

functional assessment of the activity of the ovaries of cows and heifers, and forecast the impact of artificial insemination. *Materialy II mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Molochnaya imperiya» – Proceedings of the Second International Scientific and Practical Conference Milk empire*. Donetsk, 230–241 (in Russian).

10. Sidashova, S. A. 2013. Funktsional'naya asimmetriya gonad samok KRS i sviney i dlitel'nost' ekspluatatsii zhyvotnykh plemyadra – Functional asymmetry female gonads of cattle and pigs and durability of animal breeding nucleus. *Materialy II mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Molochnaya imperiya» – Proceedings of the Second International Scientific and Practical Conference Milk empire*. Donetsk, 112–119 (in Russian).

11. Sidashova, S. A. 2012. Effektivnoe vosproizvodstvo: ot diagnoza do stel'nosti Effective reproduction: from diagnosis to pregnancy. *Materialy II mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Molochnaya imperiya» – Proceedings of the Second International Scientific and Practical Conference Milk empire*. Donetsk, 92–101 (in Russian).

12. Sidashova, S. O. 2014. Rezul'tatyvnist' vidtvorenniya diynoho stada i funktsional'na asymetriya yayechnykh koriv The efficiency of dairy cattle reproduction and functional asymmetry of the ovaries of cows. *Visnyk DDAUU – Bulletin of Donetsk State Agrarian University*. 2(34):175–181 (in Ukrainian).

13. Sidashova, S. O., and O. F. Sahlo. 2014. Funktsional'na asymetriya parnykh honad samyts' svynei i VRKh: metodolohiya vyvchennya, fundamental'ni i prykladni aspekty The functional asymmetry of paired gonads of female pigs and cattle: the methodology of the study, fundamental and applied aspects. *Svynarstvo – Pig breeding*. Poltava. 64:91–105 (in Ukrainian).

14. Kovtun, S. I., O. V. Shcherbak, V. F. Stakhovs'kyi, and O. V. Duванov. 2012. Stan ta perspektyvy zastosuvannya kompleksnykh biotekhnolohiy u skotarstvi – State and prospects of biotechnology in complex cattle breeding. *Rozvedennya i henetyka tvaryn – Animal Breeding and Genetics: mizhvid. tem. nauk. zb.* Kyiv, Ahrarna nauka. 46:26–29 (in Ukrainian).

15. Yulevych, O. I., S. I. Kovtun, and M. I. Hyl'. 2012. *Biotekhnolohiya – Biotechnology* Mykolayiv, MDAU, 476 (in Ukrainian).

16. Hansen, G. R. 2001. *Select the sperm your next calf prior to mating: using sexed semen*. UF. University of Florida, 7:522–527.

17. Pender Peter. 1993. Bovine Artificial Insemination. *Technical Manual*. Canada, Ontario, 112.



УДК 636.2:[57.086.13:591.3]

КРІОКОНСЕРВАЦІЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ КОРІВ З ВИКОРИСТАННЯМ РІЗНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

П. А. ТРОЦЬКИЙ

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)
trotskiy_pa@ukr.net

Досліджено ефективність використання різних біологічно активних речовин у еквілібраційному та вітрифікаційному розчинах при заморожуванні ооцит-кумулясних комплексів корів. Встановлено, що застосування сироватки крові корів у еквілібраційному розчині при кріоконсервації ооцит-кумулясних комплексів корів підвищує кріорезистентність ооцитів корів до дії низьких температур, що дозволяє отримувати на 5,4–15,5% більше гамет на метафазі-2 мейозу. Використання фетальної сироватки крові корів, унітіолу, ацетилхоліну у вітрифікаційному розчині для заморожування ооцит-кумулясних комплексів корів не впливає на кріорезистентні властивості гамет. Аналіз проведених досліджень засвідчив перевагу використання сироватки крові корів при кріоконсервації ооцит-кумулясних комплексів корів, що призводить до збільшення на 11,5% зародків великої рогатої худоби після розморожування, дозрівання і запліднення *in vitro*.

Ключові слова: криоконсервація, ооцит-кумулюсні комплекси, криопротектори, вітрифікаційний розчин, дозрівання *in vitro*, ембріони

CRYOPRESERVATION OF OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES OF COWS WITH DIFFERENT BIOACTIVE SUBSTANCES

P. A. Trotskiy

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of NAAN, (Chubynske, Ukraine)
trotskiy_pa@ukr.net

The efficiency of using different biologically active substances in equilibration and vitrification solutions during freezing oocyte-cumulus complexes of cows has been researched. It is established that the use of cow blood serum in equilibration solution at cryopreservation of oocyte-cumulus complexes of cows increases cryoresistance of cow oocytes to low temperatures, thus providing by 5,4–15,5% more gametes at metaphase-2 of meiosis. The use of fetal serum of cows, unithiol, acetylcholine in vitrification solution for freezing oocyte-cumulus complexes of cows does not affect cryoresistive properties of gametes. Analysis of the studies showed superiority of the use of serum at cryopreservation of cow oocyte-cumulus complexes, leading to increasing embryos of cattle by 11,5% after thawing, maturation and fertilization in vitro.

Keywords: cryopreservation, oocyte-cumulus complexes, cryoprotector, vitrification solution, *in vitro* maturation, embryos

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ООЦИТОВ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ КОРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

П. А. Троцкий

Институт разведения и генетики животных имени М.В.Зубца НААН, (Чубинское, Украина)

*Исследовано эффективность использования различных биологически активных веществ в эквilibрационном и витрификационном растворах при замораживании ооцит-кумулюсных комплексов коров. Установлено, что применение сыворотки крови коров в эквilibрационном растворе при криоконсервации ооцит-кумулюсных комплексов коров повышает криорезистентность ооцитов коров к действию низких температур, позволяет получать на 5,4–15,5% больше гамет на метафазе-2 мейоза. Использование фетальной сыворотки крови коров, унитиола, ацетилхолина в витрификационном растворе для замораживания ооцит-кумулюсных комплексов коров не влияет на криорезистентные свойства гамет. Анализ проведенных исследований показал преимущество использования сыворотки крови коров при криоконсервации ооцит-кумулюсных комплексов коров, что приводит к увеличению на 11,5% зародышей крупного рогатого скота после размораживания, созревания и оплодотворения *in vitro*.*

Ключевые слова: криоконсервация, ооцит-кумулюсные комплексы, криопротекторы, витрификационный раствор, созревание *in vitro*, эмбрионы

Вступ. Впровадження біотехнологічних технологій в тваринництві слід розглядати не тільки з точки зору інтенсифікації селекційного процесу (отримання ембріонів в пробірці, їх трансплантація), а в більшій мірі, як розробку ефективних методів заморожування і тривалого зберігання клітин ссавців, в тому числі яйцеклітин і ембріонів. У тваринництві застосування методів біотехнології сприяє збільшенню темпів генетичного прогресу, збереженню генофонду порід у вигляді спермобанку, ембріобанку та криобанку ооцитів, одержанню і регулюванню потомків бажаної статі, забезпеченню генетичної оцінки гамет і ембріонів, дозволить використовувати генетичний потенціал тварин після їх вибракування за віком та багаторазово тиражувати і створити нові генотипи із заданими властивостями [1, 2, 3].

Незважаючи на те, що вже отримано потомство з деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин заморожених надшвидким методом, ефективність цих технологій залишається низькою. Всі вживані для заморожування ооцитів кріопротектори є осмотично активними речовинами і при використуванні концентраціях істотно змінюють клітинний об'єм. Вітрифікація значно спрощує саму процедуру заморожування, бо вона не потребує контролю швидкості охолодження і необхідності сидингу, а тому не потребує наявності спеціальних дорогих приладів – програмних заморожувачів. До того ж вітрифікація значно спрощує процес заморожування, при ній немає позаклітинної кристалізації – однієї з головних причин клітинних пошкоджень [4, 5].

Прогрес у галузі сучасних біотехнологій відтворення неможливий без розробки простого і ефективного методу заморожування ооцитів, яйцеклітин, зигот і ембріонів сільськогосподарських тварин, отриманих *in vivo* та *in vitro*. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є удосконалення середовищ та умов заморожування статевих клітин та ембріонів. Хоча загальний розвиток методу кріоконсервації відбувається шляхом спрощення еквілібраційних і вітрифікаційних розчинів, які були б здатні забезпечувати повноцінний розвиток деконсервованих гамет. Доповнення розчину для кріоконсервації біологічно активними речовинами сприяє захисту гамет протягом заморожування-розморожування, а визначення закономірностей дії цих речовин сприятиме вдосконаленню процедури культивування деконсервованих ооцитів поза організмом. Отже, необхідні поглиблені фундаментальні дослідження механізмів формування зрілих яйцеклітин корів, отриманих з деконсервованих ооцитів з метою отримання з них доімплантаційних ембріонів [6, 7, 8].

Метою роботи було провести порівняльний аналіз різних біологічно активних речовин у еквілібраційному та вітрифікаційному розчинах при кріоконсервуванні ооцит-кумулясних комплексів корів.

Матеріал і методика досліджень. Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулясні комплекси корів чорно-рябої породи. Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко, виловлювали пастерівською піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками. Для заморожування використовували ооцити з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом.

Перед заморожуванням гамети корів обробляли еквілібраційним розчином, а потім переносили у вітрифікаційний розчин. Всі еквілібраційні (10% гліцерин + 20% пропандіол) та вітрифікаційні (25% гліцерин + 25% пропандіол) розчини для кріоконсервації ооцит-кумулясних комплексів корів були приготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20% фетальної сироватки корів, 1×10^{-4} М унітіолу, 1×10^{-6} М ацетилхоліну та без додавання біологічно активних речовин.

Після розморожування гамет виведення кріопротекторів з них проводили шляхом перенесення їх на 10 хв. у розчин 1,0 М сахарози. Ооцит-кумулясні комплекси корів культивували протягом 27 год. при температурі 38,5°C, 5% CO₂ у повітрі, в краплях середовища 199 з 10% попередньо інактивованою сироваткою корів, 2,5 мкг/мл ФСГ, 1,0 мкг/мл естрадіолу, 2,5 МОд/мл лютеїнізуючого гормону, 2,0 мМ натрія пірувату, 2,92 мМ кальція лактату, 40 мкг/мл гентаміцину.

Після дозрівання поза організмом нативні та деконсервовані яйцеклітини корів підлягали заплідненню *in vitro*. Для запліднення *in vitro* використовували відповідно заморожену сперму бугая. Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J.J. et al. [9]. Спільне інкубування яйцеклітин і сперматозоїдів проводили в термостаті при температурі 38,5°C, 5% CO₂ в повітрі, в краплях середовища Fert.-TALP. Після 12–18 годин спільного інкубування яйцеклітини і зиготи відмивали від прилиплої сперми і переносили в краплі середовища CDM для подальшого культивування.

На різних етапах культивування ооцити та ембріони підлягали морфологічному і цитогенетичному аналізу. Цитогенетичні препарати готували за методом Tarcowski A.K. або

Ushijima M. et al., забарвлювали 2,0%-ним розчином Гімза («Fluka») та досліджували під мікроскопом.

Результати досліджень. Проведено дослідження з додавання деяких біологічно активних речовин (фетальної сироватки корів – варіант А, унітіолу – варіант Б, ацетилхоліну – варіант В, без додавання біологічно активної речовини – варіант Г, в контрольній групі (К) клітини не заморожували) у еквілібраційний та вітрифікаційний розчини при заморожуванні ооцит-кумуляусних комплексів корів.

За результатами експериментальних досліджень встановлено, що введення у еквілібраційний розчин вищенаведених компонентів для заморожування ооцит-кумуляусних комплексів корів підвищує їх кріорезистентність, про що свідчить збільшення на 5,4–23,0% показника дозрівання поза організмом деконсервованих гамет до метафази-2 мейозу після 27 годинного культивування та зменшення на 2,9–15,3% показника кількості ооцитів з хромосомними порушеннями.

Введення біологічно активних речовин у вітрифікаційний розчин (табл. 1) та подальше культивування після заморожування-розморожування протягом 27 годин ооцит-кумуляусних комплексів корів виявило збільшення на 3,9–16,4% показника дозрівання поза організмом деконсервованих гамет до метафази-2 мейозу та зменшення на 2,9–8,4% показника кількості ооцитів з хромосомними порушеннями.

1. Застосування біологічно активних речовин у вітрифікаційному розчині при заморожуванні ооцит-кумуляусних комплексів корів

Варіанти досліджу	Кількість заморожених клітин	Кількість клітин, придатних для культивування після розморожування		Кількість клітин:					
				на метафази-2		на інших стадіях мейозу		з хромосомними порушеннями	
		п	%	п	%	п	%	п	%
А	120	112	93,3 ±2,3	63	56,2 ^a ±4,7	19	17,0 ±3,5	30	26,8 ^c ±4,2
Б	117	107	91,5 ±2,6	56	52,3 ^{ad} ±4,8	18	16,8 ±3,6	33	30,8 ^{eg} ±4,5
В	123	118	95,9 ±1,8	59	50,0 ^{ad} ±4,6	24	20,3 ±3,7	35	29,7 ^c ±4,2
Г	142	128	90,1 ±2,5	51	39,8 ^b ±4,3	32	25,0 ±3,8	45	35,2 ^{eh} ±4,2
К	99	--	--	78	78,8 ^c ±4,1	8	8,1 ±2,7	13	13,1 ^f ±3,4

Примітка. a;b; a;c; e:f – p<0,05; b;d; f:g – p<0,01; d;c; c:d; f:h – p<0,001, критерій Стьюдента.

В цій та наступних таблицях різні суперскріпти в межах однієї колонки вказують на вірогідну різницю між показниками.

Порівняльний аналіз результатів із запліднення *in vitro* деконсервованих яйцеклітин корів, що були заморожені з використанням фетальної сироватки корів (варіант – А) та без неї (варіант – Б) (табл. 2) виявив позитивний ефект додавання її у еквілібраційне та вітрифікаційне середовища при заморожуванні гамет корів, що призводило до збільшення на 11,5% отримання зародків великої рогатої худоби в умовах *in vitro*.

2. Запліднення деконсервованих яйцеклітин, що були заморожені з використанням біологічно активних речовин

Варіанти досліджу	Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадіях:									
		всього		з них % від загальної кількості зародків							
				2-клітинних		3–4-клітинних		5–8-клітинних		9–16-клітинних	
п	%	п	%	п	%	п	%	п	%		
А	109	22	20,2 ^a ±3,8	4	18,2 ±8,2	2	9,1 ±6,1	6	27,3 ±9,5	10	45,4 ±10,6
Б	126	11	8,7 ^b ±2,5	4	36,3 ±14,5	3	27,3 ±13,4	2	18,2 ±11,6	2	18,2 ±11,6
К	81	36	44,4 ^c ±5,5	3	8,3 ±4,6	2	5,5 ±3,8	11	30,6 ±7,7	20	55,6 ±8,3

Примітка. a;b – p<0,05; a;c – p<0,01; b;c – p<0,001, критерій Стьюдента.

Таким чином, аналіз результатів експериментальних досліджень свідчить про різну ефективність використання фетальної сироватки корів, унітіолу, ацетилхоліну у еквілібраційному розчині для заморожування ооцит-кумулюсних комплексів корів виявив різну ефективність їх використання. Не встановлена перевага використання цих біологічно активних речовин у вітрифікаційному розчині для кріоконсервації гамет корів за таких показників, як дозрівання поза організмом деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів до метафази-2 мейозу.

Висновки. Введення в кріоконсервуючий розчин фетальної сироватки корів підвищує кріорезистентність ооцитів корів до охолодження, що приводить до збільшення на 23,0% показника дозрілих поза організмом деконсервованих гамет до метафази-2 мейозу та на 11,5% отриманих зародків великої рогатої худоби в умовах *in vitro*.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Ковтун, С. І. Нові біотехнологічні методи збереження генетичних ресурсів тварин / С. І. Ковтун // Проблеми збереження генофонду тварин : матеріали творчої дискусії. – К.: Аграрна наука, 2007. – С 44-45.
2. Програма збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року / заг. наук. ред. І. В. Гузева, консультація та специфікація Ю. Ф. Мельника. – К.: Арістей, 2009. – 132 с.
3. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue / E. J. Woods, J. D. Benson, Y. Agca, J. K. Crister // Cryobiology.– 2004.– Vol.48.– P.146–156.
4. Галицька, Т. В. Особливості отримання ембріонів свиней *in vitro* в системі збереження біорізноманіття тварин /Т. В. Галицька, П. А. Троцький // Розведення і генетика тварин. – К., 2015. – Вип.49. – С. 243–247.
5. Survival of vitrified *in vitro*–produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure / J. N. Caamano, E. Gomez, B. Trigal, et al. // Theriogenology. – 2015. – Vol. 83. – I.5. – P. 881–890.
6. Arav, A. Cryopreservation of oocytes and embryos / A. Arav // Theriogenology. – 2014. – Vol. 81. – I.1. – P.96–102.
7. Christopher G. Grupen The evolution of porcine embryo *in vitro* production / G. Grupen Christopher // Theriogenology. – 2014. – Vol. 81. – I.1. – P.24–37.
8. Троцький, П. А. Оцінка життєздатності деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів корів заморожених надшвидким методом / П. А. Троцький / Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – К., 2011. – Том. 9, № 2. – С. 283–287.
9. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid / J. J.Parrish, J. L. Susko-Parrish, R. R. Handron [et al.] // Biol. Reprod.– 1989.– V. 40.– P. 1020–1025.

REFERENCES

1. Kovtun, S. I. 2007. Novi biotekhnolohichni metody zberezheniya henetychnykh resursiv tvaryn – New biotechnological methods for preserving animal genetic resources, *Problemy zberezheniya genofondu tvaryn : materialy tvorchoi' dyskusii'* – Preservation of the gene pool of animals: Materials creative discussion. Kyiv, Ahrarna nauka, 44–45 (in Ukrainian).
2. Guzjeva, I. V., and Ju. F. Mel'nyka. 2009. *Prohrama zberezheniya henofondu osnovnykh vydiv sil's'kohospodars'kykh tvaryn v Ukrayini na period do 2015 roku* – Program preserve the gene pool of the main types of farm animals in Ukraine for the period up to 2015, zah. nauk. red. I.V. Huzyeva, konsul'tatsiya ta spetsyifikatsiya Yu.F. Mel'nyka – common. Science. ed. I.V Huzyeva, consultation and specification Yu.F. Melnyk Kyiv, Aristey, 132 (in Ukrainian).
3. Woods, E. J., J. D. Benson, Y. Agca, and J. K. Crister. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue. *Cryobiology*. 48:146–156.
4. Halyts'ka, T. V., and P. A. Trots'kyu. 2015. Osoblyvosti otrymannya embrioniv svynei *in vitro* v systemi zberezheniya bioriznomanittya tvaryn – Peculiarities of pig embryos *in vitro* system

biodiversity of animals. *Rozvedennya i henetyka tvaryn – Animal Breeding and Genetics*. Kyiv. (49): 243–247 (in Ukrainian).

5. Caamano J.N., E. Gomez, B. Trigal, et al. M. Munoz, S. Carrocera, D. Martin, and C. Diez. 2015. Survival of vitrified in vitro–produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology*. 83(5): 881–890.

6. Arav, A. 2014. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*. 81(1):96–102.

7. Christopher G. Grupen. 2014. The evolution of porcine embryo in vitro production. *Theriogenology*. 81(1):24–37.

8. Trots'kyy, P.A. 2011. Otsinka zhytlyezdatnosti dekonservovanykh ootsyt-kumulyusnykh kompleksiv koriv zamorozhenykh nadshvydkym metodom – Assessment of the viability of canned oocyte-cumulus complexes cows on frozen fast method. *Visnyk Ukrayins'koho tovarystva henetykiv i seleksioneriv – Bulletin of the Ukrainian Society of geneticists and breeders*. Kyiv. 9(2): 283–287 (in Ukrainian).

9. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, R.R. Handrow, M.M. Sims, and N.L. First. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 40:1020–1025.

