротекторів відносяться: моносахариди (галактоза); дисахариди (сахароза і трегалоза); полісахариди (декстрини і гідроксіетильований крохмаль); полімери (поліетиленгліколь).

Відомо, що непроникаючі кріопротектори захищають клітини за допомогою дегідратації, стабілізації ліпідних біошарів і білків, або за рахунок зміни властивостей води в клітинах.

В даний час існує дві основні методики кріоконсервації - техніка повільного охолодження і техніка вітрифікації. Метод повільного охолодження (також званий методом повільного заморожування), який використовується

Whittingham та ін. в 1972 р. і Porcu et al. в 1997 р. згадана вище передбачає

поступове зневоднення клітини [45]. Замочуючи зразки в розчинах, що містять кріопротектори, і повільно охолоджуючи приблизно до $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. техніка повільного охолодження дозволяє кристалам льоду рости поза клітинами, оскільки

кріопротектори замінюють внутрішньоклітинну воду перед швидким занурюванням у рідкий азот, зменшуючи тим самим кількість утворення внутрішньоклітинного льоду і, таким чином, рівень травмування, яку зазнають кріоконсервовані клітини [45].

Оскільки використання методу повільного охолодження в кріоконсервації ооцитів і ембріонів дає прийнятні, але менші за бажані результати, це сприяло

появі іншої техніки під назвою вітрифікація. На відміну від техніки повільного охолодження, метод кріоконсервації вітрифікація відбувається швидко, при якому зразки обробляються кріопротекторами з набагато вищими концентраціями при

кімнатній температурі після чого негайно поміщаються у рідкий азот,

охолодження при цьому відбувається зі швидкістю більше $100^{\circ}\text{C}/\text{хв}$., що призводить до утворення «скловидного тіла» - шару, некристалічної аморфної твердої речовини, як всередині, так і поза клітиною [46]. За вітрифікації

внутрішньоклітинний молекулярний та іонний розподіл залишаються такими ж, як і в початковому рідкому стані, але в дуже в'язкому переохолодженому стані рідкої фази [47]. Теоретичне порівняння цих двох основних методів кріоконсервації може бути таким:

повільне заморожування призводить до утворення позаклітинних кристалів льоду, тоді як вітрифікація обходить як внутрішньоклітинне, так і позаклітинне утворення льоду, що вказує на переваги методу вітрифікації над повільним заморожуванням [48].

На сьогоднішній день численні дослідження підтвердили перевагу методу вітрифікації над методом повільного заморожування як при кріоконсервації ембріонів, так і в кріоконсервації ооцитів у різних видів тварин і навіть людини. Встановлено, що при кріоконсервації яйцеклітин і ембріонів великої рогатої худоби методом вітрифікації на клітинному рівні відмічаються вищі темпи розвитку, а також на молекулярному рівні, включаючи відносну кількість транскриптів генів, показав, що метод вітрифікації може бути більш придатним, ніж метод повільного охолодження для заморожування ембріонів великої рогатої худоби [49]; порівняння з точки зору морфології, конфігурації мейотичного веретена та цілісності ДНК між вітрифікованими та повільно замороженими ооцитами великої рогатої худоби також можна вважати, що вітрифікація є більш перспективною [50].

Постійне вдосконалення методів вітрифікації призвело до значної кількості систем для подальшого покращення результатів вітрифікації та адаптувати галузь для конкретних видів і цілей. За традиційного методу вітрифікації In-solom system (Minitube), було досягнуто швидкості охолодження та швидкості нагрівання $2550\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ і $2438\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ відповідно [4]. Система відкритих соломинок введена у промисловість у 1998 році як практичний метод, спеціально розроблений для ембріонів великої рогатої худоби та вітрифікації яйцеклітин, досягнувши швидкості охолодження та нагрівання понад $20\ 000\text{ }^{\circ}\text{C}$ на хвилину.

Час впливу криопротекторів менше 30 секунд, що ефективно запобігає охолодженню та запобігає токсичній дії криопротекторів [4].

Пізніше з'явилась система криотоп і була комерційно вироблена на Kitazato Co., Фудзіномія, Японія, використовуючи плівку та пластиковий тримач, щоб досягти набагато більшого успіху вітрифікація ооцитів і ембріонів людини, ніж будь-яка інша система того часу [30]. При охолодженні до 23 000 °C/хв і нагрівання до 42 000 °C/хв за допомогою краплі об'ємом менше 0,1 мкл, криотоп система та інші методи обробки поверхні, включаючи мінімальний розмір крапель техника та CryoLoop (Hampton Research, Алісо В'єхо, Каліфорнія) дає змогу ефективно обійти стадію кристалізації води за запобігти токсичному впливу криопротекторів навіть більше, ніж у системи In-solom system [50].

Кріоушкодження, пошкодження, викликані кріоконсервацією або під час її проведення, можна визначити у загальному вигляді як низка подій через порушення функцій клітин після кріоконсервації, а саме цикл заморожування [38].

Один очевидний і домінуючий ефект кріоконсервації ооцитів і ембріонів, який може призвести до серйозних кріоушкоджень відноситься замерзання води як всередині, так і поза клітинами. Під час зниження температури до утворення льоду (або його іноді називають діапазоном кристалізації) – між рівноважна температура замерзання і температура склування його внутрішнього розчинника. льоду кристали зароджуються і ростуть, вони можуть пробити або розірвати клітини і руйнувати клітинні структури просто механічною дією [52].

Крім механічних пошкоджень, замерзання води також спричиняє зміну дію складу розчину. Утворення кристалів льоду різко змінює склад рідкої фази концентруючи розчинені в ньому розчинені речовини та осаджуючи розчинені речовини, які перенасичені, в результаті осмотичної дегідратації клітин [50]. Такі зміни складу і агрегація біомолекул відбуваються як всередині клітини, так і за її межами, але зазвичай різною мірою через невідповідність між внутрішньоклітинним і позаклітинним середовищем, при цьому гомеостаз

НУВБІП УКРАЇНИ

досягається шляхом постійного обміну води та інших молекул, що транспортуються через клітинні мембрани. В результаті як осмотичного, так і теплового стресу, також може бути пов'язане стискання та розширення клітин під час циклу заморожування-відтавання. Що призводить до втрати цілісності клітинної структури, та до незворотного проколу клітинних мембран і порушення вразливого цитоскелета, включаючи мейотичне веретено [51].

НУВБІП УКРАЇНИ

Щоб запобігти руйнуванню клітин та їх структур, при кріоконсервуванню, застосовуються кріопротекторні засоби, або кріопротектори. Перший кріопротектор був відкритий в 1940-х роках, коли було встановлено, що додавання глицерину до суспензії клітин значно знижує рівень кріоушкодження та покращує виживання[42]. Пізніше було встановлено, що такі сполуки, як: диметилсульфоксид (ДМСО), етиленгліколь (ЕГ), пропіленгліколь, поліетиленгліколь, сахароза та пролін мають подібні властивості і тому і нині часто використовуються як кріопротектори [53]. Ці властивості прості кріопротектори повинні володіти здатністю до транспортування через клітинну мембрану шляхом проникнення, і вони повинні мати можливість збільшити загальну концентрацію всіх розчинених речовин з дуже обмеженою токсичністю [52]. Висока концентрація кріопротекторів дозволяє зменшити утворення внутрішньоклітинного льоду при будь-якій температурі, що особливо важливо при вітрифікації.

НУВБІП УКРАЇНИ

Однак із збільшенням їх концентрації токсичність кріопротекторів стає неприйнятною. Фактично, токсичність кріопротекторів була названа однією з основних причин пошкодження, пов'язаного з кріоконсервацією [54]. Хоча це може бути корисно для підтримки стабільності мембран і внутрішньоклітинних органел, вплив надзвичайно в'язких кріопротекторів протягом тривалого часу на клітину може спричинити осмотичну травму, що подібно до шкідливого осмотичного стресу, від якого страждають кріоконсервовані клітини та ембріони

під час утворення кристалів льоду, що саме те, чого прагне уникнути використання кріопротекторів [53].

Потенційна шкода від кріопротекторів може бути спричинена молекулярною та фармакологічною токсичністю самих кріопротекторів.

Незважаючи на різноманітність кріопротекторів, починаючи від спиртів і цукрів до амінів, усі вони мають одну спільну рису – вони повинні мати можливість проникати в клітини і багато внутрішньоклітинних компартментів. Таке

проникнення робить можливим для окремих кріопротекторів залишатися

всередині клітин та їх органелах навіть після відтавання, оголюючи вразливі

клітинні структури до кріопротектору на більш тривалий час. Чи викличе цей довготривалий вплив необоротне пошкодження клітин тоді залежить від

концентрації, часу впливу, типу клітин які кріоконсервуються, а також хімічних

та фізичних властивостей самих кріопротекторів [54].

Морфологічні ознаки можуть бути одним із прямих показників тяжкого кріоушкодження. Осмотичний стрес і утворення льоду під час охолодження та відтавання можуть спричинити серйозні руйнування мембрани клітини та зони

pellucida, тоді як розрив зони pellucida шкідливий для виживання і розвитку будь-

якого раннього ембріона [38]. Такий розрив можна легко визначити під

мікроскопом.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВО

НУБІП УКРАЇНИ

1. Встановлено, що комерційні середовища для вітрифікації Kitazato, Cryotech, Irvine Scientific, з різною ефективністю, можуть бути використані для кріоконсервування ооцитів великої рогатої худоби.

2. Встановлено, що використання середовища Cryotech забезпечує 91,7 % життєздатних ооцитів великої рогатої худоби після розморожування.

3. Оптимальним часом еквалібрації ооцитів великої рогатої худоби за використання середовищ для вітрифікації Cryotech є 15 хвилин, дані умови забезпечують 94,2% життєздатних ооцитів.

НУБІП УКРАЇНИ

З метою підвищення ефективності отримання ембріонів великої рогатої худоби поза організмом необхідно використовувати для кріоконсервування ооцитів вітрифікаційні середовища **Cryotech**.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Амстиславский С. Я., Абрамова Т. О., Брусенцев Е. Ю., Кизилова Е. А. Криоконсервация и сохранение биоразнообразия. Природа. 2014. № 5. С. 24-33.
2. Башенко М. І., Гладій М. В., Мельник Ю. Ф. та ін. Стан і перспективи розвитку молочного скотарства України. Розведення і генетика тварин. Київ, 2017. Вип. 54. С. 6–14.
3. Безуглий М. Д. Розвиток біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин / М. Д. Безуглий, О. Є. Гузеватий // Вісник аграрної науки. 2006. № 12. С. 83-87.
4. Гладій М. В., Полупан Ю. П., Костенко О. І., Ковтун С. І., Кузєбний С. В., Копилов К. В., Вишневський Л. В., Щербак О. В., Резникова Н. Л. Науково-практичні аспекти селекції і збереження генофонду молочної худоби. Вісник аграрної науки. №11 (788), 2018. С. 71-79.
5. Голубец Л. В. Инновационные технологии в разведении и селекции племенного скота. монография / Л. В. Голубец и др. Гродно : ГГАУ, 2019. 430 с.
6. Гузеватий О. Є. Методики оцінки якості ооцит-кумулясних комплексів корів для криоконсервування / О.Є. Гузеватий, П.А. Троцький, Ю.М. Собко. Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві. К. : Аграрна наука, 2005. С. 180–187.
7. Зюзюн А. Б., Дзіцюк В. В., Троцький П. А. Методичні рекомендації з отримання ооцитів та формування ембріонів кролів в умовах *in vitro* / А. Б. Зюзюн, В. В. Дзіцюк, П. А. Троцький. Чубинське, 2018. 20 с.
8. Зюзюн А. Б. Цитоморфологічні особливості ооцит-кумулясних комплексів та ембріонів сільськогосподарських тварин за умов культивування *in vitro* : дис. ... канд. біол. наук : 03.00.20 / А. Б. Зюзюн; НАН України, Ін-т клітин. біології та генет. інженерії. Чубинське [Київ. обл.], 2016. 176 с.
9. Ковтун С. І., Зюзюн А. Б., Щербак О. В. и др. Получение *in vitro* и криоконсервация эмбрионов крупного рогатого скота определенного пола.

Collection of works scientific symposium with international participation dedicated to 60th anniversary of the founding of the Institute «Zootechnical science – an important factor for the European type of agriculture» (Scientific and practical institute of biotechnologies in animal husbandry and veterinary medicine). Maximovca, Moldova, 2016. P. 485–489.

10. Ковтун С. І., Зюзюн А. Б., Щербак О. В., Троцький П. А. Використання нанобіотехнологічних методів для оптимізації технології культивування ооцитів корів поза організмом. Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. 2018. Т 22. С. 257-261. Doi: 10.7124/FEEO.v22.958.

11. Ковтун С. І. Методичні рекомендації з кріоконсервації сперматозоїдів та ооцитів сільськогосподарських тварин і формування ембріонів *in vitro* – брошура / С. І. Ковтун; НААН України, Ін-т розведення і генетики тварин ім. М.В. Зубця, НАН України, Ін-т хімії поверхні ім. О.О. Чуйка. Чубинське [Київ. обл.], 2016. 20 с.

12. Корниенко Е. В. Витрификация эмбрионов крупного рогатого скота без блестящей оболочки в триацетат целлюлозном полом волокне / Е.В. Корниенко [и др.] Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2017. № 12. С. 35-44.

13. Кузьмина Т. И. Созревание яйцеклетки млекопитающих – базовый метод клеточных репродуктивных технологий: мат. 6 Международной конференции «Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных» / Т.И. Кузьмина. М., 2006. С. 108-114.

14. Методы оценки функционального состояния донорских ооцитов, соматических клеток фолликулов и эмбрионов сельскохозяйственных животных: Методические рекомендации / Т.И. Кузьмина [и др.] М., 2005. 32 с.

15. Остаповець Л. І., Троцький П. А. Використання генетико-біотехнологічних методів оцінки функціонального стану ооцитів корів і свиней *in vitro* / Л. І. Остаповець, П. А. Троцький. Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. 2010. Т. 9. С. 187-191.

16. Руденко Є. В. Роль і перспективи сучасних методів біотехнології в умовах інтенсифікації тваринництва / Є.В. Руденко, О.Є. Гузеватий. Науково-технічний бюлетень. Харків, 2008. №96. С. 44-49.

17. Саліна А. С. Вплив різних швидкостей заморожування на збереженість ооцитів корови / А. С. Саліна, П. А. Троцький, О. Е. Гузеватий, Л. В. Горбунов, К. Г. Лісіна, М. Д. Безуглий. Біологія тварин. 2007. 9. № 12. С. 251-256.

18. Сусол Р. Л. Конспект лекцій з дисципліни «Управління селекційними процесами у тваринництві» для підготовки здобувачів III рівня вищої освіти (доктор філософії) II курсу III семестр. Одеса, 2019. С. 329-338.

19. Щербак О. В. Генетичний аналіз раннього ембріогенезу великої рогатої худоби і свиней in vitro : автореф. дис... канд. с.-г. наук. 03.00.15. Щербак Оксана Василівна; УААН, Ін-т розведення і генетики тварин. с. Чубинське Київської області, 2009. 19 с.

20. Щербак О. В., Троцький П. А., Зюсюн А. Б. Біотехнологічні методи одержання і зберігання гамет сільськогосподарських тварин. Фактори експериментальної еволюції організмів: 36. наук. пр. 2008. Т. 5. С. 382-385.

21. Яблонський В. А., Хомин С. П., Калиновський Г. М., Харута Г. Г., Харенко М. І. Завірюха В. І., Любецький В. Й. Ветеринарне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології. / За редакцією В. А. Яблонського та С. П. Хомина. Підручник. Вінниця: Нова Книга, 2006. С. 199-231

22. Яблонський В. А. Біотехнологія відтворення тварин: Підручник. К. : Арістей, 2005. 296 с.

23. Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos / A. Arav. Theriogenology. 2014. Vol 81. Pt. P. 96-102.

24. Bazer F.W., Spenser T.E. Reproductive biology in the era of genomics biology //Theriogenology. 2005. V.64. I.3. P. 442-456.

25. Betteridge K. J. Farm animal embryo technologies: achievements and perspectives. Theriogenology. 2006. V. 65. P. 905-913.

26. Bovine oocyte in vitro maturation and cryopreservation: mirage or reality / K. Papis, E. Stachowiak, A. Duda, etc. *Slovak J. Anim. Sci.* 2015. P. 163.

27. Bovine oocyte membrane permeability and cryosurvival: Effects of different cryoprotectants and calcium in the vitrification media. C. C. Marques, C. Santos-Silva, C. Rodrigues, etc. *Cryobiology*. 2018. No. 81. P. 4-11.

28. Celestino J. J. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. / J. J. Celestino, R. R. Dos Santos, C. A. Lopes, F. S. Martins, M. H. Matos, M. A. Melo, S. N. Bao, A. P. Rodrigues, J. R. Silva & J. R. De Figueiredo. *Anim Reprod Sci*, 2008. Vol. 108. P. 309-318, 1873-2232.

29. Galli C., Lazzari G. The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reprod. Domest. Anim.* 2008. V. 43. Suppl. 2. P. 1-7.

30. Gook DA. History of oocyte cryopreservation. Symposium: oocyte cryopreservation review. Vol. 23, issue 3, 2011. P. 281-289.

DOI: 10.1016/j.rbmo.2010.10.018.

31. Hansen P. J., Block J. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. *Ibid* 2004. V. 16. P. 1-14.

32. Implications of storage and handling conditions on glass transition and potential devitrification of oocytes and embryos / M. Sansinena, M.V. Santos, G. Taminelli, N. Zaritky // *Theriogenology*. 2014. Vol. 82. 13. P. 373-378.

33. Jin B., Kawai Y., Hara T., Takeda S., Seki S., Nakata Y., Matsukawa K., Koshimoto C., Kasai M., Edashige K. Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. *Biology of Reproduction*. 2011, V. 85, No. 4, P. 834-847.

34. Kuzmina T. I. Innovative embryotechnology in the reproduction of animals from basic researches to practice. / T. I. Kuzmina, X. Torner, H. Alm. *J. Advances in science and technology agro industrial complex*. 2010. V. 4. P. 66-68.

35. Loutradi K. E., Kolibianakis E. M., Venetis C. A. et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* 2008. V. 90. P. 186-193.

36. Luster, S. M. A Thesis Cryopreservation of bovine and caprine oocytes by vitrification / S.M. Luster. 2004. 83 p.

37. Maher B. Little consensus on egg freezing. *Nature*. 2007. V. 449. P. 958.

38. Moussa M., Shu J., Zhang X., Zeng F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Sci. China Life Sci.* 2014. Vol. 57, No. 9. P. 903-914.

39. Prentice-Biersch J. R. Vitrification of immature bovine cumulus-oocyte complexes: effects of cryoprotectants, the vitrification procedure and warming time on cleavage and embryo development / J. R. Prentice-Biersch, J. Singh, R. J. Mapletoft, M. Anzar / *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012. V. 10. P. 1486-1477.

40. Ri-Cheng Chian, Yao Wang, and Yi-Ran Li, Oocyte Vitrification: Advances, Progress and Future Goals. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 31, 2014. P. 411-420. DOI: 10.1007/s10815-014-0180-9.

41. Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A.K. Tarkowski. *Cytogenetics*. 1966. Vol. 5, №3. P. 394-400.

42. The Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril*. Vol. 99, issue 1. 2013. P. 37-43. DOI:10.1016/j.fertnstert.2012.09.028.

43. Vajta G., Nagy Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod. Biomed. Online*. 2006. V. 12. P. 779-796.

44. Zhou X. L. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. / X. L. Zhou, Al. A. Naib, D. W. Sun, P. Lonergan. *Cryobiology*. 2010. Vol. 61. P. 66-72.

45. Woods, E.J., et al., Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 2004. 48(2): p. 146-156.

46. Argyte, C.E., J.C. Harper, and M.C. Davies, Oocyte cryopreservation: where are we now? *Human reproduction update*, 2016. 22(4): p. 440-449.

47. Rall, W., Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 1987. 24(5): p. 387-402.

48. Mandawala, A., et al., Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*, 2016. 86(7): p. 1637-1644.

49. Stinshoff, H., et al., Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, 2014. 76(8): p. 1433-1441.

50. Martinez-Burgos, M., et al., Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertility and sterility*, 2011. 95(1): p. 374-377.

51. Kuwayama, M., Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 2007. 67(1): p. 73-80.

52. Pegg, D.E., -Principles of Cryopreservation, in *Preservation of Human oocytes*. 2009, CRC Press. p. 34-46.

53. Elliott, G.D., S. Wang, and B.J. Fuller, Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 2017. 76: p. 74-91.

54. Fahy, G.M., The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, 1986. 23(1): p. 1-13.