

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

ЗЮЗІОН АЗА БОГДАНІВНА

УДК 636:575.16:591.32 (043)

**ЦИТОМОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ
КОМПЛЕКСІВ ТА ЕМБРІОНІВ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН ЗА
УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO***

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця Національної академії аграрних наук України

- Науковий керівник:** доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник,
Дзіцюк Валентина Валентинівна,
Інститут розведення і генетики тварин імені
М.В.Зубця НААН,
головний науковий співробітник
лабораторії біотехнології
- Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН
Кунах Віктор Анатолійович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН
України
завідувач відділу генетики клітинних популяцій
- доктор сільськогосподарських наук, професор
Шаран Микола Михайлович,
Інститут біології тварин НААН
завідувач лабораторії біотехнології відтворення

Захист відбудеться «19» травня 2016 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради ради K26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного, 148, Київ-143, 03143.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного, 148, Київ-143, 03143.

Автореферат розісланий «15» квітня 2016 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради

Листван К. В.

ІЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Розвиток біотехнологічних методів відтворення у тваринництві, зокрема одержання ембріонів *in vitro* та їх кріоконсервування, забезпечує прискорене розмноження цінних генотипів та дозволяє зберегти генетичні ресурси зникаючих порід і видів тварин шляхом створення банків генетичного матеріалу (С. Г. Шаловило, 1994; Л. К. Ернст; 1995, Е. Groeneveld, 2005).

Нові реалії вимагають застосування не лише нових методичних підходів до репродуктивної біотехнології, а і збільшення кількості видів тварин, генетичний матеріал яких можна ефективно використовувати у програмах запліднення *in vitro*, трансгенезу і клонування (М. Pieterse et al., 1991; В. П. Буркат та ін., 2005). Надійним засобом використання потенційного запасу репродуктивних клітин тварин є культивування незрілих ооцитів, вилучених із яєчників тварин, їх запліднення поза організмом і отримання повноцінних ембріонів на доїмплантаційних стадіях. Важливою умовою для позитивного результату таких робіт є поглиблене вивчення особливостей раннього ембріогенезу ссавців *in vitro*, що потребує застосування нових методів біотехнології, генетики, клітинної біології та ембріології (С. Роре, 2000; J. Kurreck, 2003; W. Allen, 2005).

Об'єктивну оцінку біологічної повноцінності гамет і ембріонів тварин на ранніх етапах розвитку в умовах *in vitro* забезпечує їх морфологічний та цитогенетичний аналіз, що дозволяє встановити закономірності генетичних процесів у ранньому ембріогенезі ссавців. На вирішення цих питань спрямована експериментальна частина дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконувалися згідно з програмами науково-дослідних робіт Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН за завданнями: «Встановити генетичні закономірності розвитку *in vitro* ембріонів сільськогосподарських тварин з використанням наноматеріалів та розробити електронне програмування оцінки якості зародків» (номер державної реєстрації 0107U00515, 2006 – 2010 р.р.); «Виявити закономірності генетичних процесів при отриманні клонованих зародків з метою тиражування бажаних генотипів сільськогосподарських тварин» (номер державної реєстрації 0107U005152, 2006 – 2010 р.р.); «Розробити ембріотехнологічну систему репродукції сільськогосподарських тварин з використанням нанобіоматеріалів» (номер державної реєстрації 0111U003288, 2011-2015 р.р.); «Розробити систему збереження та раціонального використання генофонду порід на основі методології функціонування банку генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин із застосуванням методів ембріологічної генетики» (номер державної реєстрації 0111U003289, 2011-2015 р.р.).

Мета і завдання досліджень. Метою дисертаційної роботи є визначення цитогенетичних і морфологічних особливостей ооцит-кумулюсних комплексів окремих видів сільськогосподарських тварин та вдосконалення методів отримання ембріонів в умовах *in vitro*.

Для досягнення поставленої мети вирішувались наступні завдання:

- вивчити цитоморфологічні зміни ооцит-кумулюсних комплексів кролів, свиней і кіз у процесі їх дозрівання *in vitro*;
- дослідити особливості запліднення яйцеклітин кролів і свиней, що дозріли *in vitro*;
- визначити особливості розвитку ембріонів тварин різних видів в умовах *in vitro*;
- провести морфологічний і цитогенетичний аналіз ембріонів кролів і свиней, отриманих *in vitro*;
- удосконалити методи культивування і запліднення *in vitro* ооцитів кролів, свиней і кіз.

Об'єкт дослідження: цитоморфологічні особливості ооцитів і ембріонів сільськогосподарських тварин.

Предмет дослідження: ооцити кролів, свиней і кіз, ембріони кролів і свиней, отримані в умовах *in vitro*.

Методи досліджень: біотехнологічні – культивування *in vitro* ооцит-кумулюсних комплексів кролів, свиней, кіз; запліднення *in vitro* яйцеклітин кролів і свиней; цитогенетичні – аналіз хроматину ядер ооцитів і ембріонів отриманих *in vitro*; статистичні – математична обробка результатів досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів. Експериментально доведено можливість отримання *in vitro* в лабораторних умовах біологічно повноцінних ембріонів кролів та повноцінно дозрілих яйцеклітин кіз.

Удосконалено умови культивування ооцит-кумулюсних комплексів кролів, свиней і кіз та отримання *in vitro* доїмплантаційних ембріонів кролів та свиней. Вперше встановлено, що наноматеріали, синтезовані на основі високодисперсного кремнезему, оптимізують середовища для дозрівання та формування ембріонів кролів і свиней *in vitro*.

Доведена перевага використання ооцит-кумулюсних комплексів, вилучених із яєчників кролів, свиней і кіз на стадії фолікулярного росту у порівнянні із яєчниками на лютеїновій стадії або овуляції.

Вперше в Україні досліджена можливість культивування *in vitro* незрілих ооцитів кіз з метою їх дозрівання до стадії мейозу метафази II. Досліджено цитогенетичні особливості ооцитів кролів та кіз в динаміці їх культивування *in vitro*.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено методи комплексного морфологічного та цитогенетичного аналізу ооцит-кумулюсних комплексів різних видів самок сільськогосподарських тварин, що забезпечило підвищення рівня запліднення *in vitro* ооцитів та збільшення ефективності розвитку ембріонів *in vitro*.

Отримані результати досліджень використовуються: в навчальному лекційному курсі дисципліни “Біотехнологія тваринної клітини” на факультеті біотехнології і біотехніки в Національному технічному університеті України “Київський політехнічний інститут”; науковцями відділу біомедичних проблем поверхні та лабораторії мас-спектрометрії нанорозмірних систем інституту хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України для удосконалення технології одержання біологічно активних наноматеріалів, синтезованих на основі високодисперсного кремнезему та біомолекул; в ДП «ДГ ім. Декабристів Полтавської

сільськогосподарської дослідної станції ім. М. І. Вавилова Інституту свинарства і АПВ НААН» у збереженні генофонду миргородської породи свиней.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем спільно з науковим керівником визначено напрям, мету і завдання дисертаційної роботи, розроблена схема і вибрані методики проведення досліджень. Увесь обсяг запланованих експериментальних досліджень проведено безпосередньо здобувачем. Опрацьовано та проаналізовано джерела наукової літератури за темою дисертації, здійснено статистичну обробку результатів, проведено аналіз одержаних результатів, сформульовано висновки та пропозиції щодо їх застосування.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові результати дисертаційної роботи викладено на наукових конференціях молодих вчених та аспірантів Інституту розведення і генетики тварин НААН (с. Чубинське 2008–2010); 2-му з'їзді українського товариства клітинної біології (Київ, 2007); науково-теоретичній конференції, присвяченій пам'яті академіка В. П. Бурката (с. Чубинське 2010); IV–VIII міжнародних конференціях "Фактори експериментальної еволюції організмів" (Алушта, 2008 – 2013); міжнародній науково-практичній конференції "Наукомісткі технології у сучасному тваринництві" (Харків, 2013).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 24 наукові праці, що включають 17 статей, 5 з яких у фахових виданнях України з біологічних наук, дві – у іноземних наукових журналах, 5 тез доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень, їх обговорення та узагальнення, висновків, пропозицій, списку використаної літератури. Обсяг роботи становить 179 сторінок комп'ютерного тексту і містить 35 таблиць і 72 рисунки. Список використаних джерел містить 237 джерел, з яких 197 – іноземних авторів.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури розглянуто основні етапи розробки методів дозрівання ооцитів поза організмом, проблеми капацитації сперматозоїдів, запліднення яйцеклітин поза організмом та отримання ембріонів *in vitro*. Також наведені дані щодо застосування нанотехнології у репродуктивній біотехнології. Крім того, окремо висвітлено особливості методів дозрівання ооцитів поза організмом та отримання ембріонів *in vitro* у кролів, свиней та кіз.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження виконано на базі лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН за наведеною схемою (рис. 1).



Рис. 1. Загальна схема досліджень

Цитоморфологічні дослідження клітинної структури гамет і ембріонів проводили у трьох порід кролів, трьох порід свиней і двох порід кіз (табл. 1).

Таблиця 1. Обсяг проведених досліджень

Вид тварин	Господарство	Досліджено			
		порід	голів	ОКК (вилучених)	ембріонів (<i>in vitro</i>)
Кролі	СГ ПП «Марчук Н. В.», ТОВ «Кролікофф» (Черкаська обл.) Приватний сектор	сірий велетень метелик новозеландська червона	77	1404	351
Свині	СВАТ «Агрокомбінат «Калита» (Київська обл.)	велика біла ландрас миргородська	39	1592	204
Кози	Приватний сектор	зааненська ламанча	12	528	-

Ооцит-кумулюсні комплекси (ОКК) вилучали з яєчників на різних фазах статевого циклу із забитих здорових тварин різного віку. Вилучення ооцитів, їх пошук та оцінку здійснювали під світловим мікроскопом МБС-9 за збільшення в 12-24 разів. Культивування відібраних ооцитів кролів, свиней і кіз проводили *in vitro* в

пластикових чашках Петрі (по 25 – 30 ооцитів у 1мл) у середовищі 199 на розчині Ерла (Sigma, М 5017). Дозрілі *in vitro* ооцити запліднювали розмороженими, еякульованими або одержаними із придатків сім'яників (епідидимісів) сперматозоїдами плідників. Зиготи кролів культивували *in vitro* в середовищі 199 на розчині Ерла з 10 % ФСТ і 0,068 мг/мл канаміцин сульфату з 5 % CO₂ в атмосфері повітря, зиготи свиней – у середовищі NCSU-23 протягом 2 – 7 днів. Морфологію ооцитів і ембріонів досліджували на цитогенетичних препаратах за модифікованим методом Тарковського (Tarkowski A. K., 1966). Для аналізу та фотографування застосовували світлові мікроскопи МБС-9, Jenaval та Carl Zeiss із фотовиводом “Axiostar Plus” (об. 10х, 90х м. ім., 100х м. ім., ок. 10х). Статистичну обробку одержаних даних проводили з використанням критеріїв Ст'юдента та Пірсона χ^2 (Лакин Г. Ф., 1990) з використанням програми Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Морфологічні та цитогенетичні дослідження формування ембріонів кролів *in vitro*. Морфологічні характеристики незрілих ооцитів, зокрема структура їх ооплазми та стан кумулюсних клітин є визначальними критеріями для оцінки здатності ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК) до дозрівання *in vitro*. Вилучені у 77 кролів трьох порід із яєчників на різних фазах естрального циклу (фолікулярного росту, овуляції і лютеїновій) ооцит-кумулюсні комплекси класифікували за цитоморфологічними ознаками: I група – ооцити, оточені щільним багат шаровим кумулюсом, із однорідною невакуолізованою ооплазмою; II група – ооцити, оточені розпушеним шаром кумулюса та однорідною невакуолізованою ооплазмою; III група – ооцити, які частково втратили кумулюс, але з невакуолізованою однорідною ооплазмою; IV група – атретичні, денудовані, з вакуолізованою ооплазмою, непридатні до подальшого розвитку. З яєчників на всіх фазах естрального циклу найбільше вилучено ооцитів першої групи (із щільним кумулюсом) – 31,4-35,4 %. Майже 87 % придатних до подальшого розвитку *in vitro* ОКК всіх морфологічних груп отримано із яєчників на фолікулярній фазі, тоді як відсоток вилучених придатних до подальшого розвитку ОКК із яєчників з ознаками овуляції склав 65 %, а із яєчників на лютеїновій фазі – 68 % (табл. 2).

Таблиця 2. Аналіз ооцит-кумулюсних комплексів, вилучених із яєчників кролиць на різних фазах естрального циклу

Фази естрального циклу	Загальна кількість ОКК, n	ОКК придатні до подальшого розвитку поза організмом			ОКК не придатні до подальшого розвитку поза організмом
		I група, n (%)	II група, n (%)	III група, n (%)	IV група, n (%)
фолікулярна	110	36 ^a (32,7 ± 4,5)	40 ^b (36,4 ± 4,6)	19 ^c (17,3 ± 3,6)	15 ^f (13,6 ± 3,3)
овуляції	48	17 ^a (35,4 ± 6,9)	12 ^b (25 ± 6,3)	2 ^{de} (4,2 ± 2,9)	17 ^{gh} (35,4 ± 6,9)
лютеїнова	51	16 ^a (31,4 ± 6,5)	15 ^b (29,4 ± 6,4)	4 ^{ec} (7,8 ± 3,8)	16 ^h (31,4 ± 6,5)

Примітки: c:d, f:g – p < 0,01; f:h – p < 0,05, критерій Ст'юдента.

Порівняння результатів цитогенетичного аналізу ооцитів, вилучених із яєчників кролиць на різних фазах естрального циклу, свідчить, що, незалежно від фази естрального циклу яєчника, до 90 % ооцитів перебували на стадії профази мейозу – диплотені. Зокрема, ооцитів з хроматином стадії дифузної диплотени і видимих бівалентів зафіксовано вірогідно більше з яєчників на фазі фолікулярного росту. Із яєчників на лютеїновій фазі естрального циклу отримано 70 % ооцитів, розвиток яких зупинився на мейотичній стадії фібрилярної диплотени.

Більше 25 % ооцитів з дегенерованим хроматином отримали із яєчників кролиць на лютеїновій фазі – фазі утворення жовтого тіла. На нашу думку, це пояснюється тим, що жовте тіло продукує гормон прогестерон, який пригнічує ріст фолікулів і розвиток ооцитів у них. Найменше ооцитів з дегенерованим хроматином (до 20 %) виявлено в групі клітин із яєчників на стадії фолікулярного росту. Таким чином, в результаті досліджень встановлено, що найбільш придатними для отримання ооцитів з метою їх запліднення *in vitro* є яєчники молодих кролиць, що перебувають на фазі фолікулярного росту.

З метою дослідження можливого впливу породи кролів на кількість і якість вилучених із яєчників ооцитів дослідили дві породи кролів: сірий велетень і метелик. За морфocитологічними характеристиками і рівнем дозрівання *in vitro* ооцити, вилучені із яєчників кролиць порід сірий велетень і метелик, не відрізнялись. В результаті спільного культивування *in vitro* з 85 ооцитів кролиць породи метелик з епідидимальними сперматозоїдами самців цієї ж породи у 78,8 % з них відбулось запліднення, а із 79 ооцитів, вилучених із яєчників кролиць породи сірий велетень, запліднилися *in vitro* 89,9 % (71 із 79) (табл. 3).

**Таблиця 3. Одержання ембріонів *in vitro*
за використання ооцитів кролів різних порід**

Порода кролиць	Зигот, n (%)	Кількість, n (%)		Нероздроблених зигот, n (%)
		2–4- клітинних ембріонів	ранніх морул	
метелик	67	33 (49,3±6,1)	21 (31,3±5,6)	13 (19,4±4,8)
сірий велетень	71	33 (46,6±5,9)	19 (26,7±5,2)	19 (26,7±5,2)

Порівнянням цитоморфологічних характеристик одержаних *in vivo* і *in vitro* ембріонів встановлена біологічна повноцінність останніх, що підтверджено 89 відсотками їх дозрівання до метафази II. Після запліднення *in vitro* 68,4 % даних ооцитів розвинулись до стадії 2-4 клітинних ембріонів (рис. 2, 3) і 15,8 % до стадії ранніх морул (табл. 4).

Таблиця 4. Використання методів *in vitro* та *in vivo* одержання ооцитів кролиць

Спосіб отримання	Кількість досліджених		Оцитів, дозрілих до метафази II	Ембріонів, що розвинулись до стадій		Нероздроблених зигот, n (%)
	яєчників	оцит-кумулюсних комплексів		2-4-клітинних	ранніх морул	
<i>in vitro</i>	6	64	57 (89,0±3,9)	26 ^a (68,4±7,5)	6 ^b (15,8±5,9)	6 ^c (15,8±5,9)
<i>in vivo</i>	10	96	85 (88,5±3,3)	30 ^a (50,8±6,5)	8 ^b (13,6±4,4)	21 ^d (35,6±6,2)

Примітка: c:d – $p < 0,05$, критерій Ст'юдента.

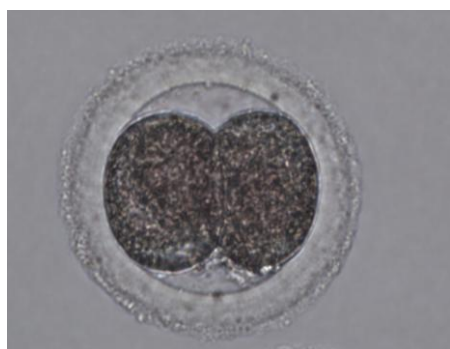


Рис. 2. Зажиттєве фото сформованого поза організмом двоклітинного ембріона кролів. Зб.: об.10х, ок.10х.

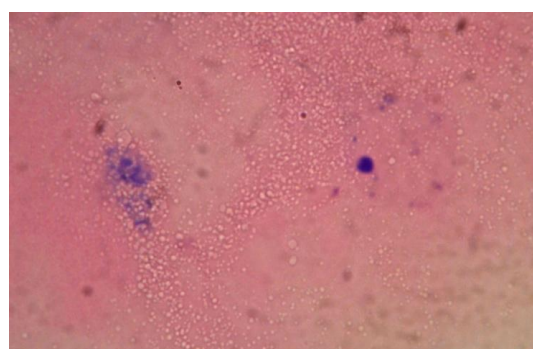


Рис. 3. Цитогенетичний препарат сформованого поза організмом двоклітинного ембріона кролів. Зб.: об.100х, ок.10х.

Внаслідок дослідження тривалості культивування ооцитів кролів *in vitro* протягом 6-ти 12-ти і 24-х годин встановлено, що через 24 години культивування найбільша кількість (72 %) ооцит-кумулюсних комплексів відновили мейотичні перетворення і досягли метафази II, тобто даний інтервал часу для культивування гамет кролів є оптимальним (табл. 5; рис. 4, 5).

Таблиця 5. Вплив тривалості культивування ооцит-кумулюсних комплексів на дозрівання ооцитів кролів *in vitro*

Час культивування ОКК (год.)	Кількість ооцитів, n	Ооцити на стадії				Ооцитів з дегенерованим хроматином, n (%)
		диплотени, n (%)	діакінезу, n (%)	метафази I, n (%)	метафази II, n (%)	
6	58	19 ^a (32,8±6,16)	23 ^c (39,7±6,42)	8 ^e (13,8±4,52)	2 ^h (3,4±2,39)	6 ^j (10,3±3,99)
12	50	12 ^{ab} (24,0±6,03)	5 ^d (10,0±4,24)	21 ^f (42,0±6,97)	6 ^h (12,0±4,59)	6 ^j (12,0±4,59)
24	93	13 ^b (13,9±3,59)	2 ^d (2,2±1,50)	1 ^g (1,1±1,06)	67 ⁱ (72,0±4,65)	10 ^j (10,8±3,21)

Примітки: a:b – $p < 0,05$; e:g – $p < 0,01$; c:d, e:f, h:i, – $p < 0,001$, критерій Ст'юдента.



Рис. 4. Ооцит кролиці придатний до культивування *in vitro*.
Зб.: об.10х, ок. 10х.



Рис. 5. Ооцит кролиці після культивування *in vitro* ідентифіковано перше полярне тіло (стрілка). Зб.: об.10х, ок. 10х.

Вирішальним чинником успішного культивування ооцитів і ембріонів тварин є підбір складу культуральних середовищ для їх повноцінного дозрівання і запліднення. Додавання до середовища 199 на розчині Ерла для культивування наноматеріалу ВДК/D-галактозаміну у концентрації 0,001 % позитивно впливало на динаміку мейотичного дозрівання *in vitro* ооцитів кролів, внаслідок чого вихід дозрілих *in vitro* ооцитів у дослідній групі збільшився на 11,4 % порівняно з таким показником у контрольній (табл. 6).

Таблиця 6. Аналіз впливу ВДК/D-галактозаміну 0,001 %-ї концентрації на ефективність дозрівання ооцитів кролиць *in vitro*

Група	Всього ооцитів, n	Стадії розвитку ОКК <i>in vitro</i> , n (%)				Ооцитів з дегенерацією хроматину, n (%)
		диплотена	діакінез	метафаза I	метафаза II	
контрольна	107	10 ^a (9,3±2,8)	3 ^b (2,8±1,6)	5 ^c (4,7±2,0)	81 ^d (75,7±4,1)	8 ^f (7,5±2,5)
дослідна	101	3 ^a (2,9±1,6)	2 ^b (1,9±1,4)	1 ^c (1,0±0,9)	88 ^e (87,1±3,3)	7 ^f (6,9±2,5)

Примітка: d:e – $p < 0,05$ критерій Ст'юдента.

Додавання наноматеріалу ВДК t°C200 в концентрації 0,001 % у середовище для культивування ембріонів кролів позитивно вплинуло на формування та розвиток ембріонів. У дослідній групі ооцитів, в середовище якої додано ВДК t°C200 в концентрації 0,001 %, отримано вірогідно більшу кількість ембріонів (31 %), які розвинулись до передімплантаційних стадій (табл. 7; рис. 6, 7).

Таблиця 7. Рівень формування *in vitro* ембріонів кролів

Група	Всього запліднено ооцитів, n	Кількість, n (%)		
		зигот	2-4-х клітинних ембріонів	морул, ранніх бластоцист
дослідна	58	44 ^a (75,9±6,4)	32 ^b (55,2±6,5)	18 ^c (31,0±6,0)
контрольна	54	36 ^a (66,7±5,6)	28 ^b (51,9±6,8)	7 ^d (12,9±4,36)

Примітки: c:d – $p < 0,05$, критерій Ст'юдента. Культивування до стадії морул відбувалося в одному досліді.

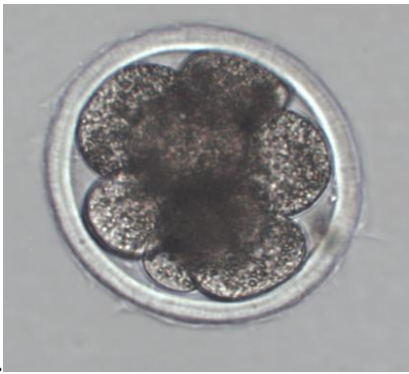


Рис. 6. Фото сформованого *in vitro* ембріона кроля.
Зб.: об.10х, ок10х.

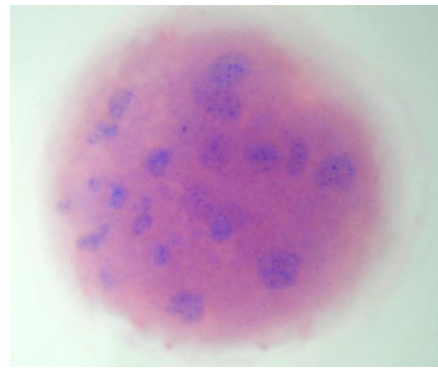


Рис. 7. Цитогенетичний препарат морули кроля, сформованої *in vitro*.
(п ядер = 19). Зб.: об.100х, ок10х.

Д ослід

ження особливостей дозрівання і запліднення ооцитів свиней *in vitro*. Отримання необхідної кількості біологічно повноцінних ембріонів свиней *in vitro* дозволяє вирішити низку важливих проблем щодо впровадження інноваційних клітинних репродуктивних технологій у тваринництво і медицину. Хоча основні підходи до методу вже розроблені, вихід ооцитів на стадії метафази II і повноцінних ембріонів залишається низьким. В яєчниках свиней, як і більшості ссавців, основна генерація ооцитів перебуває до моменту овуляції на стадії диплотени, не втрачаючи здатності завершити оогенез.

В процесі досліджень проаналізовані зміни в ядрах ооцитів з відновленням мейозу *in vitro*, які характерні для переходу з профазы мейозу I до наступних стадій мейотичного дозрівання. Досліджена популяція ооцитів, вилучених із яєчників свиней порід ландрас і велика біла, неоднорідна і гетерогенна за структурою хроматину. Результати досліджень свідчать, що ооцити перебувають на різних стадіях розвитку, зокрема на стадії диплотени їх виявлено 57,1 %. Не виявлено впливу породи свиней на якість і кількість вилучених незрілих ооцитів і їх здатність до відновлення мейотичного розвитку *in vitro*.

Морфологічною та цитологічною оцінкою встановлено, що 87,2 % ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас і 87,9 % свинок породи велика біла відновили мейоз *in vitro* і досягли стадії ядерного дозрівання – метафази II мейозу (табл. 8).

Таблиця 8. Цитоморфологічна оцінка ооцитів, вилучених із яєчників свиней порід ландрас і велика біла в процесі культивування *in vitro*

Порода	Кількість ооцит-кумулюсних комплексів, п	Кількість ооцитів на стадії мейозу, п (%)			Ооцитів з ознаками дегенерації, п (%)
		диплотени	метафази I	метафази II	
ландрас	132	8 (6,1±4,5)	1(0,8±0,7)	116 (87,9±2,8)	7 (5,3±1,9)
велика біла	141	5 (3,5±1,5)	2 (1,4±0,9)	123 (87,3±2,8)	11 (7,8±2,2)

В цілому, рівень дозрівання *in vitro* ооцитів, вилучених з яєчників свинок порід ландрас і велика біла склав 87,5 %. Не встановлено достовірної різниці у кількості ембріонів у результаті запліднення поза організмом 123-х дозрілих в умовах *in vitro* ооцитів, отриманих із фолікулів яєчників свинок порід ландрас і 116-ти великої білої.

Встановлено, що велика частина ооцит-кумулюсних комплексів із фолікулів яєчників свинок порід ландрас і велика біла після культивування поза організмом повноцінно дозріли (рис. 8). Це підтверджує високий рівень формування зигот (67,8 %) та ембріонів (42,5 %) (рис. 9). Отже, доведено доцільність використання ооцит-кумулюсних комплексів свиней порід ландрас і велика біла в репродуктивних технологіях *in vitro* (табл. 9).

Таблиця 9. Запліднення *in vitro* ооцитів, отриманих із яєчників свиней порід ландрас і велика біла

Порода свинок	Запліднено ооцитів, п	Зигот, п	Кількість, п (%)		
			2–4-клітинних ембріонів	ранніх морул	нероздроблених зигот
ландрас	123	84	36 (42,8±5,3)	24 (28,6±4,9)	24 (28,6±4,9)
велика біла	116	78	33 (42,3±5,5)	23 (29,5±5,1)	22 (28,2±5,0)

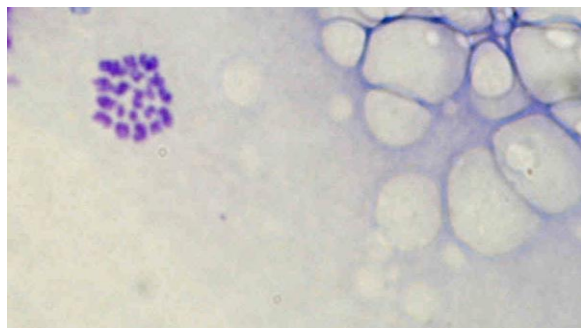


Рис. 8. Цитогенетичний препарат ооциту свині після дозрівання *in vitro* на стадії метафази II мейозу. Ідентифіковано гаплоїдний набір хромосом ($n=19$). Зб.: об.100х, ок.10х.

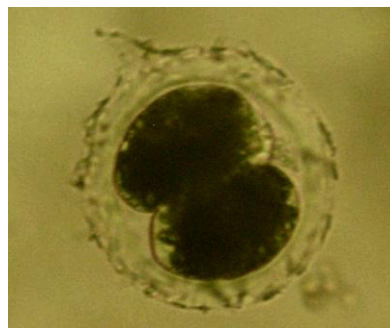


Рис. 9. Зажиттєве фото сформованого поза організмом двоклітинного ембріона свиней. Зб.: об.10х, ок.10х.

З метою вибору оптимальних умов для біотехнологічних маніпуляцій із ооцитами і ембріонами сільськогосподарських тварин досліджено вплив наноматеріалів на дозрівання *in vitro* ОКК свиней і встановлено, що додавання ВДК/Н-галактози у концентрації 0,001 % у середовище для культивування сприяє збільшенню кількості ооцитів, що дозріли до стадії метафази II до 84,2 % (85 із 101) (табл. 10).

Таблиця 10. Вплив ВДК/N-галактози на дозрівання ооцитів свиней *in vitro*

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

Примітки: a,b, d,e – $p < 0,05$, критерій Ст'юдента.

Повноцінність дозрівання підтверджує високий рівень формування ембріонів у дослідній групі та їх розвиток до стадії морули (табл. 11).

Таблиця 11. Аналіз формування ембріонів свиней *in vitro*

Група	Зигот, n (%)	Кількість, n (%)		
		2–4-клітинних ембріонів	ранніх морул	нероздроблених зигот
контрольна група	28	11 ^a (39,3±9,2)	5 ^c (17,9±7,2)	12 ^e (42,8±9,3)
дослідна група	27	18 ^b (66,7±9,0)	6 ^c (22,2±8,0)	3 ^f (11,1±6,0)

Примітка: a : b – $P < 0,05$; e : f – $P < 0,01$ критерій Ст'юдента.

Додавання наноматеріалу ВДК t°C200 в концентрації 0,001 % сприяє отриманню більшої кількості ембріонів, що досягли *in vitro* стадії ранньої морули (табл. 12).

Таблиця 12. Вплив ВДК t°C 200 на ефективність формування *in vitro* ембріонів свиней

Група	Запліднено ооцитів, n	Кількість, n (%)		
		зигот	2-4-клітинних ембріонів	ранніх морул
дослідна (з додаванням ВДК t°C 2000)	145	127 ^a (90,3±2,6)	51 ^b (40,2±4,3)	35 ^c (27,5±6,3)
контрольна	134	121 ^a (87,6±2,7)	44 ^b (36,4±4,4)	14 ^d (11,4±4,8)

Примітки: c:d – $p < 0,01$, критерій Ст'юдента.

Дослідження особливостей дозрівання *in vitro* ооцит-кумулюсних комплексів кіз. З яєчників 12 кіз двох порід (зааненської, ламанча) вилучено і проаналізовано за цитоморфологічними характеристиками 527 ооцит-кумулюсних комплексів. У дослідженні враховували фази естрального циклу яєчників.

Популяції ооцитів залежно від стану кумулюса та ооплазми розподіляли на чотири групи. Морфологічною оцінкою популяцій ОКК встановлено, що придатних до культивування (I-ї – III-ї груп) ооцитів із яєчників на стадії фолікулярного росту вилучено на 15,9 % більше, ніж із яєчників на лютеїновій фазі. Крім того, в популяції ОКК вилучених із яєчників (рис. 10, 11) на лютеїновій фазі виявлено значно більшу кількість ($p < 0,05$) дегенерованих ооцитів (табл. 13).



Рис. 10. Яєчники кози на стадії фолікулярного росту.



Рис. 11. Яєчники кози на стадії лютеїнової фази.

Таблиця 13. Морфологічний аналіз ооцит-кумулюсних комплексів вилучених із яєчників на різних фазах естрального циклу

Фази естрального циклу	Загальна кількість ОКК, n	ОКК, придатні до подальшого розвитку поза організмом, n (%)			ОКК, не придатні до подальшого розвитку поза організмом, n (%)
		I група	II група	III група	IV група
фолікулярна	110	46 ^a (41,8 ± 4,7)	29 ^b (26,4 ± 4,2)	19 ^c (17,3 ± 3,6)	16 ^d (14,5 ± 3,3)
лютеїнова	56	18 ^a (32,1 ± 6,2)	15 ^b (26,8 ± 5,9)	6 ^c (10,7 ± 4,1)	17 ^e (30,4 ± 6,1)

Примітки: d: e – $p < 0,05$, критерій Ст'юдента

Аналізом цитогенетичних препаратів встановлено, що більшість ооцитів кіз, вилучених із яєчників на фолікулярній і лютеїновій фазах перебували на стадії диплотени (рис. 12, 13; табл. 14).

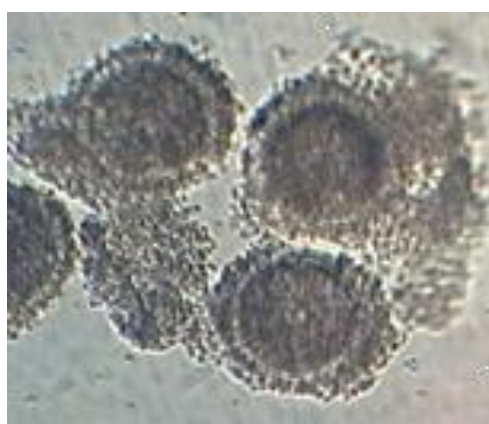


Рис. 12. Ооцити кози придатні до культивування *in vitro*. Зб.: об.10х, ок.10х.

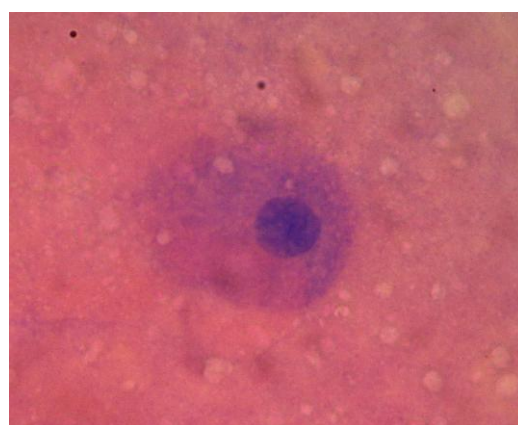


Рис. 13. Цитогенетичний препарат ооциту кози. Стадія дифузної диплотени профази I мейозу. Зб.: об.100х, ок.10х.

14. Цитогенетичний аналіз ооцит-кумулюсних комплексів вилучених із яєчників кіз на різних фазах естрального циклу

Т
аб
ли
ця

Фази естрального циклу	Загальна кількість ОКК, n	Кількість ооцитів на стадії диплотени, n (%)			Метафази II, n (%)	Дегенерація хроматину, n (%)
		дифузної	фібрилярної	видимих бівалентів		
фолікулярна	110	54 ^a (49,0±4,7)	28 ^b (25,5±4,1)	6 ^c (5,5±2,1)	4 ^d (3,6±1,7)	18 ^e (16,4±3,5)
лютеїнова	56	20 ^a (35,7±6,4)	13 ^b (23,2±5,6)	2 ^c (3,6±2,4)	2 ^d (3,6±2,4)	19 ^f (33,9±6,3)

Примітка: e:f – $p < 0,05$ критерій Ст'юдента.

Результати досліджень свідчать, що як джерело ооцитів доцільно використовувати яєчники кіз на фазі фолікулярного росту, оскільки з них можна вилучити більше на 15,9 % придатних до культивування поза організмом ооцитів і вірогідно меншу кількість дегенерованих гамет.

З метою оптимізації умов культивування ооцитів кіз *in vitro*, досліджено три часові параметри культивування – 24, 27 і 30 годин. В результаті 24- годинного культивування лише у 32,2 % ооцитів відбулось ініціювання мейозу і клітини перебували на стадії метафази I (рис. 14) і метафази II мейозу I (рис. 15).

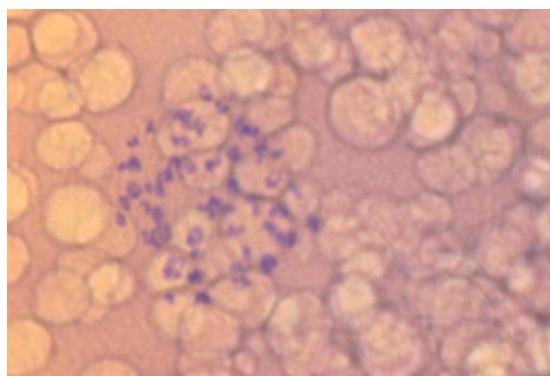


Рис. 14. Цитогенетичний препарат ооциту кози після культивування 24 год. Стадія анафази метафази I мейозу. Зб.: об.100х, ок.10х.

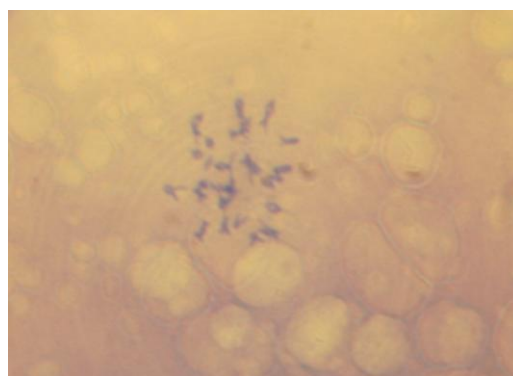


Рис. 15. Цитогенетичний препарат ооциту кози після культивування 27 год. Стадія метафази II мейозу. Ідентифіковано гаплоїдний набір хромосом ($n = 30$). Зб.: об.100х, ок.10х.

Через 27 годин культивування більшість (52,7 %) ооцит-кумулюсних комплексів вилучених із яєчників кіз в підібраних умовах відновили мейоз і досягли метафази II (табл. 15).

Таблиця 15. Визначення оптимального часу культивування ооцит-кумулясних комплексів кіз в умовах *in vitro*

Час культивування ОКК (год.)	Кількість ооцитів, n	Ооцити на стадії					Кількість ооцитів з дегенерованим хроматином, n (%)	
		диплотени, n (%)			метафази I, n (%)	метафази II, n (%)		
		дифузної	фібрилярної	видимі біваленти				
24	59	11 ^a (18,6±5,0)	16 ^c (27,1±5,7)	7 ^e (11,9±4,2)	5 ^f (8,5±3,6)	14 ^g (23,7±5,5)	6 ⁱ (10,2±3,9)	
27	55	9 ^{ab} (16,4±4,9)	8 ^{c d} (14,6±4,7)	2 ^e (3,6±2,5)	2 ^f (3,6±2,5)	29 ^h (52,7±6,7)	5 ⁱ (9,1±3,8)	
30	56	3 ^b (5,3±3,0)	7 ^d (12,5±4,4)	3 ^e (5,4±3,0)	1 ^f (1,8±1,7)	31 ^h (55,4±6,6)	11 ⁱ (19,6±5,3)	

Примітки: a;b; c;d – p<0,05; g;h – p<0,001 критерій Ст'юдента.

За продовження часу культивування до 30 годин не відмічено збільшення числа ооцитів, які досягли метафази II. Однак при цьому збільшилась на 10 % кількість ооцитів із дегенерованим хроматином, що може в подальшому вплинути на здатність ооцитів до запліднення поза організмом.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено особливості цитоморфологічних характеристик ооцит-кумулясних комплексів і ембріонів кролів, свиней і кіз та теоретично обґрунтовано і експериментально доведено можливість практичної реалізації завдання щодо отримання *in vitro* повноцінних ембріонів доімплантаційних стадій з незрілих ооцитів.

1. Встановлено, що 89 % вилучених із яєчників ооцитів кролів дозрівають *in vitro* до стадії метафази II, з яких утворюється 68,1 % повноцінних ембріонів на двоклітинній стадії. Доведено, що розвиток ембріонів кролів *in vitro* не поступається за ефективністю методу отримання яйцеклітин *in vivo* з використанням гормональної стимуляції тварин. Встановлено, що найефективнішим джерелом ооцитів кролів є яєчники самок на стадії фолікулярного росту.

2. За результатами проведених досліджень встановлено різний вплив наноматеріалів ВДК t°C200, ВДК/D-галактозаміну і ВДК/N-галактози на дозрівання і запліднення *in vitro* ооцитів кролів і свиней при їх додаванні у середовища для культивування. Наноматеріал ВДК t°C200 в концентрації 0,001 % у складі середовища стимулює процес дроблення зигот кролів і свиней і формування ембріонів до передімплантаційних стадій розвитку. Наноматеріал ВДК/N-галактоза сприяє збільшенню рівня запліднення *in vitro* свиней на 11 % та рівня дроблення ембріонів на 31,7 % (p<0,05). Наноматеріал ВДК/D-галактозамін не виявляє негативного впливу на рівень запліднення і розвиток ембріонів кролів в умовах *in vitro*.

3. Застосований комплекс біотехнологічних методів дозволив отримати від свиноматок миргородської породи 97 повноцінних яйцеклітин, дозрілих *in vitro*, для формування ооцитобанку даної породи.

4. Встановлено відсутність вірогідної різниці у кількості і якості отриманих *in vitro* ембріонів свиней порід ландрас і велика біла та кролів порід сірий велетень і метелик. Різниця у кількості отриманих ембріонів свиней від донорів двох порід становить 7,2 %, кролів від донорів порід сірий велетень і метелик – 5,6 %, що вказує на недостовірну різницю.

5. Ооцит-кумулюсні комплекси, отримані із фолікулів яєчників свинок порід ландрас і велика біла після культивування поза організмом, повноцінно дозріли, що підтверджується високим рівнем утворення зигот (67,8 %) та ембріонів доімплантаційних стадій розвитку (29,0 %).

6. За результатами проведених досліджень встановлено, що в якості джерела ооцитів кіз доцільним є вилучення їх з яєчників на стадії фолікулярного росту. На цій стадії яєчників вилучили на 15,9 % більше придатних до культивування поза організмом ооцитів і отримали вірогідно меншу кількість дегенерованих гамет ($p < 0,05$).

7. Встановлено, що оптимальною тривалістю культивування ОКК кіз є 27-годинне культивування, після чого 52,7 % незрілих ооцит-кумулюсних комплексів кіз в підібраних умовах відновили мейотичні перетворення і досягли МІІ, а кількість гамет з дегенерованим хроматином склала лише 9,1 %.

8. Не встановлено вірогідної різниці у рівні дозрівання *in vitro* ооцитів, вилучених із яєчників кіз на стадії фолікулярного росту та на лютеїновій фазі (55,1 % та 52,8 %). Проте відмічено вірогідну різницю у кількості ооцитів з дегенерованим хроматином ($p < 0,005$).

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. У лабораторіях біотехнологічного напрямку досліджень рекомендується застосовувати методи тиражування високоцінних генотипів тварин зникаючих видів і порід у формі отриманих *in vitro* біологічно повноцінних ембріонів для збереження їх у банку генетичних ресурсів.

2. З метою підвищення ефективності методів отримання поза організмом ембріонів ссавців пропонуємо використовувати середовища з додавання наноматеріалів на основі високодисперсного кремнезему для оптимізації умов дозрівання та культивування *in vitro* ооцитів і ембріонів.

3. Для комплексної перевірки якості імпортованої сперми та спермопродуктивності плідників рекомендуємо застосовувати метод одержання *in vitro* ембріонів сільськогосподарських тварин.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Зюзюн А. Б. Використання ембріотрансплантації у тваринництві / А. Б. Зюзюн // Вісн. аграр. науки. – К. – 2008. – № 9 – С. 76–77.
2. Щербак О. В. Ефективність методів одержання яйцеклітин та ембріонів кролів *in vitro* / О. В. Щербак, А. Б. Зюзюн, Ю. М. Косенюк // Вісн. аграр. науки. – К. – 2011. – № 6 – С. 27–29. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, аналіз та часткову інтерпритацію результатів).*
3. Щербак О. В. Біотехнологічна модель одержання зародків кролів *in vitro* з використанням наноматеріалу / О. В. Щербак, С. І. Ковтун, А. Б. Зюзюн, О. С. Осипчук // Біологія тварин – 2015. – Т.17, № 2. – С.172–178. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз та часткову інтерпритацію результатів).*
4. Зюзюн А. Б. Застосування наноматеріалу в ембріогенетичній системі *in vitro* отримання ембріонів свиней / А. Б. Зюзюн, О. В. Щербак, О. С. Осипчук, С. І. Ковтун, В. В. Дзіцюк // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. // Національна академія наук України – К. : „Логос”. – 2015. – Т.17. – С. 164–168. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, статистичну обробку даних, їх аналіз).*
5. Дзіцюк В. В. Аналіз ооцит-кумулюсних комплексів кіз та параметрів їх дозрівання в умовах *in vitro* / В. В. Дзіцюк, А. Б. Зюзюн, О. С. Осипчук // Вісн. аграр. науки. – К. – 2015. – № 12 – С. 39–42. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз та часткову інтерпритацію результатів)*
6. Kovtun S. The use of biotechnological methods for conservation of animal genetic resources / S. Kovtun, O. Shcherbak, A. Zyuzyun, N. Rieznykova, A. Duvanov, A. Osypchuk // Journal of Animal Science (BG) – Софія, Болгарія. – 2013. – С. 83–87. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, аналіз та часткову інтерпритацію результатів).*
7. Syrvatka V. J. Use of Novel Silver Nanoparticles with Hyaluronan as Potential Biological Labels for Determining the Quality of Embryos Development / Yuriy I. Slyvchuk; Ivan I. Rozgoni; Ivan I. Gevkan; Oleksandr I. Bilyy; Oleksandr S. Osypchuk; Aza B. Zyuzyun // Optical Engineering. – 2013. – V. 8812. – P. 11–19. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, статистичну обробку даних, їх аналіз).*
8. Щербак О. В. Біотехнологічні методи одержання і зберігання гамет сільськогосподарських тварин / О. В. Щербак, П. А. Троцький, А. Б. Зюзюн // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. // – К.: Логос. – 2008. – Т. 5. – С. 463–467. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, аналіз та часткову інтерпритацію результатів).*
9. Зюзюн А. Б. Формування ембріонів *in vitro* як спосіб оцінки запліднювальної здатності сперматозоїдів бугаїв / А. Б. Зюзюн, С. І. Ковтун, О. В. Щербак, М. Г. Порхун // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. – К.: Логос. – 2009. – Т. 7. – С. 218–222. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, аналіз та часткову інтерпритацію результатів).*

10. Ковтун С. І. Дослідження ефективності формування ембріонів кролів *in vitro* / С. І. Ковтун, А. Б. Зюзюн, О. В. Щербак, Л. М. Гончаренко // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. – К.: Логос. – 2010. – Т. 9. – С. 152–156. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, статистичну обробку даних, їх аналіз).*

11. Зюзюн А. Б. Комплексний аналіз генетичних закономірностей раннього ембріогенезу свиней різних порід / А. Б. Зюзюн, О. В. Щербак, С. І. Ковтун, Л. М. Гончаренко, Т. В. Галицька, П. А. Троцький // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. // Національна академія наук України – К.: Логос. – 2011. – Т. 10. – С. 220–224. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, аналіз та часткову інтерпретацію результатів).*

12. Щербак О. В. Використання репродуктивного потенціалу свинок в технології формування ембріонів *in vitro* / О. В. Щербак, А. Б. Зюзюн // Розведення і генетика тварин : міжвідомчий тематичний науковий зб. – 2011. – № 45. – С. 325–330. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, аналіз та часткову інтерпретацію результатів).*

13. Ковтун С. І. Використання наноматеріалів для ефективного формування ембріонів свиней *in vitro* / С. І. Ковтун, О. В. Щербак, А. Б. Зюзюн, П. А. Троцький, Т. В. Галицька // Досягнення і проблеми генетики селекції та біотехнології: Зб. наук. пр. // Національна академія наук України – К.: Логос. – 2012. – Т. 4. – С. 513–518. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, аналіз та часткову інтерпретацію результатів).*

14. Зюзюн А. Б. Підвищення ефективності формування ембріонів кролів *in vitro* з використанням наноматеріалів *in vitro* / А. Б. Зюзюн // Розведення і генетика тварин : міжвідомчий тематичний науковий зб. К. – 2012. – № 46. – С. 184–186.

15. Зюзюн А. Б. Морфологічний та цитогенетичний аналіз ооцит-кумулюсних комплексів свійських кіз / А. Б. Зюзюн // Розведення і генетика тварин : міжвідомчий тематичний науковий зб. Аграрна наука. – К. – 2013. – № 47. – С. 103–110.

16. Щербак О. В. Біотехнологічна модель використання *in vitro* репродуктивного матеріалу кролів на основі методів ембріологічної генетики / О. В. Щербак, А. Б. Зюзюн, О. С. Осипчук // науково технічний-біюлетень Інституту тваринництва НААН. – Х. – 2013. – С. 331–337. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, статистичну обробку даних, їх аналіз).*

17. Ковтун С. І. Застосуванням наноматеріалів у системі збереження біорізноманіття сільськогосподарських тварин України / С. І. Ковтун, О. В. Щербак, П. А. Троцький, Т. В. Галицька, А. Б. Зюзюн // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. // Національна академія наук України – К.: Логос. – 2013. – Т. 13. – С. 57–61. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, статистичну обробку даних, їх аналіз).*

18. Метлицька О. І. Оптимізація біотехнологічних підходів у системі збереження генофонду свиней миргородської породи / О. І. Метлицька, О. В. Щербак, С. І. Ковтун, П. А. Троцький, А. Б. Зюзюн // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. // Національна академія наук

України – К. : Логос. – 2014. – Т.15. – С. 107–112. *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, статистичну обробку даних, їх аналіз).*

19. Kovtun S. The gene pool preservation of white headed ukrainian breed of cattle by biotechnological approaches / S. Kovtun, O. Shcherbak, A. Osypchuk, A. Zyuzuyn, V. Stakhovskiy // // Розведення і генетика тварин : міжвідомчий тематичний науковий зб. Аграрна наука. – К. – 2015. – № 50. – С.245–251 *(Здобувачем проведено частину експериментальних досліджень, аналіз та часткову інтерпретацію результатів).*

Матеріали конференцій

20. Щербак О. В., Зюзюн А. Б. Цитогенетичний аналіз ооцитів кролів // 2-ий з'їзд українського товариства клітинної біології: Зб. Тез / Українське товариство клітинної біології. – К., КНУ ім. Шевченка. – 2007. – С. 37. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз та часткову інтерпретацію результатів).*

21. Зюзюн А. Б. Морфологічний та цитогенетичний аналіз ооцит-кумулюсних комплексів кіз // Матеріали VI конф. молодих вчених та аспірантів / А. Б. Зюзюн // Інститут розведення і генетики тварин УААН. – с. Чубинське. – 2008. – С. 31–32.

22. Зюзюн А. Б. Аналіз кріоконсервованих сперматозоїдів бугаїв при одержанні ембріонів *in vitro* // Матеріали VII конференції молодих вчених та аспірантів аспірантів / Зюзюн А. Б. // Інститут розведення і генетики тварин УААН. – с. Чубинське – 2009. – С. 40–42.

23. Зюзюн А. Б. Удосконалення методу культивування ооцитів ссавців *in vitro* // Матеріали науково-теоретичної конф., присвяченої пам'яті академіка В. П. Бурката / А. Б. Зюзюн // Інститут розведення і генетики тварин УААН. – с. Чубинське. – 2010. – С. 59–61.

24. Зюзюн А. Б. Аналіз ефективності формування ембріонів кролів *in vitro* // Матеріали VIII конференції молодих вчених та аспірантів аспірантів / А. Б. Зюзюн // Інститут розведення і генетики тварин УААН. – с. Чубинське. – 2010. – С. 28–29.

АНОТАЦІЯ

Зюзюн А. Б. Цитоморфологічні особливості ооцит-кумулюсних комплексів та ембріонів сільськогосподарських тварин за умов культивування *in vitro*. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеню кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, м. Київ, 2016.

У дисертаційній роботі представлено результати досліджень цитоморфологічних особливостей ОКК кролів, свиней та кіз в умовах дозрівання *in vitro*. Проведено аналіз запліднення та розвитку ембріонів кролів та свиней поза організмом.

Науково обґрунтовано і експериментально доведено, що як джерело ооцитів більш доцільним є використання яєчників на фазі фолікулярного росту, оскільки із них можна отримати значно більшу кількість придатних до культивування поза організмом ооцит-кумулюсних комплексів.

Одержано дані щодо оптимальних часових параметрів дозрівання ооцитів поза

організмом досліджених видів тварин – кролів, свиней та кіз. В умовах *in vitro* процес дозрівання ооцитів у кролів триває 24 години, у кіз – 27 годин, а у свиней майже вдвічі довше 44 годин.

Встановлено, що отримання ембріонів кролів з ооцитів в умовах *in vitro* забезпечує дозрівання вилучених із яєчників ооцитів до стадії метафази II на рівні 89 %, а розвиток ембріонів 68,1 %. Отже, застосований метод не поступається за ефективністю методу отримання яйцеклітин, дозрілих *in vivo* з використанням гормональної стимуляції.

Ключові слова: ооцит-кумулюсні комплекси, кролі, кози, свині, яєчники, ембріони, цитоморфологічні дослідження, запліднення *in vitro*, наноматеріали.

АННОТАЦИЯ

Зюзюн А. Б. Цитоморфологическое особенности ооцит-кумулюсных комплексов и эмбрионов сельскохозяйственных животных при культивировании *in vitro* – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт клеточной биологии та генетической инженерии НАН Украины, м. Киев, 2016.

В диссертационной работе представлены результаты исследований цитоморфологических особенностей ОКК кроликов, свиней, коз и их созревания *in vitro*. Проведен анализ оплодотворения и развития эмбрионов кроликов и свиней вне организма.

Научно обосновано и экспериментально доказано, что в качестве источника ооцитов более целесообразным является использование яичников на фазе фолликулярного роста, поскольку с этих яичников можно получить значительно большее количество пригодных к культивированию вне организма ооцит-кумулюсных комплексов.

Получены данные относительно оптимальных временных параметров созревания ооцитов вне организма исследованных видов животных – кроликов, свиней и коз. В условиях *in vitro* процесс созревания ооцитов у кроликов длится 24 часа, у коз – 27 часов, а у свиней почти вдвое дольше 44 часов.

Полученное созревание изъятых из яичников ооцитов кроликов до стадии метафазы II на уровне 89 % и высокий уровень развития эмбрионов 68,1 %, свидетельствуют о том, что данный метод не уступает по эффективности методу получения яйцеклеток *in vivo* с использованием гормональной стимуляции.

Получены данные относительно того, что ооцит-кумулюсные комплексы полученные с фолликулов яичников свинок пород ландрас и крупная белая после культивирования вне организма, достигли метафазы II, что подтверждает высокий уровень формирования зигот (67,8 %) и эмбрионов (42,5 %) чем доказано целесообразность использования репродуктивного потенциала свинок разных пород в технологии получения эмбрионов *in vitro*.

Проведены исследования наноматериалов с целью оптимизации сред для созревания ооцитов и культивирования эмбрионов кроликов и свиней *in vitro*.

В результате проведённых исследований установлено, что добавление в

культуральную среду для созревания ооцитов наноматериала ВДК/D-галактозамина в концентрации 0,001 % положительно влияло на динамику мейотического созревания *in vitro* ооцитов кролей и увеличило количество ооцитов, достигших МII, на 11,4 %.

Определено, что наноматериал ВДК t°C200 в концентрации 0,001 % в составе среды стимулирует процесс дробления зигот кроликов и свиней и способствует развитию значительно большего числа эмбрионов до предимплантационной стадий развития. Наноматериал БДК/N-галактоза способствует увеличению уровня оплодотворения *in vitro* свиней на 11 % и позволяет увеличить количество эмбрионов на 31,7 %.

Ключевые слова: ооцит-кумулюсные комплексы, кролики, козы, свиньи, яичники, эмбрионы, цитоморфологические исследования, оплодотворение *in vitro*, наноматериалы.

ABSTRACT

Zyuzyun A.B. Cytomorphological features of the oocyte-cumulus complexes and embryos of farm animals when cultured *in vitro* – In manuscript.

Thesis for the degree of candidate of biological sciences by specialty 03.00.20 - biotechnology. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences Ukraine, Kyiv, 2016.

In the dissertation presents results of research cytomorphological characteristics OCC rabbits, pigs, goats and their maturation in conditions *in vitro*. Conducted analysis of fertilization and embryo development rabbits and pigs outside the body.

Scientifically substantiated and experimentally demonstrated that source of oocytes is more expedient to use ovarian in follicular growth phase because of their ovaries can be more suitable to the cultivation of oocytes *in vitro* they have much less denaturated gametes.

Obtained informations optimal time parameters maturation of oocytes *in vitro* studied species – rabbits, pigs and goats. In conditions *in vitro* maturation oocytes in rabbits continues – 24 hours, in the goats – 27 hours and pigs almost twice as long – 44 hours.

Established, that obtaining rabbit embryos from oocytes *in vitro*, was provided, the maturation oocytes removed to metaphase II at 89 % and embryo development 68,1 %. Thus, the method does not concede the efficiency of the method of obtaining eggs matured *in vivo* using hormone stimulation.

Keywords: oocyte-cumulus complexes, rabbits, goats, pigs, ovaries, embryos, cytomorphological investigations, fertilization *in vitro*, nanomaterials.