

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ

На правах рукопису

ЗЮЗЮН 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

Дисертація
на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник: Дзіцюк Валентина Валентинівна
доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник

с. Чубинське Київської області

2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОТРИМАННЯ ЕМБРІОНІВ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН <i>IN VITRO</i> (Огляд літератури)	10
1.1. Дозрівання ооцитів тварин поза організмом	12
1.1.2. Капацитація сперматозоїдів	18
1.1.3. Запліднення ооцитів <i>in vitro</i>	21
1.2. Розвиток ембріонів сільськогосподарських тварин в умовах <i>in vitro</i>	23
1.2.1. Нанотехнології у репродуктивній біотехнології	24
1.2.2. Отримання ембріонів кролів поза організмом	26
1.2.3. Розвиток ембріонів свиней в умовах <i>in vitro</i>	27
1.3. Біотехнологічні методи в козівництві	28
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	32
2.1. Матеріал для досліджень	33
2.2. Отримання популяцій ооцитів із яєчників тварин та їх культивування	38
2.3. Підготовка сперматозоїдів до запліднення <i>in vitro</i>	39
2.4. Культивування <i>in vitro</i> ембріонів	42
2.5. Приготування цитогенетичних препаратів ооцитів та ембріонів	43
2.6. Мікроскопування, мікрофотографування, статистична обробка отриманих результатів	44
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	45
3.1. Морфологічні та цитогенетичні дослідження формування	

ембріонів кролів <i>in vitro</i>	45
3.1.1. Цитоморфологічні дослідження ОКК кролиць, одержаних із яєчників на різних фазах естрального циклу	45
3.1.2. Цитоморфологічні дослідження ОКК кролиць, одержаних із яєчників, статевозрілих кролиць та в період статевого дозрівання	60
3.1.3. Вплив тривалості культивування <i>in vitro</i> на ефективність дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів кролиць	63
3.1.4. Дозрівання <i>in vitro</i> ооцитів кролів різних порід	65
3.1.5. Удосконалення середовища для дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів кролів із застосуванням наноматеріалу	69
3.1.6. Порівняльний аналіз одержання зрілих ооцитів кролів методами <i>in vivo</i> та <i>in vitro</i>	72
3.1.7. Формування ембріонів кролів <i>in vitro</i>	74
3.1.7.1. Підготовка епідидимальних сперматозоїдів кролів до запліднення	74
3.1.8. Формування <i>in vitro</i> ембріонів з ооцитів, отриманих із яєчників статевозрілих кролиць та в період статевого дозрівання	80
3.1.9. Отримання <i>in vitro</i> ембріонів кролів порід сірий велетень та метелик	82
3.1.10. Розвиток ембріонів кролів із яйцеклітин, отриманих <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>	86
3.1.11. Вплив на ефективність формування ембріонів кролів наноматеріалів ВДК/D-галактозаміну та ВДК t°C200	88
3.2. Морфологічні та цитогенетичні дослідження формування <i>in vitro</i> ембріонів свиней	95
3.2.1. Аналіз дозрівання <i>in vitro</i> ооцит-кумулюсних комплексів свиней	101

3.2.2.	Вплив ВДК/N-галактози на дозрівання ооцитів свиней в умовах <i>in vitro</i>	104
3.2.3.	Аналіз рівня дозрівання <i>in vitro</i> ооцитів свиней миргородської породи	106
3.2.4.	Формування <i>in vitro</i> ембріонів свиней	109
3.2.5.	Вплив наноматеріалу ВДК/N-галактози на розвиток ембріонів свиней <i>in vitro</i>	111
3.3.	Морфологічна та цитогенетична оцінка популяцій ооцит-кумулюсних комплексів кіз	118
3.3.1.	Аналіз популяцій ооцит-кумулюсних комплексів, вилучених із яєчників кіз на різних фазах естрального циклу	123
3.3.2.	Визначення оптимальних умов для дозрівання <i>in vitro</i> ооцит-кумулюсних комплексів кіз	129
	РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ЕМБРІОНІВ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН <i>IN VITRO</i> (обговорення отриманих результатів досліджень)	135
	ВИСНОВКИ	148
	ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	150
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	151
	ДОДАТКИ	177

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БСА	— бичачий сироватковий альбумін;
ВДК	— вискодисперсний кремнезем;
ЛГ	— лютеїнізуючий гормон;
НК	— нанокompозит;
ОКК	— ооцит-кумулюсні комплекси;
ПГЕ	— суміш пеніциламіну, гіпотаурину і епінефрину;
ЕКЯК	— епітеліальних клітин яйцепроводів корів;
ФСГ	— фолікулостимулюючий гормон;
ФСТ	— фетальна сироватка теляти;
<i>in vitro</i>	— лат. (в склі) — технологія проведення досліджень, «в пробірці» — поза організмом;
<i>in vivo</i>	— лат. (в (на) живому) технологія проведення досліджень в організмі;
IVF	— <i>in vitro</i> fertilization (англ.), запліднення поза організмом;
IVM	— <i>in vitro</i> maturation (англ.), дозрівання поза організмом;
NCSU	— North Carolina State University (англ.), Університет Штату Північної Кароліни, культуральне середовище;
NT	— (nuclear transfer) пересадка ядра;
OPU	— ovum pick-up (англ.), трансвагінальна пункція антральних фолікулів;
PBS	— phosphate buffered saline (англ.), фосфатно-сольовий розчин Дюльбеко;
TALP	— модифіковане середовище Тіроде;
ZP	— partial zona (англ.), прозора оболонка яйцеклітини.

ВСТУП

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, E. 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 (M. 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 доімплантаційних 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. Роуп, 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.

РОЗДІЛ 1

ОТРИМАННЯ ЕМБРІОНІВ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН *IN VITRO* (огляд літератури)

У розведенні сільськогосподарських тварин широко використовуються досягнення генетики і біотехнології для вдосконалення схем розведення, підвищення відтворювальної здатності і збільшення числа нащадків із бажаними ознаками батьківських особин.

Нині розроблено широкий спектр репродуктивних технологій, що охоплюють різні біотехнологічні методи, такі як штучне осіменіння, отримання ембріонів *in vivo* та *in vitro* їх трансплантація, біопсія, прижиттєве визначення статі, трансгенез і клонування. Однак для широкого впровадження сучасних репродуктивних біотехнологічних розробок існує обмежуючий чинник – невелика кількість повноцінних придатних до запліднення ооцитів і ембріонів [30, 135].

Надійне і економічно доцільне джерело незрілих ооцитів і ембріонів сільськогосподарських тварин є необхідним як для науково-дослідних робіт, так і для практичних цілей. Проведення робіт з клонування і генетичної інженерії можуть бути здійснені лише за наявності великого числа клітин і зигот. Сформовані поза організмом доімплантаційні ембріони, є джерелом дешевого біоматеріалу для експериментальних робіт [2, 7]. Крім того, методи отримання *in vitro* ембріонів ссавців дають змогу вивчати морфологічні, цитогенетичні і молекулярно-генетичні особливості раннього ембріогенезу.

Отримати *in vivo* ембріони більшості видів сільськогосподарських тварин можливо лише хірургічним шляхом чи після забою тварин, що не завжди доцільно і не є достатнім і стабільним джерелом надходження біологічного матеріалу. Тому існує необхідність в удосконаленні методів отримання яйцеклітин та ембріонів *in vitro*.

Вважалося, що тільки тривалість життя тварин є лімітуючим фактором для отримання великої кількості потомства, але на даному етапі розвитку генетики та біотехнології даний фактор обмежується лише кількістю повноцінних ооцитів які можна отримати від донора. Тому реальною альтернативою отриманню ембріонів сільськогосподарських тварин *in vivo* є технологія отримання ембріонів *in vitro*.

Для отримання ембріонів сільськогосподарських тварин *in vitro* використовують ооцити із приантральних і антральних фолікулів самок.

Культивування і запліднення ооцитів сільськогосподарських тварин поза організмом означає, що послідовність дуже складних фізіологічних процесів, що відбуваються *in vivo*, повинно проходити у культуральному середовищі у відносно простих і статичних умовах. В штучних умовах отримання ембріонів це відбувається в три етапи:

- ооцити, виділені із фолікулів яєчника самки, мають пройти стадію дозрівання. В цей період відбувається відновлення мейозу, здійснення першого мейотичного поділу і цитоплазматичне дозрівання ооцитів;
- сперматозоїди плідника мають пройти *in vitro* стадії капацитації. В період спільного культивування дозрілих *in vitro* ооцитів і капацитованих сперматозоїдів відбувається запліднення ооцитів;
- створення системи культивування ембріонів тварин *in vitro*, що забезпечить їх розвиток від зиготи до бластоцисти, з метою отримання життєздатних ембріонів.

Успіх культивування ооцитів з метою їх дозрівання і запліднення в лабораторних умовах залежить від багатьох чинників, з яких найважливішим є створення штучної системи культивування, яка забезпечує повноцінне дозрівання ооцитів, здатних до запліднення і подальшого розвитку в ембріони.

Деякі питання регуляторних механізмів мейозу і раннього ембріогенезу досі не вивчені. Так, залишаються неясними питання про

причини і природу інгібування дозрівання ооцитів, хоча знайдені речовини-інгібітори. Є поодинокі і суперечливі дані про причини асинхронності ядерного і цитоплазматичного дозрівання яйцеклітин [97].

1.1. Дозрівання ооцитів тварин поза організмом

Дозрівання ооцитів веде до взаємопов'язаних змін в ядрі, цитоплазмі, плазматичній мембрані і прозорій оболонці. Морфологічною ознакою дозрівання ядра більшості видів ссавців, в тому числі і сільськогосподарських тварин, є розпад зародкового міхурця, конденсація диплонтних хромосом, розходження бівалентів на уніваленти і перехід у стадію метафази II. На цій стадії мейоз блокується, його завершення відбувається за активації клітини сперматозоїдами чи іншими чинниками, що ведуть до зміни стану оолеми та інших змін ооцита [12]. Так, ооцити ссавців отримані з антральних фолікулів перебувають на стадії першого мейотичного поділу, без гонадотропінів ініціювати відновлення мейозу в них неможливо [59].

Фолікулярні ооцити, культивовані поза організмом залишаються незрілими, поки не піддаються гормональному стимулюванню [182].

Ооцити відбирають, як правило, із фолікулів які знаходяться в корковій частині яєчників. Виявлені відмінності у локалізації в яєчниках коркової частини серед різних видів сільськогосподарських тварин. У великої рогатої худоби, овець, кіз і свиней коркова частина це верхній шар яєчників, а наприклад, в кобили корковий шар знаходиться всередині яєчника, що створює деякі проблеми при вилученні ОКК. В даний час розроблено методи вилучення ооцитів як з живих тварин так і після їх забою. Основні методи вилучення ооцитів від живих тварин:

Лапаротомія (лат. *laparos* – живіт, пах, лат. *tomia* – розтинати) хірургічне втручання, яке виконується з метою відкриття повного або часткового доступу до органів черевної порожнини) – використовується для всіх видів тварин;

Лапароскопія (від грец. *λαπάρα* – пах, живіт, грец. *σκοπέο* – дивлюся) сучасний метод травматичної ендоскопічної хірургії. Операцію по вилученню ооцитів проводять через невеликі (діаметр – 0,5-1,5 см) отвори. Це роблять за допомогою лапароскопа та лапароскопічних інструментів – використовується для овець, кіз, свиней, коней і великої рогатої худоби;

Аспірація (від лат. *aspiratio* – вдихання) відсмоктування спеціальними інструментами ооцитів із фолікулів яєчників – використовується в основному для великої рогатої худоби і коней.

При вилученні ооцитів у овець і кіз зазвичай поєднують лапароскопію з вилученням яйцеклітин шляхом аспірації фолікулів яєчника (ovum pick-up (OPU)) [113, 40, 42, 48, 185]. Ооцити вилучають під час природних гормональних циклів або після гормональної стимуляції [194]. Прижиттєвими методами вилучають зрілі ооцити (на метафазі II), хоча дані методи не завжди ефективні і часто значна кількість отриманих ооцитів непридатні до запліднення [175]. Частота можливих вилучень і кількість ооцитів залежить від функціонального стану яєчників, стадії розвитку фолікулів та часу дозрівання ооцитів, які відрізняються залежно від виду тварини [61, 134, 203, 111].

Тому все частіше для проведення біотехнологічних досліджень використовується метод отримання ооцитів із яєчників після забою тварини та їх дозрівання в умовах *in vitro*. Основними методами вилучення ОКК із яєчників є:

- аспірація фолікула яєчника голкою, з'єднаною з всмоктуючим насосом (шприцом) – використовується для всіх видів;
- вирізання фолікулів та подальше вилучення з них ооцитів – використовується переважно для вилучення ооцитів у кобил;
- надрізання яєчників та збір ОКК – використовується для всіх видів [53, 111, 182].

Незрілі ооцити оточені кількома щільними шарами клітин кумулюсу, так званим променистим вінцем, з яким вони утворюють ооцит-кумулюсний комплекс [40, 225, 166, 167, 43, 185, 142].

Встановлена важлива роль в дозріванні ооцитів клітин кумулюсу, які їх оточують. Вони відповідають за зв'язок ооцитів з навколишнім середовищем, виступаючи посередником гормональної і метаболічної регуляції. Зрілі яйцеклітини характеризуються частковою втратою клітин кумулюсу. У більшості сільськогосподарських тварин, перше полярне тільце можна спостерігати візуально, але воно може бути і закрите непрозорою цитоплазмою ооцита через великий вміст ліпідів, тоді дозрівання визначається в основному на основі стану клітин кумулюсу [40, 43 167, 142].

Хроматин незрілих ооцитів перебуває на стадії профазі першого поділу мейозу. Дозрівання яйцеклітин включає в себе одночасно ядерні і цитоплазматичні зміни. Встановлено, що одним із ключових факторів які регулюють мейоз є МАРК (мітоген-активована протеїнкіназа), яка необхідна для досягнення ооцитами стадії метафази II [127, 164]. У більшості ссавців, поновлення мейозу в умовах *in vitro* відбувається спонтанно і завершується на стадії метафази II поділу мейозу, коли ооцит набуває здатності до запліднення [176]. Цитоплазматичне дозрівання включає в себе ряд модифікацій – як морфологічних (міграції органел, збільшення кількості мітохондрій і формування цитоскелету і веретена поділу) так і біохімічних (регуляції клітинного циклу, зміна метаболічних процесів, акумуляція та збереження інформаційного матеріалу) [232].

Виявлено істотні відмінності між видами в термінах дозрівання яйцеклітин поза організмом [53]. Так, у корів і овець яйцеклітини досягають зрілості через 24 години культивування, а у кіз і коней – через 24-30 год. Довше за всіх дозрівання триває у ооцитів свиней, які М II досягають лише через 40-48 год. культивування [167, 142].

Дозрівання ооцитів, включає в себе цілий ряд процесів, які відіграють важливу роль в наступному розвитку ембріона. Так, під час дозрівання відбувається ооплазматична сегрегація, формується і переміщається до поверхні ооциту мейотичне веретено, виділяються полярні тільца, змінюються фізичні та біологічні властивості цитоплазми, кортекс ооциту набуває властивість до скорочення та виділення вмісту кортикальних гранул, взаємодії зі спермієм та перебудовою після активації або запліднення. Існує припущення що деякі компоненти кумулюса викликають акросомну реакцію сперматозоїдів [144].

Повноцінне дозрівання ооцитів *in vitro* до стадії, на якій в природніх умовах відбувається їх овуляція (метафаза II) залежить від багатьох чинників. Ооцити в середовищі для дозрівання *in vitro* перебувають під впливом різних фізичних, хімічних та інших паратипових факторів [232]. Рівень дозрівання ооцитів, значно впливає на ефективність методів отримання ембріонів поза організмом, що пов'язано з рівнем запліднення, поліспермним заплідненням, низькою якістю ембріонів [151].

Встановлено, значений вплив віку тварин-донорів на кількість ооцитів та їх якість. Так, із яєчників телиць отримують більше придатних для дозрівання ооцитів, ніж з яєчників старих корів [128].

Важливим є вплив стадій естрального циклу і величини фолікулів на здатність ооцитів до розвитку. Доведено, що розвиток до стадії бластоцисти був вищим в ооцитах, одержаних на стадії фолікулярного росту або із старим жовтим тілом, ніж на стадії фолікулярного домінування [68, 208,170].

Велике значення має прижиттєвий відбір ооцитів за їх морфологічними характеристиками. Встановлено, що рівень запліднення *in vitro* в певній мірі залежить від морфологічних та цитогенетичних характеристик ооцитів. Це є одним із суттєвих факторів, які впливають на ефективність ядерного і цитоплазматичного дозрівання ооцитів. Тому за станом кумулюсу і ооплазми можна визначити наявність чи відсутність

морфологічних ознак атрезії ооцитів. Відібрані ооцити, придатні для подальшого культивування мають щільний темний кумулюс, гомогенну невакуолізовану ооплазму, неушкоджену мембрану [199].

Дозрівання ОКК у присутності гонадотропінів і стероїдів, а також деяких факторів росту, наприклад, епідермального фактора росту (EGF) і інсуліноподібного фактора росту (IGF-I) сприяє підвищенню рівня запліднення ооцитів *in vitro* (IVF – *in vitro* fertilization) і їхньому подальшому розвитку до стадії бластоцисти. На відміну від розвитку ооцитів *in vivo*, культивування їх поза організмом може призводити до більш швидкого дозрівання ядра порівняно з цитоплазмою. Такі ооцити малоприсадибні для запліднення в результаті відсутності в їх цитоплазмі необхідних білків мРНК та рРНК. А при відсутності необхідних змін прозорості оболонки, або в результаті перезрівання ядерного матеріалу, внаслідок тривалого культивування ооциту, зростає рівень хромосомних порушень. Важливу роль у набутті ооцитами компетенції до запліднення *in vitro* у ссавців відіграють оточуючі фолікулярні клітини, особливо клітини кумулюсу [12].

Важливим для прогресу методики отримання ембріонів поза організмом було удосконалення у 1986 році процедури дозрівання ооцитів корів *in vitro* шляхом додавання у середовище для дозрівання клітин гранульози, вилучених з великих та доовуляційних фолікулів та сироватки крові корів у охоті (еструсної). Завдяки чому була значно підвищена частота запліднення та рівень раннього ембріонального розвитку поза організмом [128].

В середовище для дозрівання ооцитів, як правило, додають 10-20 % інактивованої фетальної сироватки теляти (ФСТ) або еструсної сироватки крові корів. Значення сироватки повністю не з'ясоване, однак відомо, що для підтримання живлення клітин та їх дозрівання велике значення мають амінокислоти, білки, вітаміни та попередники нуклеїнових кислот. Еструсна сироватка містить високі концентрації естрадіолу-17 та лютеїнізуючого

гормону (ЛГ), тому у випадку її використання стає не обов'язковим використання гонадотропінів або естрогенів. Додавання еструсної сироватки гетерологічного виду при дозріванні ОКК поза організмом дає змогу одержувати ембріони *in vitro*, що є актуальним для сезонно циклюючих тварин. [107, 221, 232].

Співкультивування незрілих ооцитів з клітинами гранульози, одержаними із неатретичних фолікулів, сприяє їх цитоплазматичному дозріванню, внаслідок чого підвищується частота формування чоловічого пронуклеусу і збільшується здатність до наступного розвитку *in vitro*. Позитивний вплив клітин гранульози на дозрівання ооцитів пов'язаний з тим, що вони здатні продукувати естрадіол-17 і прогестерон у присутності інсуліну та фолікулостимулюючого гормону (ФСГ). Однак додавання великої кількості клітин гранульози (25×10^6 кл/мл) у середовище дозрівання може затримувати відновлення мейозу в ооцитах корів *in vitro*. [91, 177, 188, 172, 129, 41].

Л.К. Ернст [31] під час дослідження стану хромосом у процесі дозрівання ооцитів, виявив такі аномалії як деспіралізація, конденсація, неправильне розходження хромосом в анафазі I, поліплоїдія та інші. Часто у дозрілих ооцитах ссавців ініціюються процеси старіння, які негативно впливають на якість яйцеклітин і їх здатність до запліднення. Стан старіння або перезрівання яйцеклітини характеризується низкою морфологічних змін, які включають у себе хромосомні аномалії, дефекти веретена поділу, порушення сегрегації сестринських хроматид, збільшення схильності до партеногенезу, зниження рівня запліднення і здатності до ембріонального розвитку. [49, 85.]. Так, під час пролонгованого культивування яйцеклітин корів основними аномаліями в морфології метафазних хромосом є їх деспіралізація і злипання [183, 11]. Тому необхідно підбирати оптимальні часові параметри для культивування ОКК з урахуванням видових особливостей тварин.

1.1.2. Капацитація сперматозоїдів

Відомо, що для запліднення яйцеклітин еякульованим сперматозоїдам ссавців необхідно декілька годин перебувати у статевому тракті самки. Тривалість цього періоду варіює в залежності від виду. Вперше цей феномен для сперматозоїдів ссавців був описаний Остіном та Чангом [79]. Вони встановили, що запліднення у ссавців настає лише у тому випадку, якщо сперматозоїди протягом кількох годин перебували у яйцепроводі самки. Термін капацитація означає, що в сперматозоїді повинні відбутись певні фізіологічні зміни до того як він набуде здатність до запліднення [184].

Спочатку капацитацію визначали як “процес у статевих шляхах самки (або *in vitro*) підготовки сперматозоїдів до здійснення акросомної реакції, для надбання здатності до гіперактивного руху і внаслідок того – до пенетрації прозорої оболонки ооцита” [233, 94, 132]. Зараз відомо, що механізм капацитації пов’язаний зі змінами у ліпідному і глікопротеїновому складі плазматичної мембрани, з втратою її стабільного стану, а також з підвищенням рівня метаболізму сперматозоїдів.

Пізніше було доведено, що тільки сперматозоїди, у яких відбулась акросомна реакція, здатні до пенетрації прозорої оболонки ооцитів ссавців і, після проникнення у перивітеліновий простір до злиття з плазматичною мембраною яйцеклітини плазматичної мембрани сперматозоїда, розташованої у постакрсомальному районі головки [234]. Акросомна реакція у сперматозоїдів ссавців була вперше описана Остіном та Вішопом і вона є процесом, що залежить від позаклітинного Ca^{2+} , у якому приймає участь Ca^{2+} -залежна фосфоліпаза і який характеризується надходженням іонів натрію та кальцію та виходом іонів водню через плазматичну мембрану, що оточує головку сперматозоїда [235, 161].

Не зважаючи на неоднозначність і певну невизначеності в теорії капацитаційних процесів, на практиці в лабораторних умовах розроблено кілька методів капацитації еякульованих сперматозоїдів

сільськогосподарських тварин. Найпростіший із них – відмивання від сім'яної рідини та інкубація в середовищах, що стимулюють процеси, які відбуваються в природніх умовах. Для видалення білків з поверхні спермій, які гальмують капациацію, використовують середовища з високою іонною силою [63], обробка якими забезпечує дію факторів, що стабілізують мембрану клітини.

Найбільше визнання отримав спосіб капациації сперматозоїдів з використанням гепарину. Серед інших речовин, що використовують для ініціації капациації і акросомної реакції сперматозоїдів ссавців *in vitro*, позитивні результати отримали при використанні сироваткового альбуміну, лактоглобуліну, лізолецитину, іонофорів, катехоламінів, циклічних нуклеотидів, стероїдів, компонентів крові, рідини яйцепроводів, фолікулярної рідини, клітин кумулюсу, ооцитів [140, 217, 150].

Ефективним активатором капациації сперматозоїдів бугая є іонофор А23187. Він посилює проникність мембран сперматозоїдів для іонів кальцію, що супроводжується швидкою втратою рухливості сперматозоїдів. Додавання в середовище кристалічного бичачого сироваткового альбуміну (БСА) сприяє припиненню проникнення великої кількості іонів кальцію в цитоплазму сперматозоїда, залишаючи достатню кількість іонофорів для індукції акросомної реакції [50].

Морфологічним проявом акросомної реакції є злиття зовнішньої акросомальної мембрани і плазматичної мембрани у фронтальній частині головки сперматозоїда. При цьому вивільняється вміст акросоми, до складу якого входять принаймні 10-12 різних ферментів, серед яких найбільш важливими є гіалуронідаза і трипсиноподібний фермент акрозин.

Прозора оболонка зрілих незапліднених яйцеклітин містить рецептори, які відповідають за зв'язування із сперматозоїдом і ініціацію його акросомної реакції. Це так звані глікопротеїни зони пелюциду (ZP) [229, 230, 47, 231]. Для яйцеклітин мишей показано, що глікопротеїн прозорої оболонки ZP3 виступає як у ролі рецептора, та і у ролі індуктора

акросомної реакції. Після запліднення ферменти, що звільняються з яйцеклітини внаслідок кортикальної реакції, змінюють глікопротеїн ZP3 прозорої оболонки таким чином, що він стає нездатним до зв'язування сперматозоїдів та викликання в них акросомної реакції. Виявлено, що кортикальна реакція яйцеклітин блокує поліспермне запліднення у ссавців [213, 44, 206].

Використанням сперматозоїдів бугая, які пройшли капацитацію у яйцепроводах кролиці, привело до проникнення сперматозоїдів у яйцеклітини і утворення чоловічих та жіночих пронуклеусів у дослідах Ірітані та Ніви [148, 55].

У великої рогатої худоби були отримані ранні ембріони після ін'єкції капацитованих сперматозоїдів бугая у цитоплазму дозрілих *in vitro* ооцитів корів [236, 154], а перше теля методом мікрозапліднення було одержане Гото із співавторами після ін'єкції сперматозоїда у цитоплазму попередньо активованої яйцеклітини [121].

Отримання запліднення в умовах *in vitro* розмороженими сперматозоїдами можна пояснити тим, що під час відмивання сперматозоїдів а також при їх спільній інкубації з яйцеклітинами в середовищах у частини сперматозоїдів встигає пройти капацитація і акросомна реакція. Це стосується розморожених сперматозоїдів, морфологічні зміни мембран у яких мають схожі риси зі змінами оболонок клітин при їх обробці сольовими розчинами що фізіологічно виражається в дестабілізації мембран [32].

У моделюванні *in vitro* процесів капацитації і акросомної реакції велике значення має концентрація сперматозоїдів в культуральному середовищі. Оптимальною вважається концентрація $10^5 - 10^6$ клітин на 1 мл. На думку деяких авторів мінімальна концентрація спермійів, необхідна для запліднення *in vitro* становить 5×10^6 клітин / мл за умови збереження нормальної рухливості і морфології мінімум у 30 % сперматозоїдів [178, 144].

1.1.3. Запліднення ооцитів *in vitro*

Перша спроба запліднення яйцеклітин ссавців *in vitro* була здійснена Шенком у 1878 році [202] на яйцеклітинах кролів і морських свинок, ці спроби повторювались багатьма дослідниками після нього. Вперше можливість запліднення *in vitro* яйцеклітин кролів доведено у роботі Чанга у 1959 році [79]. Перше теля після запліднення *in vitro* було отримано Брекетом у 1981 р. [226, 65]. Ооцит, у даному дослідженні вилучали хірургічно з яйцепроводу корови. Пересадка 4-клітинного ембріона реципієнту була також здійснена хірургічно. У подальших дослідженнях телята були отримані після IVF дозрілих *in vivo* ооцитів, вилучених методом лапароскопії з фолікулів яєчників гормонально оброблених телиць. У цих дослідженнях для розвитку 2-8-клітинних ембріонів до стадії морули-бластоцисти, тобто стадій, на яких можлива пересадка ембріонів реципієнтам, використовували проміжних реципієнтів – самок кролів [203].

В Радянському Союзі перше теля після дозрівання *in vitro* та запліднення поза організмом фолікулярних ооцитів було отримано у 1983 р. у Всесоюзному НДІ розведення і генетики сільськогосподарських тварин у лабораторії О.К. Голубєва; здійснювалась хірургічна пересадка 2-4-клітинних ембріонів телицям-реципієнтам. У 1987 р. були отримані телята після запліднення *in vitro* або у яйцепроводі кролиці дозрілих поза організмом фолікулярних ооцитів у лабораторії М.І. Прокоф'єва (Ернст Л.К. та ін., 1987). Пізніше було отримане потомство після запліднення поза організмом ооцитів, що дозріли *in vitro* у овець і свиней [81, 89].

Також неодноразово здійснювались спроби запліднення ооцитів ссавців за допомогою мікрохірургічних методів – ін'єкції сперматозоїдів у перивітеліновий простір або ооплазму ооцита, після часткового розсічення або проколювання прозорої оболонки. В результаті ін'єкції в ооплазму яйцеклітини золотистого хом'ячка гомологічних сперматозоїдів і сперматозоїдів людини були отримані чоловічі пронуклеуси [214, 110, 222,

223], тобто було показано, що цитоплазматичні фактори, які контролюють формування чоловічих пронуклеусів не є видоспецифічними – аналогічні результати були отримані для щура та миші [214], жаби та людини, хом'ячка та миші, кроля та риби [90]. Отримано нормальне запліднення після ін'єкції головок сперматозоїдів, позбавлених хвостів, у незапліднені яйцеклітини миші [171].

У людини досягнуто формування чоловічих пронуклеусів після внутрішньоцитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів у ооцити в 1990 році [187], а використання методу часткового розсічення прозорої оболонки (PZD – partial zona dissection) ооцитів людини до запліднення, дозволило отримати вагітності у кінці 80-х років [228].

Встановлено можливість застосування методу ін'єкції сперматозоїдів у перивітеліновий простір або ооплазму ооцита (ICSI) у різних видів сільськогосподарських тварин, але у великої рогатої худоби, овець і кіз метод екстракорпорального запліднення є достатньо ефективним [158].

Існують проблеми при екстракорпоральному заплідненні у свиней і коней через поліспермію (проникнення більш ніж одного сперматозоїда в яйцеклітину) при чому встановлено, що у випадку дозрівання ооцитів поза організмом, частота поліспермії значно нижча, ніж в ооцитів дозрілих *in vivo*. Поліспермія призводить до створення поліплоїдних ембріонів. У деяких випадках триплоїдні ембріони можуть розвиватися до стадії бластоцисти, однак, на більш пізніх етапах вони дегенерують. Щоб обійти цю проблему застосовують метод ICSI [146, 43].

У всіх видів сільськогосподарських тварин, терміни запліднення ОКК поза організмом та формування пронуклеусів є аналогічними і відбувається через 18-20 годин. Незначні відмінності є при застосуванні методу ICSI, що сприяє більш ранньому утворенню зиготи [158, 119].

1.2. Розвиток ембріонів сільськогосподарських тварин в умовах *in vitro*

Останнім етапом отримання ембріонів в умовах *in vitro* є їх культивування в поживному середовищі до розвитку із зиготи до стадії морули або бластоцисти. Цей процес включає в себе ядерні та цитоплазматичні модифікації та їх взаємодії, зміни в обміні речовин ембріона, ембріональні активації геному, експресію генів, формування морули, ущільнення бластомерів та формування з характерної структури бластоцисти [185, 167].

Одним з найбільш важливих процесів, які відбуваються під час ембріонального розвитку як в умовах *in vitro* так і в природних умовах, є активація ембріонального геному – перехід від материнського до зиготичного геному [221]. Активація ембріонального геному відбувається на стадії 4 бластомерів у свиней та 8-16 бластомерів у великої рогатої худоби, овець, кіз і коней. До моменту активації ембріонального геному, ембріональний розвиток проходить на основі материнського генетичного матеріалу який розвинувся протягом дозрівання ооцитів [204].

Встановлено відмінності в ембріогенезі *in vitro* та *in vivo*. Відрізняються морфологічні ознаки отриманих бластоцист, такі як розмір ембріонів та кількість бластомерів, що утворюють внутрішню клітинну масу і трофоектодерму. Найбільш значні відмінності в кількості бластомерів характерні для ембріонів коней. Так бластоцисти, отримані *in vivo*, мають 1761 бластомерів а отримані *in vitro* – 255 бластомерів. В інших видів також спостерігаються відмінності, але незначні [95].

Тривалість ембріонального розвитку до стадії бластоцисти характерна для виду тварин і пов'язана з довжиною і кількістю послідовних клітинних циклів. Ембріони свиней мають короткий час розвитку, досягнувши бластоцисти за 144 години, в той час як у великої рогатої худоби, овець та кіз бластоцисти утворюються через 168 годин культивування. Найдовше розвиваються ембріони коней 168-192 годин після запліднення [43].

Першу спробу культивування ембріонів ссавців поза організмом здійснив Браше в 1912, в якості середовища для культивування він використав коагульовану плазму крові в якій культивував 5-7 днів ембріони кролів. Важливим етапом у розвитку методів культивування ембріонів сільськогосподарських тварин було відкриття в 1983 році важливості підтримання температури, що дорівнює внутрішній температурі тіла тварини тобто, 38 - 39° С [58, 122, 143]. Ще одним важливим етапом у розвитку культивування ембріонів сільськогосподарських тварин було встановлення, що ембріони, краще розвиваються в атмосфері з вмістом кисню нижче 20 %, особливо при культивуванні без соматичних клітин [117].

В даний час середовища для культивування розділяються на дві основні категорії. Перша категорія середовищ включає в себе використання комплексу в культуральному середовищі з різними типами клітин, таких як епітеліальні клітини яйцеводу [74]. Друга категорія простих середовищ базується на використанні синтетична рідини яйцеводу (SOF) які доповнюються різними амінокислотами, вітамінами, сироватками та іншими компонентами [133]. В останні роки з'являються середовища з багатьма складовими такі як SOF – BSA – AA з доданою амінокислотою [113].

Наразі дослідження, спрямовані на удосконалення середовищ для культивування ембріонів, обмежуються в основному випробуванням різних концентрацій стандартних компонентів. Випробування нових компонентів, дотепер не мали значного успіху [151].

1.2.1. Нанотехнології у репродуктивній біотехнології

Для успішного проведення біотехнологічних робіт із дозрівання і запліднення ооцитів сільськогосподарських тварин важливо оптимізувати середовища для гамет та ембріонів за допомогою певних речовин. Цьому сприяє розвиток нанотехнології на основі використання різних

наноматеріалів – високодисперсних речовин з розміром часток не більше 100 нанометрів ($1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$). Нанотехнологія набула широкого використання в сільському господарстві, зокрема в рослинництві, переробці продукції, а останнім часом і для підвищення ефективності біотехнологічних методів у тваринництві [16, 8].

Наночастинки активно використовують при діагностиці хронічних хвороб, для пригнічення бактеріальних інфекцій як агенти доставки лікарських засобів та цільових молекул [29].

Для удосконалення середовищ культивування ооцитів та ембріонів поза організмом заслуговує на увагу високодисперсний кремнезем (ВДК), що застосовується як складова різних лікарських засобів. Поверхня ВДК, завдяки здатності гідроксильних груп до заміщення різними сполуками і біомолекулами, дає змогу використовувати його як матрицю для синтезу похідних. До того ж встановлено, що ВДК, доданий до середовища з гаметами в певній концентрації, пролонгує їх життєву активність. Можливість такого впливу підтверджено на спермі сільськогосподарських тварин [4, 193].

Новою тенденцією до синтезу наночастинок є біологічний синтез із використанням полімерних матриць, які не токсичні і можуть бути легко синтезовані в будь-якій формі, необхідній для певного способу застосування. До подібних матриць можна віднести такі біополімери, як крохмаль, хітозан, циклодекстрин та високодисперсний кремнезем які діють як стабілізатор, так і відновлювальний агент. Застосування біополімерів при виробництві наночастинок має кілька переваг порівняно зі звичайними синтетичними реагентами. Високомолекулярні ланцюги таких біополімерів характеризуються великим числом гідроксильних груп, і тому такі структури можуть утворювати комплекси з цільовими молекулами що дозволяє контролювати розмір, форму і дисперсність наночастинок і робить їх менш токсичними до клітин ссавців.

З використанням адсорбційних методів синтезовані наноматеріали з вуглеводами, за допомогою іммобілізації (закріплення) на гідроксильованій поверхні ВДК. Такі наноматеріали застосовували для удосконалення кріоконсервування еякульованої сперми бугаїв, баранів, людини. Встановлено, що невеликі концентрації синтезованих наноматеріалів і вихідного ВДК помітно впливали на підвищення життєздатності сперматозоїдів досліджуваних видів. Позитивний вплив наноматеріалів з вуглеводами (сахароза, лактоза, рафіноза), білками (БСА) відмічено при кріоконсервуванні сперми бугаїв-плідників [7, 8, 9].

1.2.2. Отримання ембріонів кролів поза організмом

Кролі вважаються зручною моделлю для вивчення репродуктивних, серцево-судинних захворювань людини, а також дослідження регенеративних процесів, через суттєву подібність біохімічних і фізіологічних процесів [93, 116, 82].

Вперше про дозрівання ооцитів кролиць *in vitro* повідомили Пінкус і Енземанн в 1935 році. Вони вилучили ооцити кролів з фолікулів і культивували до МІІ в культуральному середовищі [190]. Встановлено значну залежність віку донора і стану ядерного матеріалу ооцитів на ефективність розвитку ембріонів кролів поза організмом. Хоча морфологічна характеристика незрілих ооцитів, отриманих із яєчників багатьох тварин була детально досліджена, на сьогоднішній день, однак, існує необхідність в поглибленому вивченні і вдосконаленні отримання дозрілих ооцитів із яєчників кролиць [70]. Тому, що використання генетичного потенціалу яєчників кролів та вивчення закономірностей проходження мейотичного дозрівання гамет самок в умовах *in vitro* є основою успіхів при клонуванні та створенні трансгенних тварин, що продукують біологічно активні речовини [77]. Хоча як клітини-реципієнти при клонуванні кролів використовують дозрілі *in vivo* яйцеклітини після гормональної обробки самиць, проте синхронізація овуляції гамет

ускладнюється часовими параметрами від 10,5 до 14 год після ін'єкцій ЛГ. Тому існує необхідність удосконалення методу одержання дозрілих *in vitro* яйцеклітин кролів [70, 71]. На сьогоднішній день, немає ніяких детальних досліджень факторів які впливають на цитоплазматичне та ядерне дозрівання ооцитів кролів поза організмом [54]

Перша спроба запліднити яйцеклітини кролів *in vitro* була здійснена Шенком у 1878 році, ці спроби повторювались багатьма дослідниками після нього, проте вони не мали успіху через технічні і методичні причини [202]. Стабільна можливість запліднення *in vitro* яйцеклітин кролів доведена в роботі Чанга у 1959 році [79]. Ним було отримане живе потомство кролів після запліднення поза організмом ооцитів, що овулювали природним шляхом.

В результаті запліднення *in vitro* яйцеклітин кролів, що дозріли поза організмом у ізольованій системі фолікула (інтрафолікулярне дозрівання) Тібальт із співробітниками отримали життєздатне потомство [215, 216, 209].

У 1980–1990-х роках отримано кролів після ядерної пересадки (NT) шляхом введення ембріональних клітин, отриманих із ембріонів на стадії морули-бластоцисти в енуклеювані ооцити [75, 76, 92]. Кролів складніше клонувати відносно інших видів, наприклад у порівнянні з великою рогатою худобою або вівцями. Це викликано швидким клітинним циклом у доімплантаційних ембріонів. В даний час зареєстровано лише декілька випадків успішної пересадки соматичних клітин у кролів [80, 66, 70, 163].

1.2.3. Розвиток ембріонів свиней в умовах *in vitro*

Яєчники свиней містять велику кількість (близько 210 000) примордіальних фолікулів, що вдвічі більше, ніж у корів. Ця кількість яйцеклітин в тисячі разів перевищує фізіологічну потребу тварин протягом всього їх життя [6]. Період статевого становлення у свинок має певні особливості, які дуже тісно пов'язані з ростом, розвитком і функціональною активністю яєчників. Яєчники нестатевозрілих свинок містять різну

кількість фолікулів діаметром 1 – 4 мм. Перед статевою зрілістю більша кількість фолікулів досягає в діаметрі 3 – 6 мм. Частина їх розміщується у глибокій, а більшість – у поверхневій зоні коркового шару. Їх кількість в одному яєчнику досягає 50. Незадовго до статевої зрілості кількість таких фолікулів зменшується до 5 – 6 в одному яєчнику. В дорослих самок у період охоти проходить дуже швидкий ріст третинних фолікулів (до 10 – 20 і більше), які досягають максимальних розмірів [40, 46].

Можливість отримання необхідної кількості біологічно повноцінних нативних ембріонів свиней дозволить вирішувати низку важливих питань відносно впровадження інноваційних клітинних репродуктивних технологій у свинарстві. Не дивлячись на те, що основні підходи до метода розроблені і про народження потомства із ооцитів, що дозріли *in vitro* повідомляється у наукових публікаціях, вихід ооцитів на стадії метафази II залишається низьким, порівняно із результатами, отриманими *in vivo* [136, 17].

Досягнуто значних успіхів при культивуванні поза організмом 2-4-клітинних ембріонів свиней отриманих *in vivo* з яких більше 80 % розвиваються до стадії бластоцисти. Але все ще існують труднощі в заплідненні ооцитів та культивуванні одержаних ембріонів цього виду сільськогосподарських тварин пов'язані з довгим часом їх дозрівання в умовах поза організмом (44 – 48 годин) [136, 18]. Отримання морул-бластоцист свиней *in vitro* після запліднення поза організмом знаходиться на низькому рівні, а життєздатне потомство було отримано лише в декількох лабораторіях. Отримані таким шляхом бластоцисти свиней мають меншу кількість клітин, ніж одержані *in vivo*, а в результаті трансплантації ембріонів свиней одержаних поза організмом відмічено низький рівень супоросності і збільшення числа мертвонароджених поросят [57].

Оскільки ранній ембріональний розвиток є результатом взаємозв'язку між генетичною програмою хромосом ембріону і статевими шляхами самки у ембріонів ссавців, які культивуються *in vitro*, існує «блок» у розвитку. У свиней це 4-клітинна стадія, яка пов'язана з початком синтезу РНК.

Вирішальним чинником для успішного культивування ембріонів поза організмом є склад середовища, який повинен задовольняти потреби клітини у поживних речовинах і відповідати особливостям метаболізму клітин *in vivo* [25, 26, 99].

1.3. Біотехнологічні методи в козівництві

У даний час біотехнологічні методи вже використовуються для отримання достатньої кількості генетично цінних високопродуктивних кіз у розвинених країнах. Але, не всі методи є достатньо ефективними і можуть широко використовуватися у тваринництві. Наразі найчастіше у козівництві застосовується штучне осіменіння, викликання поліовуляції та синхронізація охоти завдяки простоті даних методів, відносно низькій вартості і перевірній ефективності. Застосування даних біотехнологічних методів у козівництві дозволяє проводити контроль над спаровуванням і отримувати потомство незалежно від пори року, що забезпечує виробництво м'яса і молока протягом всього року для стратегічного маркетингу та інших цілей.

Останні досягнення в галузі репродуктивної біотехнології кіз включають в себе удосконалення методів отримання ембріонів поза організмом та спроби трансплантації стовбурових клітин [219]. Отримання ембріонів поза організмом та розробка методів стали можливими завдяки удосконаленню методів відбору ооцитів та розробці методів їх дозрівання *in vitro*. Хоча методи отримання ембріонів *in vitro* мають великий потенціал для більш ефективного поширення цінних тварин, проте, застосування цих технологій обмежене більш вимогливими лабораторними умовами і деякими обмежуючими факторами, що впливають на результат кожної стадії даного процесу [218, 220]

В даний час багато дослідників, що працюють над розробками та застосуванням нових біотехнологічних методів для підвищення рівня репродуктивної здатності кіз. Основними причинами для розвитку

біотехнологічних досліджень кіз є створення трансгенних тварин для поширення корисної генетики, отримання біологічно активних речовин та високої якості молочної і м'ясної продукції (Хамано та ін., 1999) [124, 100]. Трансгенних кіз можна використовувати для виробництва рекомбінантних білків у молоці з метою лікування або профілактики захворювань людини або отримання біоматеріалів для медичного застосування [153].

Розведення кіз у деяких регіонах світу (наприклад, холодних і помірних регіонів), обмежені певний період року, і тому розробка відповідних біотехнологічних методів дозволить отримувати потомство коли необхідно, для отримання високої якості молока, м'яса, шкіри та шерсті протягом року.

Застосування репродуктивної біотехнології кіз допоможе використовувати генетично цінні, але біологічно слабкі сперматозоїди для покращення порід домашніх чи збереження диких видів кіз (Keskintepe ін., 1997) і, таким чином, даватиме можливість отримувати велику кількість ембріонів від однієї генетично цінної тварини [212].

Відомо, що використання ооцитів людини для дослідницьких цілей сильно обмежене. ОКК кіз, завдяки їх розміру та морфологічним особливостям, можна розглядатися в якості унікальних моделей лабораторних тварин для вивчення репродуктивних процесів в організмі людини, що вимагають більш глибокого розуміння механізмів, що лежать в основі біології репродуктивного процесу.

Етапи дозрівання ооцитів кіз та отримання ембріонів *in vitro* дуже схожі на ті, що застосовуються для великої рогатої худоби та овець, але встановлені і їх особливості. Три основні кроки отримання ембріонів кіз поза організмом – це дозрівання ОКК, запліднення дозрілих до метафази II (МІІ) ооцитів *in vitro* свіжоотриманими або заморожено-розмороженими сперматозоїдами та культивування отриманих ембріонів до 7-8 днів для утворення морул або бластоцист, які можна було б пересадити реципієнту або кріоконсервувати для майбутнього використання [73, 83, 88] Про

перше козеня, отримане з *in vitro* ембріона, повідомлено в 1994 (Keskintere ін. 1994) [212].

Розвиток ембріонів *in vitro* напряму залежить від процесів, що відбуваються під час дозрівання в ооциті [196, 211, 104]. В яйцеклітині повинні пройти ядерне та цитоплазматичне дозрівання *in vitro*. Встановлено, що ооцити кіз дозрівають в буферному розчині TCM-199 з додаванням пірувату, інактивованої нагріванням сироватки крові і гормонів (ФСГ, ЛГ, естрадіол) [220, 87]. Але отриманий рівень дозрівання ооцитів кіз поза організмом набагато нижчий ніж при отриманні ооцитів методом *in vivo*, що пов'язано з якістю ооцитів відібраних на культивування [73]. Набагато кращі результати дозрівання ОКК кіз (70 %) були досягнуті при використанні відібраних за морфологічними ознаками ооцитів [60, 145]. Крім того, велике значення для дозрівання ооцитів має час інкубації, та температура в CO₂-інкубаторі. Встановлено, що оптимальною є температура інкубації 38-39°C у зволоженому повітрі за присутності 5 % CO₂ в інкубаторі. Час інкубації, необхідний для дозрівання ооцитів кіз, довший, ніж для ооцитів овець та великої рогатої худоби. Час культивування ОКК кіз повинен тривати 24-27 годин [201]. Так у дослідженнях Рахмана, високий рівень дозрівання було досягнуто за культивування при температурі 38,5° С протягом 27 год [197]. Незважаючи на кількість проведених досліджень, методи відбору та культивування ОКК кіз *in vitro* потребують удосконалення для підвищення їх ефективності. Проведений аналіз наукової літератури підтвердив необхідність проведення досліджень з удосконалення методів культивування ооцитів та ембріонів поза організмом і вивчення особливостей оогенезу та раннього ембріогенезу різних видів сільськогосподарських тварин *in vitro*.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Увесь обсяг лабораторних досліджень проведено у 2007-2015 роках на базі лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця Національної академії аграрних наук України. Дослідження проводились за такою схемою:

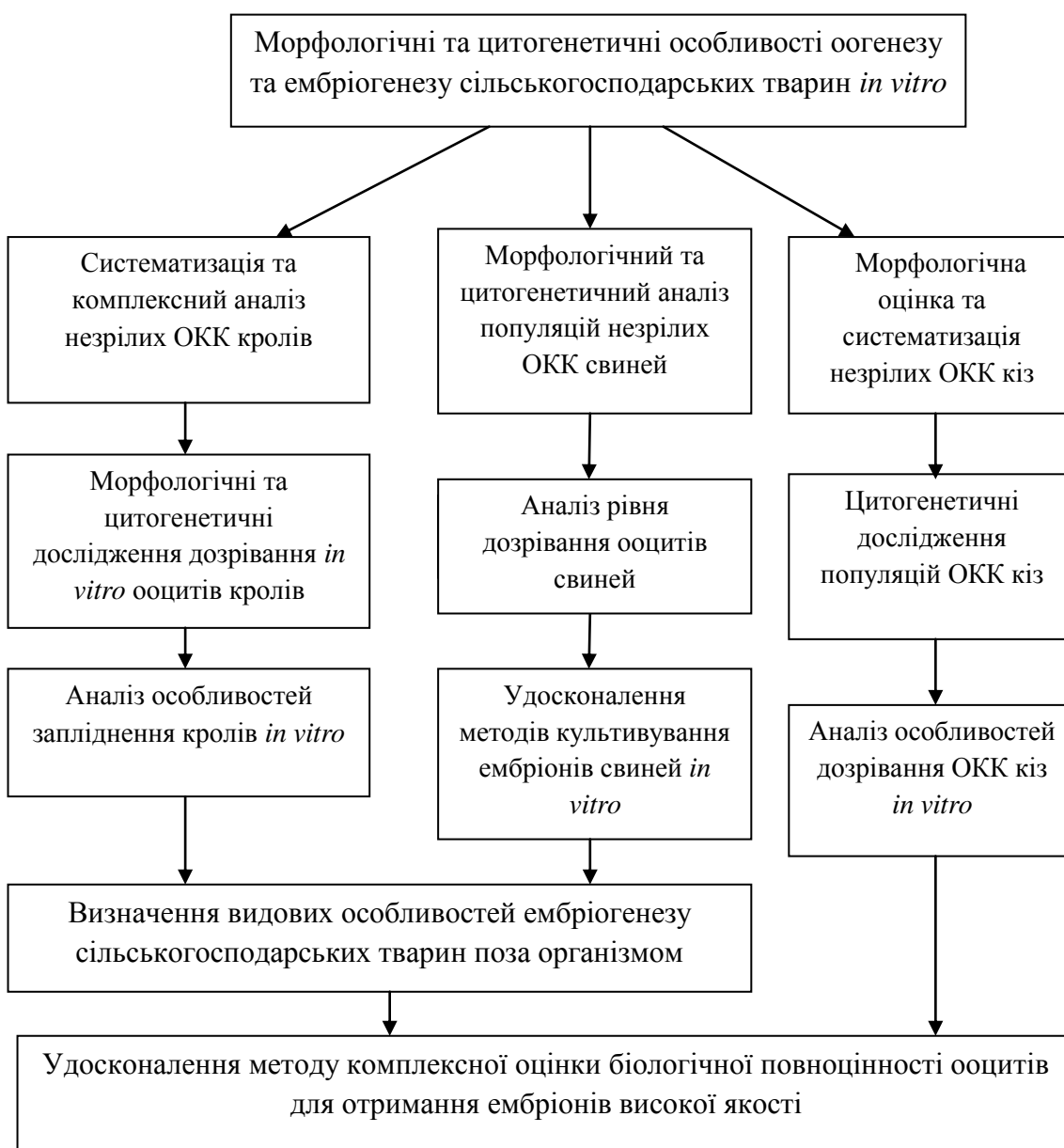


Рис. 2.1. Схема досліджень

2.1. Матеріал для досліджень

У даній роботі досліджено морфологічну структуру гамет і ембріонів трьох видів сільськогосподарських тварин: 2 порід кролів, 3 порід свиней і кіз.

Матеріалом для досліджень слугували ооцит-кумулюсні комплекси (ОКК) кролів, свиней, кіз (табл. 2.1).

Таблиця 2.1.

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 новозеландські червоні	77	1404	351
Свині	СВАТ «Агрокомбінат «Калита» (Київська обл.)	велика біла ландрас миргородська	39	1592	204
Кози	Приватний сектор	зааненська ламанча	12	528	-

Досліджено ОКК кролів порід сірий велетень, метелик та новозеландські червоні.

Порода кролів сірий велетень виведена у 1952 році відтворним схрещуванням місцевих кролів з представниками породи фландр у звірорадгоспі «Петровський» Полтавської області під керівництвом

О. Й. Каплевського. У результаті селекції були збережені велика маса і розмір кролів фландр (вони відрізнялися вагою 5-8 кг і великими розмірами до 75 см), а також поліпшена їх адаптація до клімату України. Основними репродукторами є звірорадгоспи «Петровський» Полтавській області та «Червона поляна» Кіровоградської області.

Кролі породи метелик середніх розмірів з оригінальним забарвленням – на білому тлі вовни вони мають чорні плями різноманітної конфігурації. Свою назву порода отримала за те, що чорні плями на хутрі кролів цієї породи нагадують крила метелика. Кролі породи метелик були виведені в Англії в 1987 році і стали популярними завдяки своєму оригінальному забарвленню. На основі цієї породи були виведені німецькі, французькі Метелики, чехословацький Строкатий, рейнський Строкатий. У нашій країні порода була вдосконалена. У результаті жива маса дорослих кролів досягла 4,3 кг при довжині тулуба близько 55-59 см.

Порода кролів новозеландська червона належить до м'ясо-шкуркової групи кролів. Виведена в США в 1910 році в результаті складного відтворювального схрещування порід бельгійський заєць, фландр і сріблясті. Кролі породи новозеландський червоний мають середню живу масу від 3,5 до 5 кг. Їх довжина тулуба становить 47-50 см, самки крупніші за самців. Відрізняються високою енергією росту в ранньому віці. Використовують їх для вирощування бройлерів, оскільки кроленята під самкою знаходяться до 60-70 днів, після чого їх забивають на м'ясо. У породи кролів новозеландська червона шерстний покрив густий, короткий і жорсткий. Забарвлення шерсті рудувато-жовтий або яскраво вогненно-червоний. Кролі породи новозеландський червоний добре себе почувають в різних кліматичних умовах.

Досліджено ооцит-кумулюсні комплекси та розвиток ембріонів поза організмом свиней двох найпоширеніших на Україні порід: велика біла і ландрас.

Велика біла порода свиней – це одна з найпоширеніших і найстаріших порід. Розповсюджена практично в усіх областях України. Її чисельність у загальній кількості свинопоголів'я України становить близько 90 відсотків. Тривала племінна робота з англійськими великими білими свинями, які використовувались в Україні з кінця XIX століття, вплив акліматизації та годівлі призвели до докорінної зміни їх типу будови тіла. Їх використання для поглинального схрещування у поєднанні з малопродуктивними місцевими свинями, застосування методу складного відтворювального схрещування дало змогу вченим-селекціонерам і виробникам створити фактично нову вітчизняну велика білу породу, яка за багатьма показниками перевищує англійську. В породі виділяють три продуктивних типи: м'ясний, м'ясо-сальний і сальний. Основним типом є м'ясо-сальний або універсальний. Порода характеризується високою відтворювальною здатністю, значним рівнем відгодівельної та м'ясної продуктивності, хорошими адаптаційними якостями в різних природно-кліматичних умовах, придатністю до використання підприємствами з промисловою технологією. За опорос матки народжують 10-14 поросят. За умови доброї годівлі і утримання великі білі свині на відгодівлі досягають живої маси 100 кг за 6-7 місяців.

Нині в Україні другою за чисельністю породою після великої білої є *порода ландрас*. Таку популярність породі ландрас забезпечила не лише м'ясність, а й швидкість досягнення забійних кондицій та висока конверсійна здатність. Свині породи ландрас – одна із стародавніх спеціалізованих беконних порід. Виведені в кінці XIX ст. в Данії на базі місцевих ютландських і острівних свиней та завезених з Англії, Португалії, Індії і Китаю. Ландраси найбільш розповсюджена порода в світі. В Данії це єдина порода свиней. В інших високорозвинутих державах частка ландрасів становить 30-80 %. На базі цієї породи створено популяції бельгійської, французької, американської, канадської, шведської, фінської, української та інших селекцій, які схожі за конституціонально-екстер'єрними особливостями та типом продуктивності.

В нашу країну ландраси завезені з 1957 року в дослідне господарство «Українка» НДІТ Лісостепу і Полісся УРСР. Важливою особливістю українських ландрасів є добра пристосованість до вітчизняних природно-екологічних умов та жорстких технологічних умов промислових комплексів. Крім того, їм характерний доволі високий рівень відтворювальних якостей – за період розведення тварин цієї породи в Україні багатоплідність та інші показники материнської продуктивності зросли на 20-30 %. Так, лише багатоплідність збільшилася з 8 до 10,5 (по кращих стадах до 11,3 голів). Значно зросла збереженість поросят у підсисний період. Основними країнами-імпортерами селекційного матеріалу по породі ландрас в Україну є Великобританія, Данія, Франція, США. При цьому не завжди завезене поголів'я відзначається кращими показниками продуктивності порівняно з вітчизняними ландрасами, поступаючись їм за пристосованістю до вітчизняних умов утримання, годівлі та ветеринарно-епізоотичного стану.

Для збереження генетичного матеріалу автохтонної породи свиней, якою є миргородська порода, досліджували розвиток *in vitro* ОКК, вилучених із яєчників свиноматок миргородської породи.

Миргородська порода свиней чорно-рябої масті, перша порода свиней української селекції, визнана окремою породою у 1940 році. Походить від бурих свиней, що розводилися українськими селянами до початку ХХ століття. Розводилася в Полтавській, Сумській, Чернігівській та Хмельницькій областях. У 1990-х роках поголів'я значно скоротилося через витіснення сучасними гібридами. Миргородська порода створена на базі місцевих поліпшених свиней, які здавна розводилися на Полтавщині й представляли собою відріддя так званих південно-руських коротковухих і довговухих свиней, а також їх помісей. Схрещування цих місцевих свиней із тваринами культурних заводських порід, а саме: беркширською, середньою і великою білою (що мало місце у 1881–1882 роках) було обмеженим з огляду на наявність останніх лише у поміщицьких господарствах.

М'який клімат лісостепової зони України, значна питома маса зелених та соковитих кормів у раціонах дали змогу створити у свиней миргородської породи високу невибагливість, резистентність, стресостійкість і здатність використовувати випас. Після великої білої і української степової білої миргородська порода вважається третьою материнською формою, що широко використовують у системі гібридизації в Україні. Нині основний напрям робіт з даною породою – збереження наявної кількості поголів'я та унікальних властивостей даної породи.

Досліджено також розвиток ооцитів двох поширених на Україні порід кіз: зааненської та ламанча.

Зааненська порода кіз – сама видатна молочна порода серед багаточисельних спеціалізованих порід. Її батьківщина – Швейцарія (район Бернських Альп), назву отримала від Зааненської долини (Зааненталь). Окрім направленої племінної роботи велику роль у формуванні цієї породи відіграли винятково сприятливі екологічні умови. Це є найбільш великі кози у світі. Висота в холці у дорослих кіз досягає 75-77 см, у козлів – 82-85 см. Жива маса самки кози у середньому складає 50-60 кг, а племінних козлів – 70-80 кг, іноді досягає 110 кг. Тулуб у зааненських кіз довгий та широкий, вим'я шаровидне та грушовидне. Кози мають виражений білий окрас. При народженні козенята зааненської породи є вагою біля трьох-чотирьох кілограм. При досягненні віку двох місяців вага кізочок складає 9-10 кг, козликів – 10-12 кг відповідно.

Ця порода кіз невибаглива до їжі та практично не виставляє вимог до умов утримання. Вони здатні використовувати не тільки ліси, степи та луки, але й напівпустинні, пустинні, гірські та навіть високогірні пасовиська. Кози надзвичайно рухливі, легко піднімаються на гірські схили, навіть на похилі стволи дерев, можуть випасатися індивідуально або невеликими стадами. Також, козам цілком вистачає скудних пасовиськ, чого не можна сказати про інших тварин, про тих же корів. Більш того, за ступенем пристосованості до різних кліматичних, у тому числі екстремальних умов, кози значно

випереджають інші види сільськогосподарських тварин та добре розводяться в Україні.

Ламанча – порода молочних кіз, яка відома майже повною відсутністю зовнішньої частини вух. Кози породи Ламанча – середніх розмірів, і виділяються спокійною і тихою вдачею. Порода кіз Ламанча була створена в 1930-их роках в Орегоні, коли схрестили декількох кіз з короткими вухами які мали іспанське та швейцарське коріння. Ламанчі мають чудову молочну продуктивність і є всебічно міцними тваринами, можуть існувати в поганих умовах утримання і не втрачати своєї продуктивності.

2.2. Отримання популяцій ооцитів із яєчників тварин та їх культивування

Для одержання ооцит-кумулюсних комплексів відбирали яєчники від забитих здорових тварин різного віку на різних стадіях статевого циклу. Після забою тварини обережно вилучали яєчники. Щоб зберегти ооцити, які містяться в фолікулах яєчників життєздатними, яєчники поміщали в підготовлений термос. В термос наливали підігріту до +38 °C дистильовану воду чи фізіологічний розчин (0,9 % водний розчин хлориду натрію (NaCl))[105]. Нагріту воду або фізіологічний розчин виливали і яєчники поміщали в порожній і теплий термос. Яєчники доставляли в лабораторію в термосі за температури +30 - +33°C протягом 1,5 – 6 годин [101] . Після доставки в лабораторію яєчники промивали 4 рази у теплому (+37-+38°C) стерильному фосфатно-сольовому розчині Дюльбеко (PBS, Sigma, D 8662) із 0,075 мг/мл канаміцин сульфату [36]. Яєчники відбирали від тварин у різних фазах статевого циклу [141].

Вилучення та постановку на дозрівання, запліднення і подальше культивування здійснювали у стерильних умовах боксу. Температура в боксі підтримувалася на рівні +22 - +25°C. Вилучення ОКК із антральних фолікулів яєчників здійснювали шляхом розсічення фолікулів лезом безпечної бритви в середовищі PBS із 0,075 мг/мл канаміцину сульфату.

Пошук ОКК та їх оцінку здійснювали під світловим мікроскопом МБС-9 при збільшенні в 12-24 рази. Вилучені ОКК 6-разово відмивали в середовищі 199, яке містить 25 мМ буфера Hepes (Sigma, М 2520), 10 % сироватки крові великої рогатої худоби власного приготування і одноразово промивали в середовищі для дозрівання.

Відбір та відмивання ОКК здійснювали на нагрівальному столику за температури $+37^{\circ}\text{C}$. Культивування відібраних ооцитів кролів *in vitro* проводили протягом 24 годин в пластикових чашках Петрі (по 25 – 30 ООК у 1мл) у середовищі для дозрівання – 199 на розчині Ерла (Sigma, М 5017), яке доповнювали 20 % інактивованої нагріванням (56°C , 30 хвилин) еструсної сироватки корів власного приготування, 0,068 мг/мл канаміцин сульфату, 0,11 мг/мл пірувату натрію і 0,1 мг/мл глутаміну. До середовища для культивування обов'язково додавали клітини гранульози у кількості $3-5 \times 10^6$ на 1 мл, які вилучали із антральних фолікулів без ознак атрезії.

Культивування *in vitro* ооцитів свиней проводили в термостаті у чашках Петрі по 50-60 шт. в 2 мл середовища для дозрівання за температури $+38,8^{\circ}\text{C}$ у повітряній суміші з 5 % CO_2 [17] протягом 46 годин.

Для виявлення хромосомних порушень протягом дозрівання ооцитів *in vitro* частину гамет використовували для приготування сухоповітряних препаратів за допомогою модифікованого методу Тарковського [210].

2.3. Підготовка сперматозоїдів до запліднення *in vitro*

Для запліднення *in vitro* використовували свіжоодержані і заморожені сперматозоїди плідників, еякульовані або одержані із придатків сім'яників (епідидимісів) статевозрілих самців [18, 19].

Для запліднення поза організмом ооцитів кролів використовували свіжоотримані епідидимальні сперматозоїди кролів, які вилучали із придатків сім'яників (епідидиміси) у забитих статевозрілих самців. В лабораторію епідидиміси доставляли разом із сім'яниками протягом 2 – 6 годин за

температури $+18 - +25^{\circ}\text{C}$. Сперматозоїди одержували шляхом надрізання епідидимісів лезом безпечної бритви.

Відбір сперматозоїдів проводили методом спливання (swim-up). Використання методу «swim-up» та одноразового центрифугування дає змогу не тільки очистити сперматозоїди, а і відібрати найбільш життєздатні. При цьому застосовується одноразове 15-хвилинне спливання найбільш рухливих сперматозоїдів у флаконах, розміщених під кутом 45° . На дно похилених флаконів (4 – 6 шт.) під 1мл модифікованого середовища Тіроде (TALP) без іонів Ca^{2+} (табл. 2.1) розміщували 0,2 мл суспензії сперматозоїдів. Потім обережно відбирали поверхневий шар середовища. Відібрану суспензію з рухливими сперматозоїдами центрифугували при 3100 об/сек (900 g) протягом 5 хвилин, відбирали рідину до осаду і розбавляли осад свіжим середовищем TALP без іонів Ca^{2+} до концентрації $1 - 5 \times 10^7$ сперматозоїдів/мл. Визначення концентрації сперматозоїдів здійснювали за допомогою камери Горяєва [38]. Підрахунок сперматозоїдів здійснювали на столику мікроскопа за допомогою камери Горяєва при збільшенні у 200 – 400 раз. Сперматозоїди підраховували по діагоналі в 5 великих квадратах сітки (80 маленьких). Кількість клітин в 5 великих квадратах додавали. Враховували лише ті сперматозоїди, головки яких знаходились в межах квадрата. Кількість сперматозоїдів визначали за формулою:

$$X = (N \times P \times 4000 \times 1000) / 80$$

де X — кількість сперматозоїдів у 1 мл, млрд;

N — кількість сперматозоїдів, нарахованих у 5 великих квадратах;

P — розведення сперми;

4000 — коефіцієнт переведення в кубічні міліметри;

1000 — коефіцієнт переведення в мілілітри;

80 — кількість маленьких квадратиків.

Ооцити кролів після дозрівання *in vitro* перед співкультивуванням із сперматозоїдами частково звільняли від клітин кумулюсу піпетуванням.

Дозрілі ооцити свинок самостійно втрачали клітини кумулюсу. Піпетування і 5 – 6-разове відмивання ооцитів після дозрівання виконували в середовищі TALP для відмивання. Сперматозоїди та ооцити спільно інкубували в середовищі TALP-IVF (табл. 2.2) з додаванням суміші ПГЕ (20 мкМ пеніциламіну (Sigma, P 4875), 10 мкМ гіпотаурину (Sigma, H 1384) та 1 мкМ епінефрину (Sigma, E 4250)) протягом 18 годин при концентрації рухливих сперматозоїдів $1,5 - 2,0 \times 10^6$ сперматозоїдів/мл та температурі $38,5^{\circ}\text{C}$ і 5 % CO_2 в атмосфері повітря і pH 7,8.

Таблиця 2.2.

**Склад середовищ для проведення
запліднення яйцеклітин поза організмом**

Компоненти фірми Sigma (номер за каталогом)	мг на 20 мл води		
	TALP без іонів Ca^{2+}	TALP для відмивання	TALP- IVF
1. Хлорид натрію, NaCl (S 5886)	130,9	133,2	133,2
2. Хлорид калію, KCl (S 5405)	4,0	4,76	4,76
3. Гідросульфат натрію, NaHCO_3 (S 5761)	42,0	3,36	41,8
4. Дигідрофосфат натрію, NaH_2PO_4 (S 5011)	0,94	0,94	0,94
5. Лактат натрію, 60 % сироп (L 7900)	11,2	11,2	11,2
6. Хлорид магнію, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (M 2393)	2,0	2,0	2,0
7. Хлорид кальцію, $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (C 7902)	-	4,4	4,4
8. Нерес (H 9136)	24,0	48,0	48,0
9. Феноловий червоний (P 3532)	0,15	0,2	0,2
10. Канаміцин сульфату (P 5530)	1,5	1,5	1,5
11. Піруват натрію (P 5280)	2,2	1,1	1,1
12. БСА (A 6003)	120,0	60,0	60,0
13. Глюкоза (G 7021)	50,0	20,0	-

2.4. Культивування *in vitro* ембріонів

Після сумісного з сперматозоїдами культивування яйцеклітини відмивали у середовище TALP для відмивання 3-5 раз та 2 рази в середовищі для культивування ембріонів. Відмиті від сперматозоїдів зиготи свиней культивували *in vitro* у середовищі NCSU-23 (табл. 2.3) [123, 168].

Таблиця 2.3.

Склад середовища NCSU-23

Компоненти фірми Sigma (номер за каталогом)	мМоль
1. Хлорид натрію, NaCl (S 5886)	108,6
2. Хлорид калію, KCl (S 5405)	4,79
3. Гідросульфат натрію, NaHCO ₃ (S 5761)	25,07
4. Дигідрофосфат калію, KH ₂ PO ₄ ()	1,49
5. Сульфат магнію, MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,19
6. Хлорид кальцію, CaCl ₂ x H ₂ O (C 7902)	1,7
7. Глютамін (G 5763)	1,0
8. Таурин (T 0625)	7,0
9. Гіпотаурин (H 1384)	5,0
10. БСА (мг/мл, A 6003)	4,0
11. Глюкоза (G 7021)	5,55

Для подальшого культивування зиготи кролів переносили в середовище 199 на розчині Ерла 10 % ФСТ і 0,068 мг/мл канаміцин сульфату при 5 % CO₂ в атмосфері повітря.

Культивували зиготи кролів у присутності моношару епітеліальних клітин яйцепроводів корів (ЕКЯК). Відбір та постановку на культивування

ЕКЯК проводили разом із відбором ОКК з яйцепроводу який оточував яєчник з ознаками овуляції. Після звільнення від оточуючих тканин, яйцепроводи промивали в PBS, який містив 0,075 мг/мл канаміцин сульфату. Одержання ЕКЯК проводили з допомогою піпетки Пастера і виконували їх 4-разове промивання в середовищі 199, яке містить 25 мМ буфера HEPES з додаванням 10 % ФСТ і канаміцин сульфату. Кожне промивання розпочинали після осідання клітин у мірній пробірці і відбору середовища (3,5 – 4 мл) до їх осаду. Після останнього осідання залишали суміш клітин об'ємом близько 1 мл, додавали 4 мл середовища для культивування ЕКЯК (199 на розчині Ерла з 10 % еструсної сироватки крові корів і канаміцин сульфату), розпіпетовували і переносили в 4-лунковий пластиковий планшет по 0,5 мл в кожен лунку.

Протягом 48 годин культивування спостерігалася вільна активність ЕКЯК та початок формування моношару прикріплених до дна планшета ЕКЯК. Після відбору неприкріплених епітеліальних клітин яйцепроводів та заміни середовища культивування ЕКЯК на середовище для культивування ембріонів (199 на розчині Ерла з 10 % ФСТ) зиготи культивували *in vitro* протягом 4 – 8-днів.

Стадії розвитку ембріонів аналізували за допомогою морфологічної оцінки їх на цитогенетичних препаратах, виготовлених за модифікованим методом Тарковського з наступним фарбуванням 2 %-ним розчином барвника Гімза.

2.5. Приготування цитогенетичних препаратів ооцитів та ембріонів

Для дослідження хроматину частину гамет використовували для приготування сухоповітряних препаратів за допомогою модифікованого методу Тарковського [210]. Ооцити кролів та кіз переносили в 0,9 % гіпотонічний розчин 3-заміщеного цитрату натрію на 10 – 15 хвилин,

механічно звільняли їх від клітин кумулюсу і фіксували на сухому знежиреному склі сумішшю метанол-оцтової кислоти (3:1).

Фарбування препаратів проводили з використанням 2%-ного розчину барвника Гімза.

Для приготування препаратів ембріони кролів розміщували на 1 – 2 хвилини в 0,8%-му гіпотонічному розчині цитрату натрію і фіксували на сухому знежиреному склі сумішшю метанол-оцтової кислоти (2:1). Препарати фарбували 2 % розчином барвника Гімза та аналізували під світловим мікроскопом.

Для підтвердження морфологічної оцінки під час дозрівання *in vitro* ооцитів свиней та розвитку ембріонів готували цитогенетичні сухоповітряні препарати. Для цього ооцити переносили в 0,26 % гіпотонічний розчин 3-заміщеного цитрату натрію на 10 – 15 хвилин, механічно звільняли їх від клітин кумулюсу і фіксували на сухому знежиреному склі сумішшю метанол-оцтової кислоти у співвідношенні (2:1). Фарбування препаратів проводили з використанням 2 % розчину барвника Гімза. Аналізували препарати ооцитів свиней під світловим мікроскопом.

2.6. Мікроскопування, мікрофотографування, статистична обробка отриманих результатів

Для оцінки морфологічного стану ооцитів і ембріонів використовували світловий мікроскоп МБС-9. Для дослідження цитогенетичних препаратів застосовували мікроскоп «Jenaval» (об. 10х, 90х м. ім., 100х м. ім., ок. 10х).

Фотографували із застосуванням світлових мікроскопів МБС-9, Jenaval та Carl Zeiss із фотовиводом “Axiostar Plus”. Статистичну обробку одержаних даних проводили з використанням критеріїв Ст’юдента та Пірсона χ^2 з використанням Excel 2003 [27].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Морфологічні та цитогенетичні дослідження

формування ембріонів кролів *in vitro*

3.1.1. Цитоморфологічні дослідження ОКК кролиць, одержаних із яєчників на різних фазах естрального циклу

На сучасному етапі розвитку біотехнологічних методів у тваринництві дослідження з удосконалення підходів щодо отримання ембріонів сільськогосподарських тварин поза організмом, клонування, трансгенезу та одержання ембріональних стовбурових клітин проводяться переважно з використанням гамет модельних тварин.

При народженні самки ссавців мають сотні тисяч яйцеклітин. У корі яєчників містяться фолікули на різних стадіях розвитку вони відрізняються розміром, типом і кількістю клітин гранульози [157, 227]. Їх розвиток залежить від рівня гонадотропних гормонів. Розрізняють преантральні та антральні фолікули. Преантральні фолікули поділяються на початкові (primordial) первинні (primary) та вторинні (secondary) [149]. При статевому дозріванні на початку статевого циклу преантральні фолікули розвиваються в антральні, більшість з яких піддається атрезії і дегенерації [139]. Лише деякі з них досягають преовуляторного етапу під дією гонадотропінів [200].

Популяція оогоній в ембріональний період збільшується шляхом мітотичних поділів (кількість яких залежить від виду) до тих пір, поки в оогоніях не починається мейоз і вони перетворюються на ооцити [186]. Максимальна кількість жіночих статевих клітин досягається в момент переходу від мітозу до мейозу [126, 180, 72]. У деяких видів ссавців (корови, вівці, кози) фолікулогенез починається ще до народження, в інших (миші, щури, хом'яки) після народження [191, 192, 174]. До цього часу всі ооцити в яєчниках є первинними ооцитами, які залишаються на цьому етапі до

настання статевої зрілості, коли під час кожного циклу обрані фолікули переходять до овуляції [189].

Ще до народження самки, окремі ооцити гинуть в процесі апоптозу – механізму для скорочення кількості яйцеклітин та фолікулів. Адже самки народжуються з набагато меншою кількістю яйцеклітин, порівняно з максимальною, досягнутою в ході внутрішньоутробного розвитку.

Кількість преантральних фолікулів у яєчниках дуже варіює у різних видів і за оцінками у великої рогатої худоби складає 89 577, у буйволів – 19 819, у овець – 75 642, кіз – 37 646, у людини – 402 000, у котів – 37 853, у свиней – 210 000 і в собак – 47 900 [112, 62, 115, 237, 162, 207, 130, 179, 114].

В якості модельних тварин з метою відпрацювання методології отримання ембріонів в умовах *in vitro* ми вибрали самок і самців кролів – зручний біологічний багатоплідний об'єкт із коротким репродуктивним періодом. [155, 205, 125].

Важливою передумовою отримання ембріонів в умовах *in vitro* є вилучення достатньої кількості повноцінних ооцит-кумулюсних комплексів із яєчників кролиці. Дослідження ооцитів і ембріонів ссавців є основою для фундаментальних і прикладних досліджень в репродуктивній фізіології. Ооцит-кумулюсні комплекси кролів широко використовуються в експериментальних дослідженнях поза організмом. Кролі є одним з видів, в яких овуляція викликається спарюванням, що дозволяє регулювати статеві цикли тварин при проведенні експериментів.

Розмноження кролів значно відрізняється від репродукції інших тварин сільськогосподарського призначення. Для них властиве передчасне статеве дозрівання, велика плодючість, короткий час сукрільності, поєднання лактації з вагітністю. Статева зрілість у кролів великих порід настає у 4-5 міс., а у середніх порід кролів ще раніше – в 3,5 місяці. Але повноцінні статеві цикли відбуваються з 5 місячного віку. Статеві органи кролиці складаються з парних яєчників, яйцепроводів, подвійної матки і піхви. Яєчники локалізуються в черевній порожнині, в районі попереку. В

них і відбувається процес росту і формування яйцеклітин. На функціонування яєчників у кролиць не впливають сезонні періоди. Статева охота у кролиць триває 3-5 діб, повторюючись в теплі сезони року через 5-7 днів, а у прохолодний період – через 8-9 днів. Овуляція (вихід яйцеклітини в яйцепровід) у кролиці настає через 10-12 годин після парування. Збуджена паруванням залоза внутрішньої секреції – гіпофіз починає виділяти гонадотропні гормони, що стимулюють в яєчниках формування доміантних фолікулів і дозрівання яйцеклітин. Під час овуляції фолікули лопаються, вивільняючи від 3 до 9 яйцеклітин із кожного яєчника в просвіт яйцепроводів, де і відбувається запліднення.

У місці розриву фолікулів проходять складні процеси, внаслідок яких утворюється жовте тіло. Воно починає працювати як залоза внутрішньої секреції, виділяючи гормон – прогестерон, який стимулює формування молочної залози, матки, сприяє прикріпленню ембріона до стінки матки. Якщо запліднення не відбувається, функції жовтого тіла знижуються (через 15-20 діб цілком зникають), і в яєчниках знову починається ріст нових фолікулів.

Завданням досліджень було отримання та класифікація ооцит-кумулюсних комплексів із яєчників кролиць на різних фазах естрального циклу.

Ооцит кумулюсні комплекси кролиць (табл. 3.1) вилучені із яєчників на наступних фазах розвитку:

- а) на фазі фолікулярного росту ($n = 6$, рис. 3.1),
- б) з яєчників з ознаками овуляції ($n = 4$, рис. 3.2),
- в) лютеальній фазі ($n = 4$, рис. 3.3).



Рис. 3.1. Яєчники кролиці на фазі фолікулярного росту



Рис. 3.2. Яєчники кролиці з ознаками овуляції



Рис. 3.3. Яєчники кролиці на лютеїновій фазі

Вилучені із антральних фолікулів яєчників кролиць ооцити, залежно від стану кумулюса та ооплазми, розподіляли на чотири групи [106]:

I група – ооцити, оточені щільним багатошаровим кумулюсом, із однорідною невакуолізованою ооплазмою (рис. 3.4);

II група – ооцити, оточені розпушеним шаром кумулюса та однорідною невакуолізованою ооплазмою (рис. 3.5);

III група – ооцити, які частково втратили кумулюс, але з невакуолізованою однорідною ооплазмою (рис. 3.6);

IV група – атретичні, денудовані, з вакуолізованою ооплазмою, тобто ооцити, які непридатні до подальшого розвитку (рис. 3.7)



Рис. 3.4. Ооцит кролиці I-ї групи

Зб. об.10х, ок.10х.



Рис. 3.5. Ооцити кролиці II-ї групи. Зб. об.10х, ок.10х.



Рис. 3.6. Ооцити кролиці III-ї групи. Зб. об.10х, ок.10х.

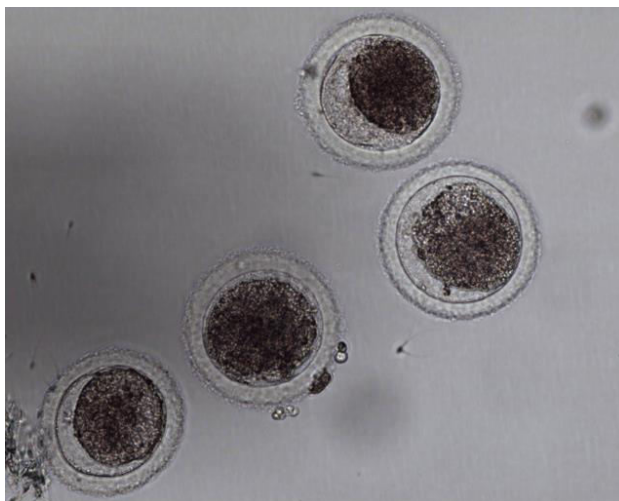


Рис. 3.7. Ооцити кролиці IV-ї групи.

Зб. об.10х, ок.10х.

За кількістю ооцитів із щільним кумулюсом, вилучених на різних стадіях естрального циклу різниці не виявлено, хоча дещо більша їх кількість отримана із яєчників з ознаками овуляції (35,4 %).

Порівняння кількості одержаних ооцитів II групи свідчить про різницю в їх кількості залежно від фаз розвитку яєчників, з яких вони були вилучені, на рівні 7-11,4 %, яка є недостовірною. Найбільшу кількість ооцитів II групи отримано з яєчників на фолікулярній фазі розвитку (36,4 %).

За кількістю ооцитів III групи спостерігалась статистично достовірна різниця ($p < 0,05$) між кількістю клітин одержаних з яєчників на фолікулярній фазі (17,3 %) та фазі з ознаками овуляції (4,2 %). Також спостерігалась статистично достовірна різниця за кількістю ооцитів IV групи, непридатних для подальшого культивування. Так, із яєчників на фазі фолікулярного росту таких гамет було одержано лише 13,6 %, а із яєчників з ознаками овуляції і на лютеїновій фазі 35,4 % і 31,4 % відповідно (табл. 3.1).

Таблиця. 3.1.

**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. В цій та наступних таблицях різні суперскрипти у межах однієї колонки вказують на вірогідну різницю між показниками.

Таким чином, за результатами морфологічного аналізу незрілих ооцитів кролиць встановлено, що найбільшу кількість (86,4 %) ооцитів I, II і III груп, придатних до подальшого розвитку поза організмом, можна одержати з яєчників на фазі фолікулярного росту. Найбільшу кількість у популяціях вилучених ооцитів на всіх стадіях естрального циклу становили ооцити I групи (69 ОКК, що становить 33 %).

Морфологічний та функціональний стан яєчників обумовлює морфологічні ознаки та цитогенетичну характеристику ооцитів, що в них дозрівають. В отриманих на різних фазах естрального циклу ооцит-кумулюсних комплексах ми дослідили стан хроматину шляхом аналізу виготовлених цитогенетичних препаратів.

Результати досліджень показали, що в ооцит-кумулюсних комплексах кролиць, вилучених з яєчників на фолікулярній фазі хоча і не виявлено вірогідної різниці у кількості клітин між групами ооцитів на стадіях мейозу, все ж встановлено, що більша частина гамет всіх чотирьох груп перебувала

на стадії диплотени. Але якщо гамет I-ї групи на стадії диплотени було 88,9 %, II-ї групи – 90 %, III-ї групи – 94,7 %, то в IV-ій групі на даній стадії знаходилось 33,3 % ооцитів. При цьому найбільше гамет (47,4 %), що перебували на стадії дифузної диплотени, коли чітко ідентифікується ядро з ядерцем (рис. 3.8), виявлено серед ооцитів третьої групи, а вірогідно найменший ($P < 0,05$) відсоток гамет – у четвертій (13,3 %).

Найбільший відсоток ооцитів на стадії фібрилярної диплотени відмічено у гамет першої групи – 33,3 %. В четвертій групі спостерігалась вірогідно найбільша кількість клітин (46,7 %, $p < 0,01$) з дегенерованим хроматином (табл. 3.2).

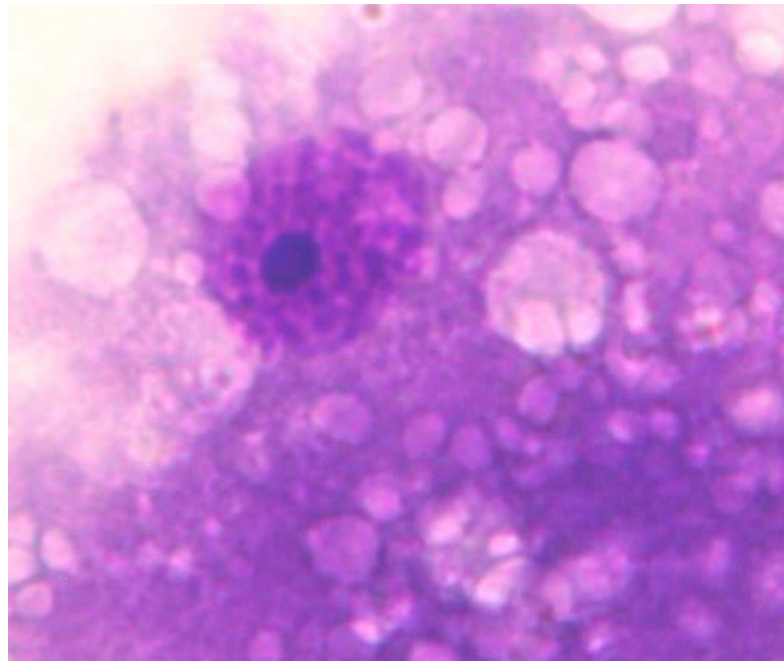


Рис. 3.8. Стадія дифузної диплотени
профази I мейозу ооциту кролиці. Зб. об.100х ок.10х.

Таблиця 3.2.

Цитогенетичний аналіз ооцитів вилучених з яєчників кролиць на фазі фолікулярного росту

Група	Всього ооцитів, n	Кількість ооцитів на стадії мейозу						Дегенерація хроматину, n (%)
		диплотена			діакінез, n (%)	метафаза I, n (%)	метафаза II, n (%)	
		дифузна, n (%)	фібрилярна, n (%)	видимі біваленти, n (%)				
I група	36	14 ^a (38,9±8,1)	12 ^c (33,3±7,9)	6 ^d (16,7±6,2)	1 (2,8±2,7)	1 ^e (2,8±2,7)	0	2 ^g (5,6±3,8)
II група	40	16 ^a (40±7,7)	11 ^c (27,5±7,0)	9 ^d (22,5±6,2)	0	0	1 ^f (2,5±2,5)	3 ^g (7,5±4,2)
III група	19	9 ^a (47,4±11,5)	5 ^c (26,3±10,1)	4 ^d (21,0±9,4)	0	0	0	2 ^g (10,5±7,0)
IV група	15	2 ^b (13,3±8,8)	2 ^c (13,3±8,8)	1 ^d (6,7±6,47)	0	1 ^e (6,7±6,4)	2 ^f (13,3±8,8)	7 ^h (46,7±12,9)

Примітки: a:b, – $p < 0,05$; g:h – $p < 0,01$, критерій Ст'юдента

За результатами цитогенетичного аналізу ооцитів, вилучених із яєчників з ознаками овуляції виявлено, що переважна більшість гамет всіх груп знаходилась на стадії диплотени. Найбільша кількість ооцитів (58,3 %) перебувала на стадії диплотени дифузної в другій групі, а вірогідно найменша ($p < 0,01$) в четвертій групі (5,9 %). Зміна структури хроматину на фібрилярну в I, II та III-й групах відбулась в середньому у 39 % ооцитів, а в IV-й групі лише у 11,8 % (рис. 3.9). З статистично вірогідною різницею ($p < 0,001$) найбільша кількість гамет (47,0 %) з ознаками дегенерації хроматину виявлена в IV-й групі (табл. 3.3).

Аналізом цитогенетичних препаратів ооцитів, вилучених із яєчників кролів на лютеальній фазі встановлено, що найбільша кількість гамет перших трьох груп перебувала на стадії диплотени профазі мейозу. Слід відмітити, що найбільша кількість (50 %) гамет на стадії диплотени дифузної виявлена в I групі, що вірогідно більше ніж в IV групі ($p < 0,01$).

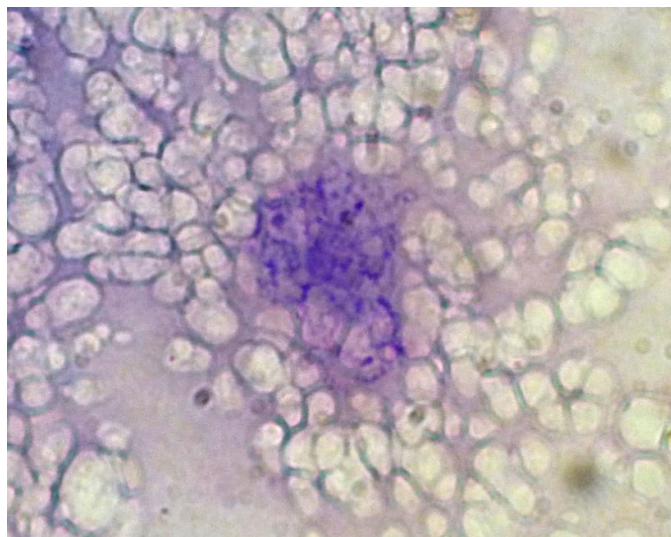


Рис. 3.9. Стадія фібрилярної диплотени профазі I мейозу ооцити кролиці. Зб. об.100х, ок. 10х.

Таблиця 3.3.

**Цитогенетичний аналіз ооцитів вилучених із яєчників кролиць
з ознаками овуляції**

Група	Всього ооцитів, n	Кількість ооцитів на стадії мейозу						Дегенерація хроматину, n (%)
		диплотена			діакінез, n (%)	метафаза I, n (%)	метафаза II, n (%)	
		дифузної, n (%)	фібрилярної, n (%)	видимих бівалентів, n (%)				
I група	17	8 ^a (47,0±12,1)	6 ^c (35,3±11,6)	1 ^d (5,9±5,7)	0	2 ^e (11,8±7,8)	0	0 ^f
II група	12	7 ^a (58,3±14,2)	4 ^c (33,3±13,6)	0	0	0	0	1 ^f (8,3±8,0)
III група	2	1 ^{ab} (50,0±35,4)	1 ^c (50,0±35,4)	0	0	0	0	0 ^{fh}
IV група	17	1 ^b (5,9±5,7)	2 ^c (11,8±7,8)	1 ^d (5,9±5,7)	1 (5,9±5,7)	2 ^e (11,8±7,8)	2 (11,8±7,8)	8 ^g (47,0±12,1)

Примітки: a:b, h:g, – $p < 0,01$, f:g – $p < 0,001$ критерій Ст'юдента

Виявлена також вірогідна різниця і між II та IV групою ($p < 0,05$). Не виявлено вірогідної різниці за кількістю гамет за досліджуваними показниками між групами за перебуванням на стадіях диплотени: фібрилярної та видимих бівалентів (рис. 3.10). Статистично достовірно ($p < 0,001$) найбільше гамет (56,3 %) з дегенерованим хроматином виявлено в IV групі (табл. 3.4).

При порівнянні результатів цитогенетичного аналізу ооцитів, вилучених із яєчників кролиць на різних фазах естрального циклу, встановлено, що незалежно від стану яєчника найбільша кількість ооцитів перебувала на стадії диплотени. Хоча вірогідної різниці не встановлено, найбільшу кількість гамет із хроматином на стадії дифузної диплотени (37,3 %) отримано з яєчників на стадії фолікулярного росту. На стадії фібрилярної диплотени перебувала найбільша кількість гамет, вилучених з яєчників на лютеїновій фазі естрального циклу. На стадії диплотени видимих бівалентів вірогідно більше перебувало гамет, отриманих з яєчників на стадії фолікулярного росту (18,2 %, $p < 0,05$).

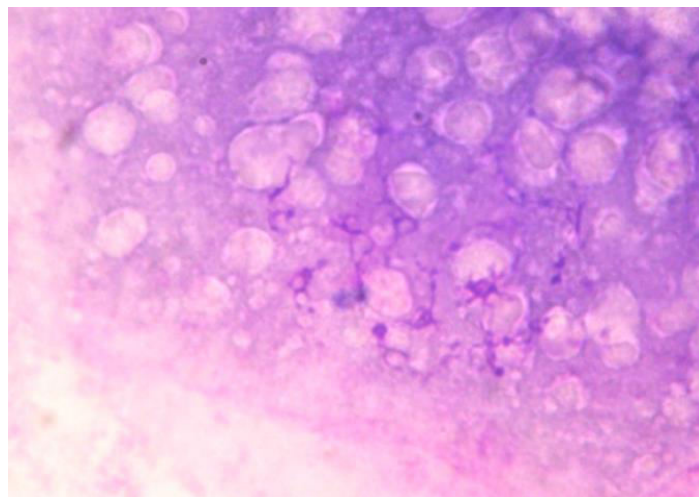


Рис. 3.10. Стадія диплотени видимих бівалентів I мейозу ооциту кролиці. Зб. об.100х, ок. 10х.

Таблиця 3.4.

Цитогенетичний аналіз ооцитів вилучених з яєчників кролиць на лютеальній фазі

Група	Всього ооцитів, n	Кількість ооцитів на стадії мейозу						Дегенерація хроматину, n (%)
		диплотена			Діакі- нез, n (%)	метафаза I, n (%)	метафаза II, n (%)	
		дифузної, n (%)	фібрилярної, n (%)	видимих бівалентів, n (%)				
I група	16	8 ^a (50,0±12,5)	5 ^d (31,2±11,6)	2 ^e (12,5±8,3)	0	0 ^f	0	1 ^h (18,8±9,8)
II група	15	5 ^{ac} (33,3±12,2)	6 ^d (40.0±12,6)	1 ^e (6,7±6,4)	0	2 ^f (13,±8,8)	0	1 ^h (6,7±6,4)
III група	4	1 ^{ab} (25,0±21,7)	2 ^d (50,0±25,0)	0 ^e	0	1 ^f (25,0±21,7)	0	0 ^h
IV група	16	1 ^b (6,3±6,0)	2 ^d (25,0±10,8)	0 ^e	0	3 ^f (18,8±9,8)	1 (18,8±9,8)	9 ^g (56,3±12,4)

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

Слід зазначити, що найбільший відсоток ооцитів з дегенерованим хроматином спостерігався в групі вилученій із яєчників кролиць на лютеальній фазі (утворення жовтого тіла) (21,6 %). На нашу думку це пояснюється тим, що жовте тіло продукує гормон прогестерон, який пригнічує ріст фолікулів і розвиток ооцитів у них [6]. Найменша кількість ооцитів з дегенерованим хроматином виявлена в групі клітин із яєчників на стадії фолікулярного росту (12,7 %).

Результатами проведених досліджень встановлено, що найбільш ефективним є використання ооцитів для проведення біотехнологічних маніпуляцій із яєчників кролиць на стадії фолікулярного росту (табл. 3.5).

Таблиця 3.5.

Цитогенетичний аналіз ооцитів вилучених з яєчників кролиць на різних фазах естрального циклу

Фази естрального циклу	Загальна кількість ОКК, n	Кількість ооцитів на стадії мейозу						Дегенерація хроматину, n (%)
		диплотена			діакінез, n (%)	метафаза I, n (%)	метафаза II, n (%)	
		дифузної, n (%)	фібрилярної n (%)	видимих бівалентів, n (%)				
фолікулярна	110	41 ^a (37,3±4,6)	30 ^b (27,3±4,3)	20 ^c (18,2±3,7)	1 ^e (0,9±0,9)	2 ^f (1,8±1,3)	3 ^h (4,2±2,9)	14 ^g (12,7±3,2)
овуляції	48	17 ^a (35,4±6,9)	13 ^b (7,0±6,4)	2 ^d (4,2±2,9)	1 ^e (2,0±2,0)	2 ^f (4,2±2,9)	2 ^h (4,2±2,9)	9 ^g (18,6±5,6)
лютеїнова	51	15 ^a (29,4±6,4)	15 ^b (29,4±6,4)	3 ^d (5,9±3,3)	0 ^e	5 ^f (5,8±4,2)	1 ^h (2,0±1,9)	11 ^g (21,6±5,8)

Примітки: c:d – p < 0,05; критерій Ст'юдента

3.1.2. Цитоморфологічні дослідження ОКК кролиць, одержаних із яєчників статевозрілих кролиць та в період статевого дозрівання

Відомо, що для отримання найбільшої кількості придатних до дозрівання ооцитів доцільно використовувати яєчники молодих самок на стадії фолікулярного росту. Так, у яєчнику телички під час внутрішньоутробного розвитку налічується сотні тисяч ооцитів на відповідному етапі репродуктивної функції, з латентного стану виходить кілька тисяч первинних фолікулів з них фази вторинного фолікула досягає лише 150-200, а овуляторної фази – лише 3-5. Поява домінантних фолікулів гальмує ріст та дозрівання інших фолікулів. Дві третини фолікулів піддаються атрезії. [6, 224].

Беручи до уваги цей факт, ми дослідили різницю у отриманні ооцит-кумулясних комплексів із яєчників до початку статевого циклу та у статевозрілих кролиць (рис. 3.11).



Рис. 3.11. Яєчники статево зрілої кролиці (один статевий цикл) та яєчники кролиці на стадії статевого дозрівання (до початку статевого циклу).

Для проведення досліджень були відібрані яєчники від кролиць ($n=8$) віком 4 місяці і кролиць віком 11 місяців, які приходили в один раз в охоту

(n=10). Яєчники, вилучені із самок, знаходились на стадії фолікулярного росту.

В результаті вилучення ооцитів з усіх досліджуваних яєчників (n=18) одержано 245 ОКК, при цьому з восьми яєчників кролиць до початку статевого циклу отримали 115 ОКК, а з 10-ти яєчників статевозрілих кролиць – 130 ОКК. Популяції ооцитів залежно від стану кумулюса та ооплазми, розподіляли, як і в попередніх дослідженнях, на чотири групи. Морфологічною оцінкою встановлено, що із яєчників кролиць в період статевого дозрівання отримано ОКК (I-ї – III-ї груп) 88,6 %, а із яєчників статевозрілих кролиць 79,2 % ОКК (табл. 3.6).

Таблиця 3.6.

Морфологічний аналіз популяцій ооцит-кумулюсних комплексів

Група кролиць	Загальна кількість ОКК, n	ОКК придатні до подальшого розвитку <i>in vitro</i> , n (%)			ОКК не придатні до розвитку <i>in vitro</i> , n (%)
		I група	II група	III група	IV група
період статевого дозрівання	115	59 ^a (51,3±4,6)	35 ^c (30,4±4,2)	8 ^d (6,9±2,3)	13 ^e (11,3±2,9)
статевозрілі	130	48 ^b (36,9±4,2)	42 ^c (32,3±4,1)	13 ^d (10,0±2,6)	27 ^f (20,8±3,5)

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

За морфологічною оцінкою встановлено, що з яєчників кролиць в період статевого дозрівання отримано значно більшу кількість ($p < 0,05$) ОКК, які належать до I-ї групи. А клітин IV-ї групи, які є непридатними до культивування *in vitro* з вірогідною різницею ($p < 0,05$), отримано більше із яєчників статевозрілих кролиць.

З отриманих популяцій гамет для подальшого культивування поза організмом використали 55 ОКК із яєчників кролиць в період статевого дозрівання та 82 ОКК із яєчників статевозрілих кролиць.

Решту ооцитів використали для виготовлення цитогенетичних препаратів. В результаті проведеного аналізу цитогенетичних препаратів встановлено найбільша кількість ооцитів з обох груп перебувала на стадії диплотени дифузної мейозу (табл. 3.7).

Таблиця 3.7.

Цитогенетичний аналіз ооцитів вилучених із яєчників кролиць в період статевого дозрівання та статевозрілих

Група кролиць	Загальна кількість ОКК, n	Кількість ооцитів на стадії диплотени, n (%)			Метафази II, n (%)	Дегенерація хроматину, n (%)
		дифузної	фібрилярної	видимих бівалентів		
на стадії статевого дозрівання	60	27 ^a (45,0±6,4)	17 ^b (28,3±5,8)	2 ^c (3,3±2,3)	1 ^d (1,7±1,6)	13 ^e (21,7±5,3)
статевозрілі	48	15 ^a (31,2±6,7)	12 ^b (25,0±6,3)	0 ^c	2 ^d (4,2±2,8)	19 ^f (39,6±7,0)

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

Встановлено вірогідну різницю ($p < 0,05$) між кількістю клітин з ознаками дегенерації хроматину, отриманих від кролиць в період статевого дозрівання і статевозрілих самок. Так в групі клітин, вилучених із яєчників статевозрілих кролиць їх було на 17,9 % більше, ніж серед отриманих із яєчників кролиць, в яких ще не розпочався статевий цикл.

Результатами проведених досліджень встановлено, що в якості донорів ооцитів більш ефективним є використання кролиць на стадії статевого дозрівання, яких ще не розпочався статевий цикл, оскільки із їх яєчників

можна вилучити вірогідно більшу кількість ($p < 0,05$) повноцінних ооцит-кумулясних комплексів, придатних до культивування поза організмом.

3.1.3. Вплив тривалості культивування *in vitro* на ефективність дозрівання ооцитів кролиць

Метою досліджень на даному етапі роботи є визначення оптимальних параметрів часу для дозрівання ооцитів кролиць *in vitro*.

Для цього емпіричним шляхом, виходячи із даних літератури вибрали для культивування ооцитів три параметри часу – 6-ти 12-ти і 24-годинне культивування. Аргументами на користь такого вибору була наступна інформація:

а) тривалість *in vivo* дозрівання ооцитів кролів від введення фолікулостимулюючого гормону до овуляції складає 10 – 12 годин;

б) для одержання клонованих ембріонів кролів, використовувались ооцити, які вилучали через 16 – 20 годин після ін'єкції хоріонічного гонадотропіну людини, рівень активації реконструйованих ембріонів кролів становив лише 4 %. А при використанні ооцитів, які одержували через 20 – 24 години після ін'єкції гормону, рівень активації ембріонів зростав до 52 %.

Після культивування ооцитів протягом 6 годин в умовах *in vitro* і наступним аналізом цитогенетичних препаратів встановлено, що у 53,5 % ооцитів відбулось руйнування цілісності ядерної мембрани і такі клітини перебували на стадії діакінезу і метафази I мейозу. Решта ооцитів кролів залишалась на стадії диплотени (табл. 3.8).

Таблиця 3.8.

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

Час куль- тивування ОКК (год.)	Кіль- кість ооцитів, n	Ооцити на стадії				Ооцитів з дегенерова- ним хрома- тином, 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

Отже, 6-годинне культивування незрілих ооцитів кролів забезпечує лише їх ініціацію до дозрівання *in vitro* тому необхідно продовжити час культивування для досягнення стадії метафази II мейозу та забезпечення цитоплазматичного дозрівання. В наступних дослідженнях час культивування незрілих ооцитів кролів *in vitro* був продовжений до 12 годин.

Аналізом цитогенетичних препаратів встановлено що після 12-ти годинного культивування більша частина ооцитів (42,0 %) перебувала на стадії метафази I (рис. 3.12).

Після культивування ооцитів протягом 24 годин в умовах *in vitro* і наступним аналізом цитогенетичних препаратів встановлено, що рівень дозрівання ооцитів кролів *in vitro* до стадії метафази II мейозу досяг 72 % (рис. 3.13). На стадії диплотени через 24 години дозрівання *in vitro* знаходилось лише 13,9 % гамет.

Кількість ооцитів із хромосомними порушеннями після культивування поза організмом протягом 6, 12 і 24 годин не мала суттєвої різниці (10,3 %, 12 % та 10,8 %, відповідно).

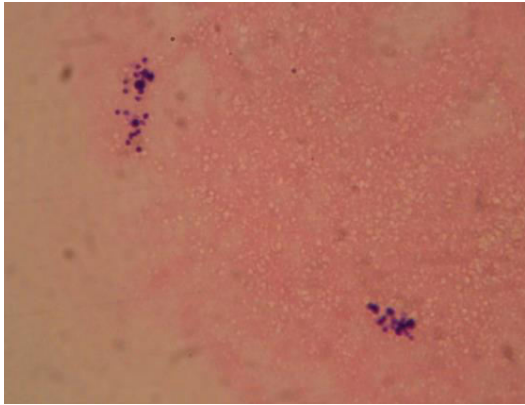


Рис. 3.12. Цитогенетичний препарат ооциту кролиці на стадії М I. Зб. об. 900х, ок. 10х.

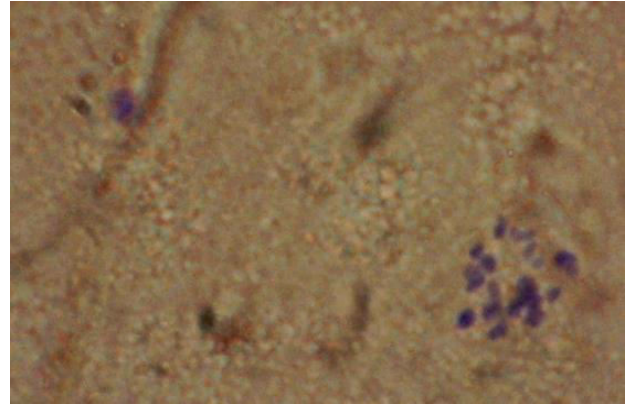


Рис. 3.13. Цитогенетичний препарат ооциту кролиці стадії метафази II мейозу (n хромосом=22). Зб. об. 900х, ок. 10х.

Отже, в результаті проведеного дослідження встановлено, що через 24 години культивування 72 % вилучених з яєчників кролиць ооцит-кумулюсних комплексів у підібраних умовах відновили мейотичні перетворення і досягли М II, таким чином цей часовий термін культивування гамет кролиць можна вважати оптимальним.

3.1.4. Дозрівання *in vitro* ооцитів кролиць різних порід

Для удосконалення методів репродуктивної біотехнології необхідне постійне накопичення наукових даних з експериментальних досліджень щодо процесів дозрівання ооцитів, а також інформації про вплив на ці процеси різних факторів у тому числі і видової чи породної належності. Тому завданням наступного етапу роботи визначено дослідження і порівняння результатів отримання дозрілих ооцитів від кролиць порід сірий велетень і метелик. У кролиць породи сірий велетень відібрано 10 яєчників, з яких вилучено 148 ОКК, у кролиць породи метелик – 12 яєчників із яких отримано 160 ОКК.

З метою відбору найбільш придатних для повноцінного дозрівання незрілих ооцитів *in vitro* здійснили морфологічну та цитогенетичну оцінку незрілих ОКК кролиць обох порід. Вилучені популяції ОКК за морфологічними ознаками розподілили на чотири групи.

Для проведення досліджень ОКК отримували із яєчників на стадії фолікулярного росту. Всього із 22 яєчників кролиць обох порід було одержано 308 ОКК, з яких до I-ї та II-ї груп, тобто найбільш придатних до культивування *in vitro*, віднесли 107 ооцитів що становить 67,2 %. З одного яєчника, в середньому, вилучили 14 ОКК різної якості, з них відібрали близько 10 ОКК придатних до подальшого культивування (рис. 3.14).

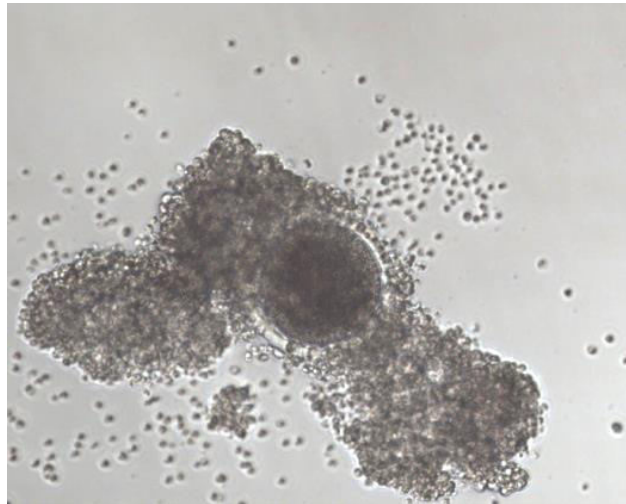


Рис. 3.14. Ооцит-кумулюсний комплекс II-ї групи кролиці породи сірий велетень. Зб. об.10х, ок.10х.

З яєчників кролиць породи метелик вилучено ооцитів I групи, які є придатними до культивування, на 5,4 % більше, ніж у кролиць породи сірий велетень. Достовірна різниця встановлена у кількості ооцитів II-ї групи ($P < 0,01$). Так, із яєчників кролиць сірий велетень отримано 26,4 % ОКК ооцитів із розпушеним кумулюсом (II групи), а з яєчників кролиць породи метелик лише 13,8 % (табл. 3.9).

Таблиця 3.9.

Морфологічна характеристика популяцій ОКК кролиць

Порода	Кількість яєчників, n	Загальна кількість вилучених ОКК, n	Кількість ОКК			
			придатні до культивування <i>in vitro</i>			непридатні до культивування <i>in vitro</i>
			I група, n (%)	II група, n (%)	III група, n (%)	IV група, n (%)
сірий велетень	10	155	66 ^a (42,6±3,9)	39 ^b (25,2±3,4)	24 ^c (15,5±2,9)	26 ^f (16,7±3,0)
метелик	12	160	80 ^a (50,0±3,9)	22 ^c (13,8±2,7)	26 ^e (16,2±2,9)	32 ^f (20,0±3,1)

Примітка: b:c – $p < 0,01$ критерій Ст'юдента.

Відсоток вилучених ооцитів незадовільної якості, непридатних до культивування поза організмом (IV -ї групи) у кролиць породи сірий велетень та породи метелик майже не відрізнявся (17,6 % та 20,0 %).

Для культивування *in vitro*, відібрані 207 ОКК, що були вилучені із яєчників кролиць обох порід, поміщали в середовище ТСМ-199 на розчині Ерла в яке додавали 20 % інактивованої еструсної сироватки корів та клітини гранульози, вилучені з антральних фолікулів без ознак атрезії. Через 24 години культивування *in vitro* 75,2 % ооцитів кролиць породи сірий велетень і 83,3 % ооцитів, вилучених від кролиць породи метелик, відновили мейотичне дозрівання і досягли стадії ядерного дозрівання – метафази II мейозу. Критерієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільца (рис. 3.15).



Рис. 3.15. Ооцит кролиці після культивування *in vitro*
Ідентифіковано перше полярне тіло (стрілка). Зб. об.10х, ок. 10х.

Встановлено, що відсоток ооцитів, які не відновили мейотичне дозрівання, незначний і вірогідної різниці між ооцитами, отриманими від самок порід сірий велетень і метелик не виявлено. Менше 5 % ооцитів зупинило свій розвиток на стадіях діакінезу та метафазі I. Кількість ооцитів з дегенерованим хроматином не перевищила 11 % вилучених у кролиць сірий велетень і 6,9 % у кролиць породи метелик, дана різниця не є вірогідною (табл. 3.10).

Таблиця 3.10.

Ефективність дозрівання *in vitro* ОКК кролиць

Порода	Всього ооцитів	Стадії розвитку ОКК <i>in vitro</i> , n (%)				Ооцитів з дегенерованим хроматином, n (%)
		диплотена	діакінезу	метафаза I	метафаза II	
сірий велетень	105	7 (6,7±2,4)	3 (2,9±1,6)	5 (4,8±2,1)	79 (75,2±4,2)	11 (10,5±2,9)
метелик	102	3 (2,9±1,7)	2 (2,0±1,4)	5 (4,9±2,1)	85 (83,3±3,7)	7 (6,9±2,5)

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про здатність ооцитів, вилучених із яєчників кролиць обох досліджуваних порід, відновлювати мейотичне дозрівання і досягати стадії ядерного дозрівання – метафази II мейозу.

Проведене дослідження морфології і основних цитологічних характеристик ооцит-кумулюсних комплексів, вилучених з яєчників кролиць, адекватно оцінює мейотичну стадію розвитку ооцитів та їх придатність до подальшого розвитку в умовах *in vitro*. В рівні дозрівання *in vitro* ооцитів, вилучених із яєчників кролиць порід сірій велетень і метелик, вірогідної різниці не відмічено (75,2 % і 83,3 %).

3.1.5. Удосконалення середовища для дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів кролиць із застосуванням наноматеріалу

Розвиток сучасних ембріологічних методів та біотехнології відтворення спрямований на здешевлення вартості та зростання ефективності одержання ембріонів *in vitro*. Застосування сучасних технологій та методів дасть змогу не лише раціональніше використовувати генетичний потенціал самиць, а й ефективно реалізовувати завдання сільськогосподарської біотехнології. Тому існує необхідність в удосконаленні методики одержання дозрілих яйцеклітин кролів та формування ембріонів *in vitro*.

Перспективними структурними одиницями для покращення культуральних середовищ є наноматеріали на основі високодисперсного кремнезему [35, 8]. В дослідженнях ми використали наноматеріал, основою якого є високодисперсний кремнезем (ВДК).

Поверхня ВДК організована таким чином, що може заміщати свої гідроксильні групи на різні похідні та біомолекули. Сам кремнезем входить до складу шкіри, хрящів, зв'язок (до 0,01 %), до складу мукополісахаридів (дерматан- і гепарансульфати, ~ 0,04 %), утворюючи ефірні зв'язки, які відіграють роль містків між ланцюгами. Оскільки вміст перехідних металів в організмах незначний, можна зробити припущення, що їх функція повинна

бути зв'язана з каталізмом. Окрім цього, перехідні метали можуть виконувати разом з біомолекулами іншу функцію – переносити електрони, групи атомів і цілі молекули, закріплювати молекули у певній орієнтації, повертати їх, поляризувати, тощо. Поверхня ВДК була модифікована аміновуглеводом D-галактозамін (Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України). Спираючись на функціональні особливості аміновуглеводу (кінцевий агрегат, що з'єднується з рецепторами клітин) можна сподіватись на ефективність використання даного наноматеріалу для удосконалення технології одержання ембріонів поза організмом [7, 8].

Метою даного дослідження є аналіз впливу наноматеріалу ВДК/D-галактозамін у концентрації 0,001 % на ефективність мейотичного дозрівання ооцитів кролів *in vitro*.

В дослідженні використовували ОКК I-ї та II-ї груп, розподіляли популяції ооцитів залежно від стану кумулюса та ооплазми, як і в попередніх дослідженнях. Отримували ОКК із яєчників (n=16) на стадії фолікулярного росту.

Для проведення дослідження вилучені ОКК були розділені на дві групи:

- дослідну, ооцити цієї групи помістили для дозрівання у середовище, що містить ВДК/D-галактозамін в концентрації 0,001 %;
- контрольну, ооцити якої помістили у середовище для культивування без додавання наноматеріалу.

Культивування ооцитів обох груп проводили протягом 24 годин, після закінчення якого приготували цитогенетичні препарати. Аналізом препаратів встановлена вірогідна різниця між досліджуваними групами ооцитів (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Аналіз впливу ВДК/D-галактозаміну 0,001%-ї концентрації на ефективність мейотичних перетворень ооцитів кролиць *in vitro*

Група	Всього ооцитів, n	Стадії розвитку ОКК <i>in vitro</i>				Ооцитів з дегенерацією хроматину, n (%)
		диплотен а, n (%)	діакінез, n (%)	метафаза I, n (%)	метафаза II, n (%)	
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

У контрольній групі відсоток ооцитів, які через 24 години культивування перебували на стадії дозрівання (метафаза II) склав 75,7 %. Число ооцитів на стадії диплотени, діакінезу і метафази I становить 16,8 %, з яких більше половини прокультивованих ооцитів перебували на стадії диплотени

В той же час результати культивування ооцитів дослідної групи показали, що 87,1 % ооцитів досягли стадії дозрівання метафази II. За даними морфологічного та цитогенетичного аналізу рівень дозрівання ооцитів *in vitro* у дослідній групі був на 11,4 % вище, порівняно з контрольною. На інших стадіях ооцитів у дослідній групі зафіксовано 5,8 %, що майже втричі менше, ніж після культивування гамет контрольної групи. Таким чином, очевидним є позитивний вплив ВДК/D-галактозаміну в 0,001 %-й концентрації на мейотичне дозрівання ооцитів кролів *in vitro*.

3.1.6. Порівняльний аналіз одержання зрілих ооцитів кролів методами *in vivo* та *in vitro*

Дослідження з удосконалення методики клонування, трансгенезу та одержання ембріональних стовбурових клітин проводяться переважно з використанням гамет кролів. Це пов'язано з тим, що цей вид тварин є зручним біологічним об'єктом внаслідок короткого репродуктивного циклу і багатоплідності. Тому необхідне удосконалення методики одержання *in vitro* дозрілих яйцеклітин кролів для вивчення генетичних закономірностей проходження мейозу поза організмом.

Метою даного дослідження є порівняння ефективності одержання дозрілих до метафази II ооцитів кролиць за використання методів їх отримання *in vivo* та *in vitro*.

Результати досліджень свідчать, що в середньому з яєчників однієї статевозрілої кролиці можна вилучити від 24 до 35 ОКК, а найбільша загальна кількість незрілих ооцитів, вимитих і придатних для культивування *in vitro*, становила 15 гамет на один яєчник.

Вилучені з яєчників кролиць ооцити культивували *in vitro* протягом 24 годин в термостаті у чашках Петрі по 50-60 шт. в 2 мл середовища за температури +38,8°C у повітряній суміші з 5 % CO₂. Для дозрівання використовували середовище TCM-199 на розчині Ерла, яке доповнювали 20 % еструсної сироватки корів та клітинами гранульози, які вилучали із антральних фолікулів без ознак атрезії.

Яйцеклітини *in vivo* одержували шляхом вилучення у кролиць після поліовуляції, яку викликали внутрішньом'язевою ін'єкцією 100 IU препарату «PMSG» (Serogonadotropin, Biowet) та через 72 години внутрішньовенною ін'єкцією 100 IU препарату «hCG» (Biogonadyl, Biomed). Вимивання яйцеклітин проводили через 18 годин після ін'єкцій, з яйцепроводів після забою тварин. Застосований метод отримання яйцеклітин *in vivo* забезпечив вилучення від однієї кролиці від 11 до 27 яйцеклітин [159].

Проведеною після культивування ооцитів морфологічною оцінкою та подальшим аналізом цитогенетичних препаратів визначено, що через 24 години культивування в підібраних нами умовах 89 % ооцитів кролів відновили мейотичне дозрівання і досягли стадії ядерного дозрівання – метафази II мейозу (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Результати застосування методів *in vitro* та *in vivo* одержання повноцінних ооцитів кролиць

Спосіб отримання	Кількість яєчників, n	Кількість		
		всього ОКК, n	морфологічно нормальні ОКК, які досягли розвитку М II	
			n	%
<i>In vitro</i>	6	64	57	89,0±3,9
<i>In vivo</i>	10	96	85	88,5±3,3

Встановлено, що 88,5 % одержаних *in vivo* і 89,0 % одержаних *in vitro* ооцитів були повноцінними за морфологічними ознаками і перебували на стадії розвитку метафаза II. Порівняння кількості морфологічно нормальних ооцитів, що після культивування досягли розвитку до метафази II, отриманих *in vitro* та *in vivo* вказує на незначну перевагу цього показника у методі *in vitro*.

Таким чином, метод отримання яйцеклітин кролиць, дозрілих в умовах *in vitro*, за якого 89 % ооцитів досягли метафази II, не поступається ефективністю методу отримання дозрілих *in vivo* ооцитів кролиць з використанням гормональної стимуляції.

3.1.7. Формування ембріонів кролів *in vitro*

3.1.7.1. Підготовка епідидимальних сперматозоїдів кролів до запліднення *in vitro*

Дослідженнями українських вчених вже доведена ефективність використання епідидимальних сперматозоїдів бугаїв та кнурів для одержання ембріонів *in vitro*, [19, 20, 21] а в дослідженнях зарубіжних вчених показана можливість ефективного використання епідидимальних сперматозоїдів і у кролів [64].

Метою даних досліджень є визначення рухливості свіжовилучених епідидимальних сперматозоїдів кролів та їх здатності до запліднення ооцитів *in vitro*.

Для запліднення *in vitro* ооцитів, дозрілих поза організмом, використовували свіжоотримані сперматозоїди, які вилучали із хвостової частини придатка сім'яника (епідидимісу) кроля (рис. 3.16, 3.17).



Рис. 3.16. Сім'яник кроля
(епідидиміс стрілка).



Рис. 3.17. Придаток сім'яника (епідидиміс) кроля.

Для розрідження та дослідження рухливості свіжовилучених епідидимальних сперматозоїдів кролів використовували два середовища – «TL MiniTub» (TL Sperm capacitation medium for swin-up, MiniTub – 1990/0020) та «TALP Ca^{2+} free». Зберігання розріджених епідидимальних гамет кролів проводили за температури $+38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ у продовж 18 годин (рис. 3.18).

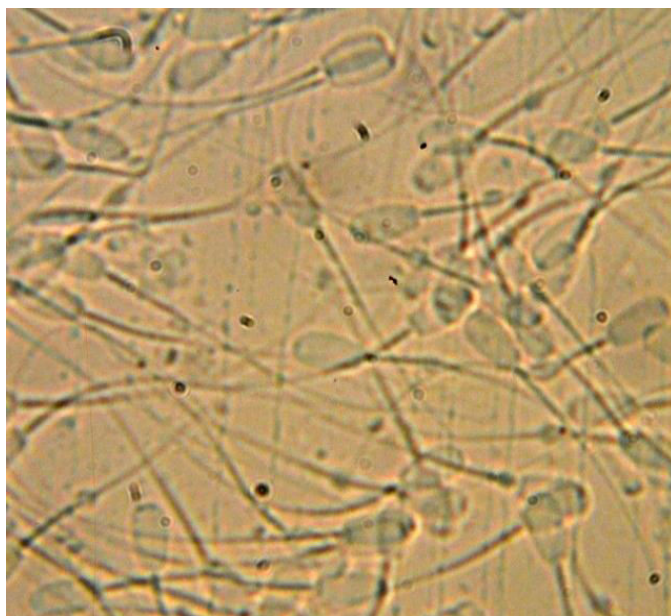


Рис. 3.18. Свіжоотримані епідидимальні сперматозоїди кроля
Зб. об.25х, ок.10х.

Епідидимальні сперматозоїди вилучали із сім'яників шести самців. Епідидимальні сперматозоїди проявляли рухливість в обох використаних середовищах, однак у середовищі в «TL MiniTub» їх активність оцінювалась на рівні 30 %, а в «TALP Ca²⁺ free» на рівні 20 %. Після перебування сперматозоїдів у середовищах протягом 30 хв. відбулося підвищення активності гамет в середньому на 10 %. Найкращий рівень рухливості спостерігався з 2-ї до 3-ї години перебування у даних середовищах. Починаючи з 3-ї години 30 хвилин активність сперматозоїдів почала поступово знижуватись (рис. 3.19).

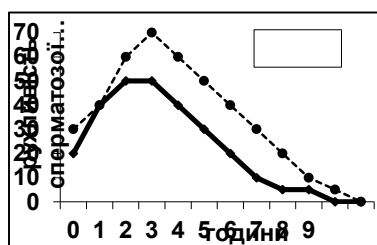


Рис. 3.19. Рухливість епідидимальних сперматозоїдів кролів.

Дані дослідження показали збереження активності епідидимальних сперматозоїдів кролів в середньому на рівні 40 % у продовж 4 годин, в обох використаних нами середовищах.

Доведено, що отриманню високого рівня дроблення ембріонів перешкоджає велика кількість зайвих активних сперматозоїдів у середовищі, де відбувається запліднення *in vitro*. Проникнення кількох сперматозоїдів до яйцеклітини призводить до поліспермного запліднення. Внаслідок цього при формуванні ембріона утворюється додаткова кількість веретен поділу, що призводить до патологічного дроблення зигот *in vitro* і їх дегенерації. Під час

природного запліднення у ссавців кількість сперматозоїдів, яка доходить до яйцеклітини, контролюється анатомічною будовою і фізіологією статеві системи [137]. Поза організмом знизити кількість багаточисельної пенетрації сперматозоїдами яйцеклітини можливо шляхом зменшення до мінімуму кількості сперматозоїдів, або скороченням часу сумісної інкубації гамет поза організмом (рис. 3.20).

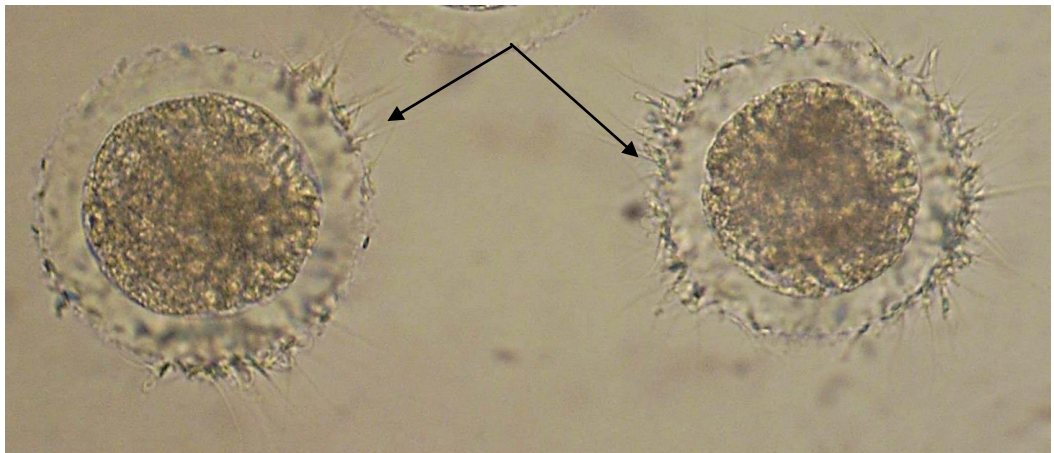


Рис. 3.20. Ооцити кролиць, оточені сперматозоїдами кроля
Зб. об.10х, ок. 10х.

З метою розробки ефективного методу отримання ембріонів кролів поза організмом ми намагалися знизити рівень поліспермно запліднених яйцеклітин кролиць, змінюючи концентрацію свіжоотриманих епідидимальних сперматозоїдів кроля в середовищі запліднення без зміни часу сумісної інкубації гамет *in vitro* (18 год.). Підготовку та відбір життєздатних сперматозоїдів проводили методом спливання або "*swim-up*". Даний метод ефективно використовується для відсорткування рухливих життєздатних сперматозоїдів [138].

На дно похилених флаконів до 1мл модифікованого середовища TALP без іонів Ca^{2+} додавали 0,2 мл вилученої суспензії сперматозоїдів з наступним відбором поверхневого шару. Відібрану суспензію рухливих гамет центрифугували при 3100 об/сек (900g) протягом 5 хвилин. Відібрані

епідидимальні сперматозоїди та ооцити спільно інкубували в середовищі TALP-IVF з додаванням суміші ПГЕ (20 мкМ пеніциламіну, 10 мкМ гіпотаурину та 1 мкМ епінефрину) упродовж 1 години [98].

Для дослідження впливу концентрації сперматозоїдів на рівень запліднення *in vitro* вибрали три концентрації:

- 0,10 млн/мл;
- 0,50 млн/мл;
- 1,50 млн/мл.

Результати досліджень показали, наявність різниці у кількості зигот після культивування у середовищі з різною концентрацією сперматозоїдів (табл. 3.13).

Таблиця 3.13.

Влив концентрації сперматозоїдів кроля на рівень поліспермного запліднення яйцеклітин кролиць *in vitro*

Концентрація сперматозоїдів, млн./мл	Кількість запліднених яйцеклітин	Рівень запліднення, n (%)	Кількість зигот, n (%)	
			з двома пронуклеусами	три і більше пронуклеуси
0,10	70	46 ^a (65,7 ± 5,7)	38 ^b (54,3 ± 6,0)	8 ^c (11,4 ± 3,8)
0,50	60	41 ^a (68,3 ± 6,0)	29 ^b (48,3 ± 6,5)	12 ^c (20,0 ± 5,1)
1,50	50	36 ^a (72,0 ± 6,3)	12 ^{cd} (24,0 ± 6,0)	24 ^{fg} (48,0 ± 7,0)

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

Результати досліджень показують, що при використанні різних концентрацій епідидимальних сперматозоїдів кроля (рухливість на рівні 10 балів) можна отримати високий відсоток запліднених гамет (65,7 – 72 %). При внесенні у середовище для запліднення сперматозоїдів у концентрації 1,5 млн. в 1 мл рівень моноспермії у запліднених яйцеклітинах виявлений

значно нижчий, порівняно з меншими концентраціями. При цьому поліспермно запліднених зигот виявлено на рівні 48 %. Найвища кількість моноспермно запліднених клітин була у середовищі з концентрацією 0,10 млн./мл сперматозоїдів (54,3 %), що дозволило отримати найвищий рівень дроблення. Зі збільшенням концентрації сперматозоїдів у середовищі для запліднення збільшувалась і кількість яйцеклітин з трьома і більше пронуклеусами – з 11,4 % до 48,0 %, а отже знижувалися відсотки дроблення і розвитку ембріонів (рис. 3.21).

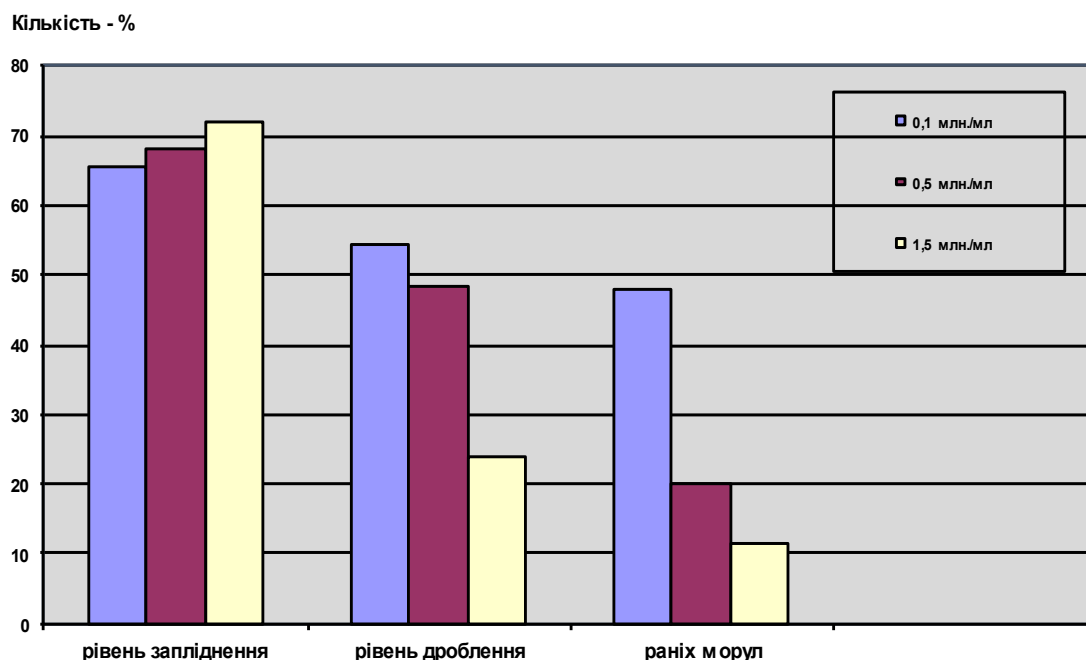


Рис. 3.21. Вплив концентрації сперматозоїдів на кількість ембріонів кролів отриманих поза організмом.

Таким чином, встановлено, що рівень моноспермно запліднених *in vitro* зигот є найвищим при концентрації сперматозоїдів 0,10 млн./мл (54,3 %), отже дана концентрація є оптимальною для запліднення поза організмом ооцитів кролиць.

3.1.8. Формування *in vitro* ембріонів з ооцитів, отриманих із яєчників статевозрілих кролиць та в період статевого дозрівання

Наступним завданням досліджень є аналіз ефективності одержання ембріонів кролів *in vitro* з використанням ооцитів, отриманих із яєчників статевозрілих кролиць та в період статевого дозрівання.

В результаті культивування в умовах *in vitro*, відібраних нами в попередніх дослідженнях, 55 ОКК із яєчників кролиць в період статевого дозрівання та 82 ОКК із яєчників статевозрілих кролиць, отримано відповідно 47 і 62 яйцеклітини дозрілі поза організмом. Середній рівень дозрівання – 80,5 %. Запліднювали отримані яйцеклітин, свіжовилученими епідидимальними сперматозоїдами кроля. Підготовку та відбір життєздатних сперматозоїдів проводили методом "*swim-up*".

Ембріони розвинулись в обох досліджуваних групах, але із суттєвою різницею в рівні дроблення (табл. 3.14).

Таблиця 3.14.

Рівень формування ембріонів кролів

Кролиці	Запліднених ооцитів, n	Кількість ембріонів		Нероздро- блених зигот, n (%)
		2-4 клітин- них, n (%)	ранніх морул, n (%)	
період статевого дозрівання	47	32 ^a (68,1±6,7)	11 ^c (23,4±6,1)	4 ^d (8,5±4,0)
статевозрілі	62	29 ^b (46,8±6,3)	13 ^c (20,9±5,1)	20 ^e (32,3±5,9)

Примітки: a:b – $p < 0,05$; d:e – $p < 0,001$, критерій Ст'юдента.

Морфологічним та цитогенетичним аналізом встановлено, що у групі ооцитів, отриманих від кролиць в період статевого дозрівання формування 2-4-х клітинних ембріонів становив 68,1 %, а в групі гамет від статевозрілих кролиць лише 46,8 % ($p < 0,005$) (рис. 3.22, 3.23, 3.24).



Рис. 3.22. Зажиттєве фото 2-клітинних ембріонів кролів, сформованих *in vitro*. Зб. об.10х, ок. 10х.



Рис. 3.23. Зажиттєве фото ембріонів кролів, сформованих *in vitro* на стадії морули. Зб. об.10х, ок. 10х.

За рівнем розвитку ембріонів до стадії ранньої морули вірогідної різниці між групами не виявлено, але більший відсоток ембріонів на доімплантаційній стадії отриманий в групі ОКК кролиць в період статевого

дозрівання – 23,4 % і 20,9 %, відповідно. Відмічена вірогідна різниця між досліджуваними групами в кількості зигот, які не подолали блок дроблення ($p < 0,005$). У групі ооцитів, вилучених із яєчників статевозрілих кролиць нероздробленими залишилось на 23,8 % більше зигот.

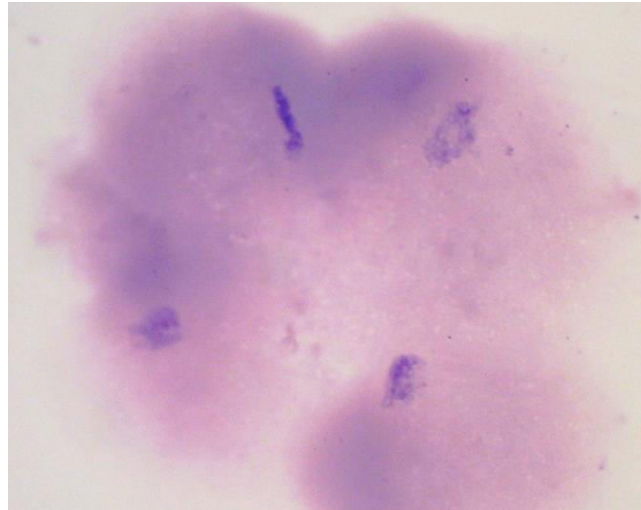


Рис. 3.24. Цитогенетичний препарат 4-х клітинного ембріона кроля, одержаного *in vitro*. Зб. об.100х, ок. 10х.

Встановлено, що для отримання ембріонів поза організмом доцільніше використовувати яєчники кролиць в період статевого дозрівання, що забезпечує отримання 68,1 % двоклітинних ембріонів, з яких 20,9 % розвинулись в морули.

3.1.9. Отримання *in vitro* ембріонів кролів порід сірий велетень та метелик

Для отримання ембріонів та підтвердження повноцінності дозрівання ооцитів кролиць порід сірий велетень та метелик проводили запліднення *in vitro* свіжовилученими епідидимальними сперматозоїдами кролів. Сперматозоїди вилучали із хвостової частини придатка сім'яника (епідидимісу) кролів. В дослідженні використали шість сім'яників самців породи метелик (три самці) та шість сім'яників – породи сірий велетень (три

самці). Рухливість свіжовилучених епідидимальних сперматозоїдів кролів породи метелик становила 40 %, а в кролів породи сірий велетень – 20 %.

Зберігання розріджених епідидимальних гамет кролів проводили за температури +20°C. Після перебування сперматозоїдів у середовищі «TALP Ca²⁺ free» протягом 15 хв. відбулося підвищення активності гамет в середньому на 28,5 % із збереженням такого рівня упродовж 2 годин. Починаючи з 3-ї години активність сперматозоїдів поступово знизилась до 5 %. Вживаність сперматозоїдів кролів обох порід тривала до 9 годин (рис. 3.24).

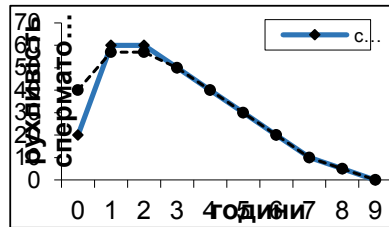


Рис. 3.24. Рухливість епідидимальних сперматозоїдів кролів порід сірий велетень та метелик.

Для запліднення, після 24-х годинного дозрівання *in vitro*, відібрали 85 ооцитів кролів породи метелик та 79 ооцитів кролиць породи сірий велетень. Перед співкультивуванням із сперматозоїдами їх звільняли від клітин кумулюсу піпетуванням. Розміщали по 5-7 клітин в краплини середовища для запліднення, які вкриті мінеральною олією. Для інкубування сперматозоїдів та ооцитів використовували середовище TALP-IVF з додаванням суміші ПГЕ (20 мкМ пеніциламіну, 10 мкМ гіпотаурину

та 1 мкМ епінефрину). Сумісне культивування гамет відбувалось протягом 18 годин за температури 38,5°C і 5 % CO₂ у повітрі.

В результаті проведених досліджень встановлено, що із 85 ооцитів кролиць породи метелик після спільного культивування з епідидимальними сперматозоїдами самців цієї ж породи відбулось запліднення у 78,8 % (67 із 85), а із 79 ооцитів вилучених із яєчників кролиць породи сірий велетень зигот отримано 89,9 % (71 із 79) (рис. 3.25).

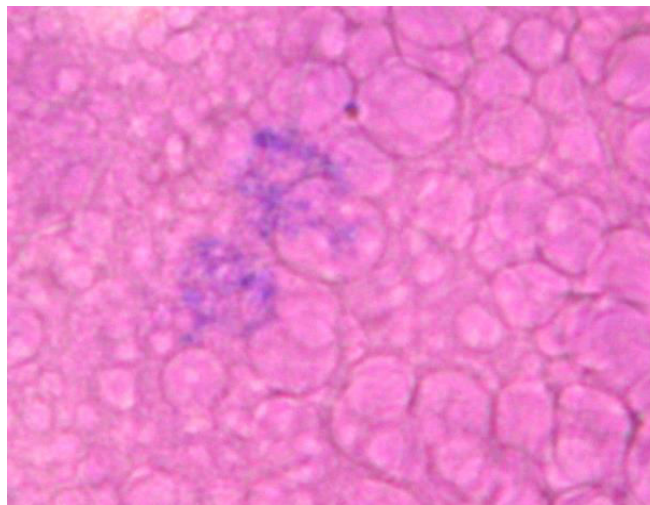


Рис. 3.25. Цитогенетичний препарат зиготи кролів на стадії двох пронуклеусів. Зб. об.100х, ок. 10х.

Рівень формування *in vitro* 2–4-х клітинних ембріонів за використання дозрілих *in vitro* ооцитів та свіжовилучених епідидимальних сперматозоїдів кролів породи метелик досяг 49,3 % а сірий велетень 46,6 %, проте отримана різниця була статистично не вірогідна.

До стадії ранньої морули розвинулося 31,3 % зигот кролів породи метелик і 26,7 % зигот кролів породи сірий велетень. Вірогідної різниці між рівнем формування зигот і кількістю ембріонів, отриманих поза організмом з використанням гамет кролів порід метелик та сірий велетень не встановлено (табл. 3.15) (рис. 3.26, 3.27).

Таблиця 3.15.

**Одержання ембріонів *in vitro*
за використання ооцитів кролів різних порід**

Порода кролиць	Зигот, n (%)	Кількість, n (%)		Нероз-дроблених 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)

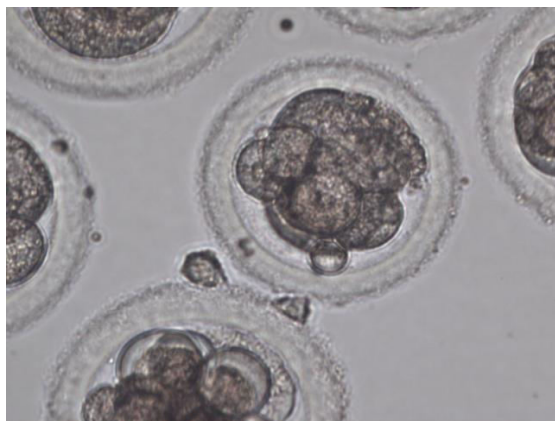


Рис. 3.26. Зажиттєве фото сформованих *in vitro* ембріонів кролів, на стадії компактизації морули. Зб. об.10х, ок. 10х.

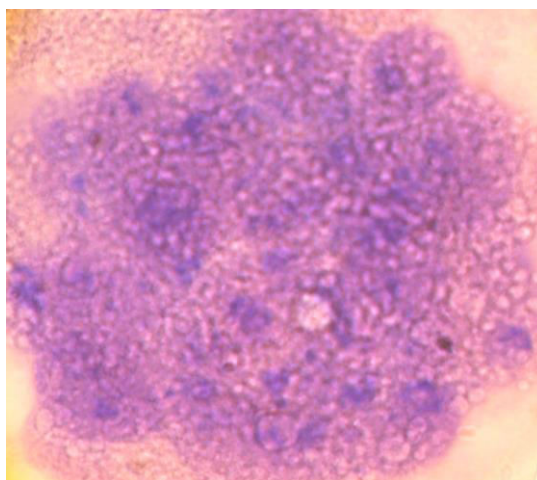


Рис. 3.27. Цитогенетичний препарат морули, отриманої *in vitro* (n=31). Зб. об.100х, ок. 10х.

Таким чином, в умовах *in vitro* отримано повноцінне запліднення ооцитів свіжовилученими епідидимальними сперматозоїдами кролів порід метелик та сірий велетень. Вірогідної різниці за кількістю ембріонів, які розвинулись до передімплантаційних стадій в умовах *in vitro*, між породами кролів порід метелик та сірий велетень не встановлено.

Отже, породна приналежність в кролів на ембріогенез поза організмом не впливає, кролиць різних порід можна ефективно використовувати, як донорів ооцитів для біотехнологічних досліджень та в програмах збереження генофонду сільськогосподарських тварин.

3.1.10. Розвиток ембріонів кролів із яйцеклітин, отриманих *in vitro* та *in vivo*

Для підтвердження повноцінності яйцеклітин кролів отриманих *in vitro* та *in vivo* здійснювали їх запліднення поза організмом і оцінювали рівень дроблення та розвитку ембріонів *in vitro*.

Для запліднення поза організмом відібрали 57 яйцеклітин дозрілих *in vitro* та 85 яйцеклітин отриманих *in vivo*. В результаті проведеного *in vitro* запліднення отримано 38 зигот (66,7 %) на стадії про нуклеусів у групі клітин отриманих *in vitro* та 59 зигот (69,4 %) у групі клітин дозрілих *in vivo*.

Використання дозрілих *in vivo* ооцитів кролиць забезпечило формування ембріонів на рівні 50,8 %. Рівень дроблення ембріонів за умови використання ооцитів, що дозрівали *in vitro* був значно вищий і становив 68,4 %.

Сформовані 2-х клітинні ембріони за морфологічною оцінкою та аналізом цитогенетичних препаратів повноцінні і придатні до подальшого розвитку (рис. 3.28, 3.29).

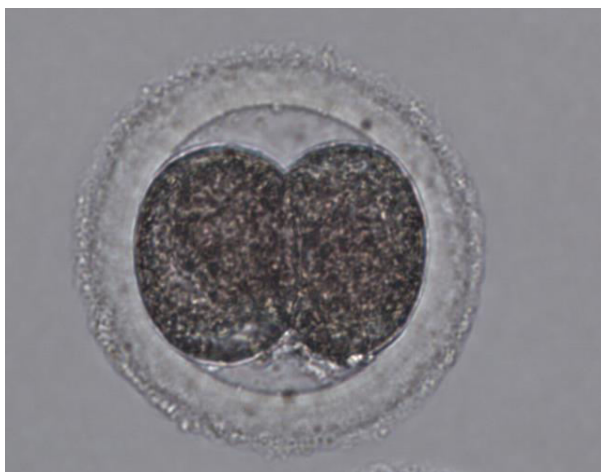


Рис. 3.28. Зажиттєве фото двоклітинного ембріона кроля, сформованого *in vitro*. Зб. об.10х, ок. 10х.

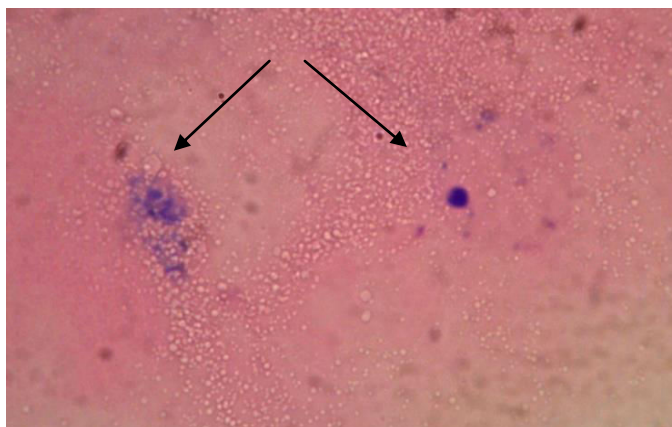


Рис. 3.29. Цитогенетичний препарат двоклітинного ембріона кроля, отриманого *in vitro* (стрілками вказані ядра). Зб. об.100х, ок. 10х.

Таблиця 3.16.

Рівень розвитку ембріонів кролів поза організмом із яйцеклітин отриманих *in vitro* та *in vivo*

Спосіб отримання яйцеклітин	Зигот, n	Кількість ембріонів		Нероздроблених зигот, n (%)
		2-4 клітинних n (%)	ранніх морул, n (%)	
<i>in vitro</i>	38	26 ^a 68,4±7,5)	6 ^b (15,8±5,9)	6 ^c (15,8±5,9)
<i>in vivo</i>	59	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

На п'ятий день розвитку поза організмом до стадії ранньої морули (рис. 3.30) розвинулося 15,8 % ембріонів кролів одержаних при використанні яйцеклітин отриманих *in vitro* та 13,6 % одержаних за умови використання яйцеклітин отриманих *in vivo*.



Рис. 3.30. Зажиттєве фото сформованої в умовах *in vitro* морули кроля. Зб. об.10х, ок. 10х.

Встановлено вірогідну різницю у кількості зигот в яких утворилися пронуклеуси, але не відбулось дроблення. Серед зигот отриманих за умови використання яйцеклітин отриманих *in vitro* їх лише 15,8 %, а серед зигот одержаних з яйцеклітин отриманих *in vivo* – 35,6 % ($P < 0,05$).

Отже, використання дозрілих *in vitro* ооцитів кролиць забезпечує ефективне формування ембріонів *in vitro* на рівні 68,4 %, що підтверджує їх повноцінність.

3.1.11. Вплив на ефективність формування ембріонів кролів ВДК/D-галактозаміну та ВДК t°C200

Для запліднення *in vitro* відібрали 88 ооцитів після дозрівання поза організмом з дослідної групи, в якій у середовище для дозрівання додавали 0,001 % ВДК/D-галактозаміну та 81 ооцит з контрольної групи які дозрівали в стандартному середовищі та свіжоотримані епідидимальні сперматозоїди кроля.

Встановлено, що в результаті проведеного запліднення *in vitro* у дослідній групі (з додаванням 0,001 % ВДК/D-галактозаміну) відбулось запліднення і утворилися пронуклеуси у 63,6 % клітин, а в контрольній (без додавання 0,001 % ВДК/D-галактозаміну) групі запліднилось на 7 ооцитів (на 1,4 %) менше, ніж у дослідній, дана різниця між показниками не є статистично вірогідною.

Рівень дроблення у обох групах в середньому склав 52,1 %, що свідчить про повноцінність дозрівання ооцитів поза організмом. Хоча рівень дроблення суттєво не відрізнявся між порівнюваними групами, але вищий відсоток спостерігався в дослідній групі з 0,001 % ВДК/D-галактозаміну, що свідчить про його позитивний вплив на мейотичні перетворення ооцитів кролиць *in vitro*.

За результатами аналізу подальшого розвитку *in vitro* ембріонів на п'ятий день культивування до стадії ранньої морули розвинулось 17 % ембріонів з дослідної групи і 14,8 % контрольної групи (табл. 3.17).

Таблиця 3.17.

Вплив ВДК/D-галактозаміну в концентрації 0,001 % на ефективність формування ембріонів кролів *in vitro*

Група	Запліднено ооцитів, n	Кількість, n (%)		
		зигот	2 – 4-клітинних ембріонів	морул
контрольна	81	52 (64,2 ±5,3)	42 (51,9±5,3)	12 (14,8±3,9)
дослідна	88	56 (63,6±5,1)	46 (52,3±5,3)	15 (17,0±4,0)

Примітка: культивування до стадії морул відбувалося в одному досліді

Результати морфологічного аналізу одержання ембріонів *in vitro* доповнювали цитогенетичним аналізом яйцеклітин, з яких не відбулося формування ембріонів.

Після 24 годин культивування у створених нами умовах поза організмом певний відсоток запліднених яйцеклітин не долає блоку дроблення для переходу до розвитку ембріонів. Однак число сформованих у запліднених яйцеклітинах пронуклеусів вказує на забезпечення умов середовища для одержання ембріонів *in vitro*.

Цитогенетичний аналіз препаратів отриманих ембріонів кролів підтвердив повноцінність ядер із ядрцями тих ембріонів, які і за візуальною морфологічною оцінкою були нормальними (рис. 3.31, 3.32).



Рис. 3.31. Зажиттєве фото ембріона кроля, отриманого *in vitro*. Зб. об.10х, ок. 10х.

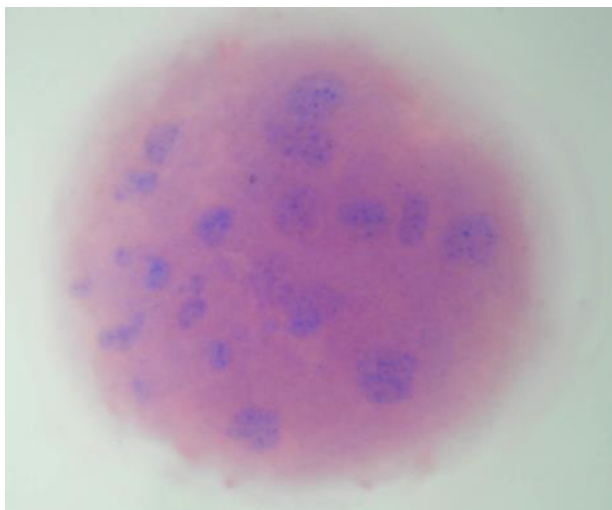


Рис. 3.32. Цитогенетичний препарат морули кроля, сформованої *in vitro* з морфологічно нормальними ядрами (n ядер = 19).
Зб. об.100х, ок. 10х.

Таким чином, встановлено, що додавання концентрації 0,001 % вищевказаного наноматеріалу у середовище для культивування *in vitro* ОКК кролиць забезпечує формування зигот на рівні 63,6 %, що є на 0,6 % меншим показником, ніж у контрольному середовищі без додавання даного наноматеріалу, але дана різниця не є вірогідною. В процесі розвитку ембріонів кількість 2 – 4-клітинних ембріонів і ранніх морул у дослідному середовищі була вищою на 0,4 % і 2,2 % відповідно.

Отже, додавання ВДК/D-галактозаміну в концентрації 0,001 % у середовище для культивування *in vitro* ОКК кролиць не має негативного впливу на рівень запліднення і розвиток ембріонів кролів в умовах *in vitro*.

Одержання біологічно повноцінних ембріонів сільськогосподарських тварин поза організмом, порівняно з їх формуванням у статевих шляхах самок, не завжди є на високому рівні. Ефективне одержання ембріонів ссавців *in vitro* неможливе без забезпечення оптимальних умов культивування та середовищ, ідентичних за своїм складом їх природному середовищу в організмі самки і які повинні задовольняти потреби клітин у поживних речовинах і відповідати особливостям метаболізму.

З цією метою для удосконалення середовищ для культивування поза організмом ембріонів кролів заслуговує на увагу вискодисперсний кремнезем (ВДК), який успішно застосовується для підвищення життєздатності кріоконсервованих сперматозоїдів сільськогосподарських тварин та оптимізації середовищ формування ембріонів свиней *in vitro*. В зв'язку з цим ми вивчали вплив ВДК t°C200 на ефективність формування зигот кролів в умовах *in vitro* та розвиток ембріонів поза організмом до доїмплантаційних стадій [99, 2].

Для культивування ембріонів готували середовище ТСМ на основі стандартного середовища 199, до якого додавали 10 % фетальної сироватки крові теляти та наноматеріал ВДК t°C200 у концентрації 0,001 %.

В середовище для культивування додали найбільш дієву концентрацію 0,001 % наноматеріалу ВДК t°C200, яка за результатами попередніх досліджень при додаванні до розморожених сперматозоїдів бугаїв та кнурів у пролонгувала їх життєву активність.

Для проведення даного дослідження зиготи кролів, які одержані після дозрівання та запліднені *in vitro* розділили на дві групи:

група 1 – дослідна (58 шт.), в якій культивування проводили в середовищі з 0,001 % наноматеріалу ВДК t°C200;

група 2 – контрольна (54 шт.), в якій культивування зигот проводили без додавання наноматеріалу.

За даними морфологічного аналізу рівень дроблення ембріонів кролів *in vitro* у групі 1 становив 55,2 %, а в групі 2 – 51,9 %. Сформовані 2-4-клітинні ембріони проявляли ознаки повноцінного розвитку. За результатами подальшого розвитку сформованих *in vitro* ембріонів кролів встановлено вірогідну різницю між досліджуваними групами та відмічено позитивний вплив ($p < 0,05$) на подальший розвиток ембріонів кролів *in vitro* наноматеріалу ВДК t°C200 в концентрації 0,001 %. Так в дослідній групі ембріонів кролів, які розвинулись на 5 день культивування з 2-4-клітинних до

морул або ранніх бластоцист, отримано на 18 % більше, ніж в контрольній (табл. 3.18).

Таблиця 3.18.

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.

Проведеними експериментальними дослідженнями з вивчення впливу ВДК t°C200 в концентрації 0,001 % на ефективність формування зигот кролів в умовах *in vitro* та розвиток ембріонів поза організмом на доімплантаційних стадій встановлено позитивний вплив даного наноматеріалу на формування та розвиток ембріонів в умовах *in vitro*. 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 (рис. 3.33). Проведеним аналізом цитогенетичних препаратів ембріонів кролів встановлено, що отримані ембріони містили повноцінні ядра із ядерцями, кількість яких відповідала стадії розвитку ембріонів (рис. 3.34).



Рис. 3.33. Зажиттєве фото сформованих *in vitro* ембріонів кролів на стадії ранньої морули. Зб. об.10х, ок. 10х.

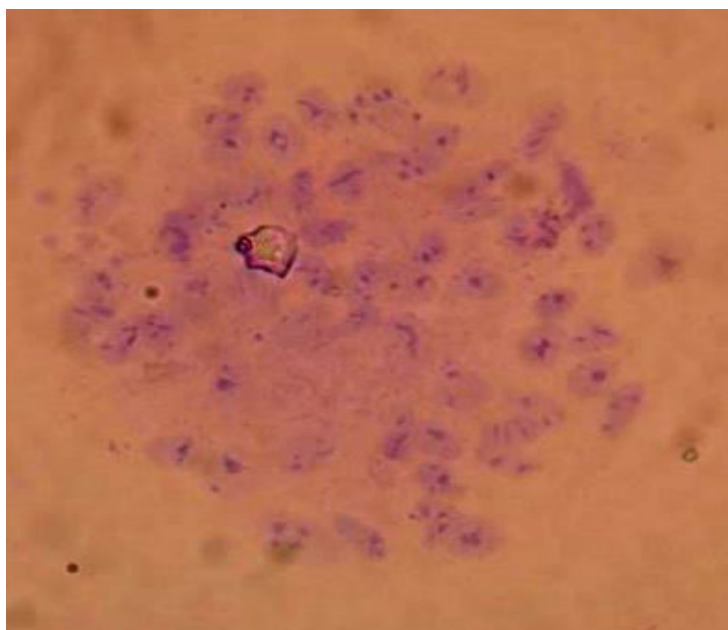


Рис. 3.34. Цитогенетичний препарат ранньої бластоцисти отриманої *in vitro* (n=52). Зб. об.100х, ок. 10х.

Таким чином, наноматеріал ВДК t°C200 в концентрації 0,001 % у складі середовища для культивування ембріонів кролів стимулює процес дроблення зигот та сприяє розвитку вірогідно більшої кількості ($P < 0,05$) ембріонів до передімплантаційних стадій розвитку.

3.2. Морфологічні та цитогенетичні дослідження формування *in vitro* ембріонів свиней

Нині розроблено ряд біотехнологічних підходів, які дозволяють вилучати незрілі ооцити з яєчників свиней та ефективно додатково використовувати їх репродуктивний потенціал. Основними етапами отримання ембріонів поза організмом є вилучення ооцит-кумулюсних комплексів, їх дозрівання в умовах *in vitro* до стадії метафази II мейозу та подальше запліднення.

Формування зрілої яйцеклітини, готової до запліднення і розвитку ембріона, являє собою комплексний процес перетворень хроматину (ядерне дозрівання) і компартментів ооплазми. Відбуваються взаємозв'язані зміни ядра, цитоплазми, плазматичної мембрани і прозорої оболонки. Важливою і актуальною проблемою в даному процесі є активація мейозу в умовах поза організмом.

На ефективність культивування ооцитів *in vitro* та подальше формування ембріонів поза організмом впливає багато факторів, зокрема фізіологічні показники якості гамет самок, індивідуальні особливості тварин, їх вік, сезон року, умови утримання та годівлі тварин [123].

В своїх дослідженнях за мету ми ставили вивчити цитологічні і морфологічні особливості незрілих ооцитів, вилучених із яєчників свинок різних порід – породи ландрас і велика біла.

Для досліджень використали яєчники (n=16) від забитих статевозрілих свинок порід ландрас і велика біла, вилучені на стадії фолікулярного росту (рис. 3.35).



Рис. 3.35. Яєчники свинки породи ландрас на стадії фолікулярного росту.

З фолікулів яєчників свинок породи ландрас вилучено 288 ооцитів (в середньому на 1 яєчник – 36), свинок породи велика біла – 310 (в середньому на 1 яєчник – 39).

Отримані ОКК залежно від стану кумулюса та ооплазми, розподіляли на чотири групи:

I група – оточені щільним багат шаровим кумулюсом, із однорідною невакуолізованою ооплазмою;

II група – оточені розпушеним шаром кумулюса та однорідною невакуолізованою ооплазмою;

III група – ОКК, які частково втратили кумулюс, але з невакуолізованою однорідною ооплазмою;

IV група – атретичні, денудовані, з вакуолізованою ооплазмою, тобто непридатні до подальшого розвитку.

За морфологічними ознаками переважна більшість ооцитів вилучених із яєчників свинок породи ландрас і велика біла віднесені до I-ї і II-ї групи (табл. 3.19).

Таблиця 3.19.

**Морфологічний аналіз популяцій ооцит-кумулюсних комплексів
вилучених із яєчників свинок породи ландрас і велика біла**

Порода свинок	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
ландрас	288	120 ^a (41,7±2,9)	102 ^b (35,4±2,8)	26 ^c (9,0±1,7)	40 ^e (13,9±2,0)
велика біла	310	127 ^a (41,0±2,8)	90 ^b (29,0±2,6)	54 ^d (17,4±2,2)	39 ^e (12,6±1,9)

Примітки: c:d – $p < 0,01$, критерій χ^2

Число ооцит-кумулюсних комплексів I-ї групи було майже однаковим у тварин обох порід (рис. 3.36). Незначна різниця спостерігалась між кількістю ооцитів II-ї групи: із фолікулів яєчників свинок породи ландрас отримано 35,4 %, а від свинок породи велика біла 29 %.

В ході порівняння показників виходу ооцитів із щільним та розпушеним кумулюсом із яєчників тварин двох порід встановлено вищий, проте з невірогідною різницею, рівень даного показника у тварин породи ландрас, порівняно з великою білою. Вірогідна різниця встановлена лише за кількістю ооцитів III групи.



Рис. 3.36. Ооцити свинок І-ї групи. Зб. об.10х, ок.10х.

Таким чином, встановлено, що з яєчників свинок обох порід вилучено рівнозначну кількість незрілих ооцитів, з яких за морфологічними ознаками, для подальшого культивування було відібрано також майже однакову кількість (86,1 % і 87,4 %). Отримані нами результати експерименту свідчать про можливість і доцільність використання репродуктивного потенціалу свинок обох порід в технології отримання ембріонів *in vitro*.

Основна генерація ооцитів в яєчниках ссавців блокується на стадії диплотени на тривалий час до моменту овуляції. Диплотена є стадією оогенезу, в якій ооцити можуть перебувати тривалий час протягом життя тварини.

З метою цитологічного аналізу ооцит-кумулюсних комплексів, вилучених із фолікулів яєчників свиней порід ландрас і велика біла за стандартною методикою приготували цитологічні препарати.

Результати аналізу препаратів свідчать, що ооцити перебували на різних стадіях розвитку. Найбільша їх кількість – 48,3 %, отриманих від свинок породи ландрас і 47,3 % від свинок породи велика біла перебували на стадії диплотени дифузної (рис. 3.37) та диплотени фібрилярної – 32 % (рис. 3.38). На цій стадії ооцит оточений шаром фолікулярних клітин. Ядро

ооцита збільшене і має інтерфазну морфологію внаслідок деконденсації хромосом. Дифузна диплотена передуює періоду росту ооцитів і в ній ооцити перебувають в стані спокою. В умовах *in vivo* тривалість дифузної диплотени різна – у свиней до кількох років. Протягом репродуктивного періоду ооцити свиней, як і інших видів ссавців, не мають здатності до запліднення. Таким чином, біологічна доцільність диплотени у створенні такого стану, в якому ооцити можуть перебувати довгий час, не втрачаючи здатності завершити оогенез і мати здатність до запліднення. Механізми блокування мейозу на стадії диплотени залишаються невивченими.

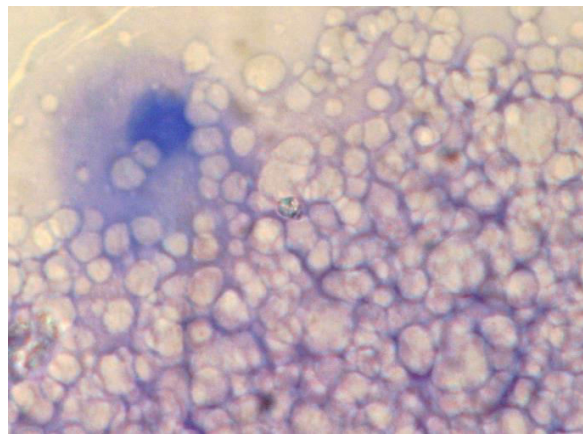


Рис. 3.37. Цитогенетичний препарат ооциту свинки на стадії диплотени дифузної. Зб. об.100х, ок.10х.

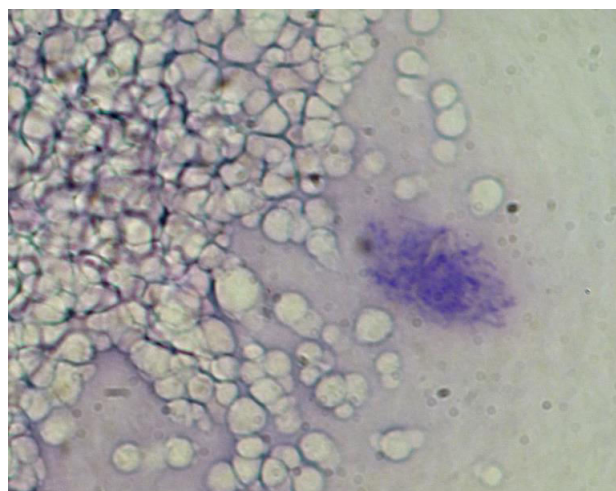


Рис. 3.38. Цитогенетичний препарат ооциту свинки на стадії диплотени фібрилярної. Зб. об.100х, ок.10х.

На стадії диплотени фібрилярної хромосоми потовщені і відділяються від ядерної мембрани. Біваленти представляють собою тетраду, в якій всі сестринські хроматиди поєднані центромерою, а несестринські – хіазмами. У ооцитів, в яких відбувається інактивація хромосомного апарату, хромосоми гетерохроматизуються, об'єднуються в клубок навколо ядерця ооцита і формують каріосферу.

Із вилучених нами із яєчників свинок породи велика біла ооцитів на стадії диплотени фібрилярної виявлено майже втричі більше, ніж із яєчників свинок породи ландрас. (табл. 3.20).

На стадії діакінезу (стадії видимих бівалентів) перебували 2,5 % ооцитів від загальної кількості вимитих ооцитів від свинок породи ландрас і жодного ооцита від свинок породи велика біла. На цій стадії відбувається максимальна конденсація хромосом і термінація хіазм, тобто діакінез завершує профазу першого поділу мейозу.

Таблиця 3.20

**Цитогенетичний аналіз ооцитів вилучених із яєчників свиней
породи ландрас і велика біла**

Порода	Кількість вилуче- них ОКК, n	Кількість ооцитів на стадіях мейозу, n (%)				Ооцитів з ознаками дегенерації хроматину n (%)
		диплотени		діакінезу	метафази II	
		дифузної	фібриляр- ної			
ландрас	120	58 ^a (48,3±4,5)	31 ^b (25,9±3,9)	3 ^d (2,5±1,4)	7 ^e (5,8±2,1)	21 ^f (17,5±3,4)
велика біла	281	133 ^a (47,3±2,9)	107 ^c (38,0±2,9)	0 ^d	8 ^e (2,9±0,9)	33 ^f (11,8±1,9)

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

На стадії метафази II ооцитів, отриманих від свинок породи ландрас зафіксовано вдвічі більше, ніж вилучених у тварин великої білої. Така ж тенденція виявлена і у ооцитів з дегенерованим хроматином (17,5 і 11,8 % відповідно).

Виходячи з біологічних закономірностей оогенезу, для ініціації подальшого розвитку і їх повноцінного дозрівання придатними є ооцити, які перебувають на стадії диплотени. Таких ооцитів у нашому дослідженні виявлено 74,2 % від свинок породи ландрас і 85,3 від свинок великої білої. Що стосується ооцитів на стадії діакінезу (5,8 % у ландрас і 2,9 % у великої білої), то вони є менш придатними, оскільки в умовах *in vitro* може відбутись збій процесу дозрівання через те, що початкові етапи дозрівання вже відбулись в яєчнику.

3.2.1. Аналіз дозрівання *in vitro* ооцит-кумулюсних комплексів свиней

Дозрівання ооцитів в організмі самки відбувається від моменту завершення першого поділу мейозу (стадія диплотени) і до моменту переходу до стадії метафази другого мейотичного поділу. У свиней формування антральних фолікулів (при 400 мкм в діаметрі) і дозрівання ооцитів відбувається вдвічі довше ніж в інших тварин [181, 156].

Морфологічною ознакою завершення ооцитом ядерного дозрівання *in vitro* є виділення першого полярного тільця. Для багатьох видів ссавців відома точна тривалість дозрівання ооцитів. Для свиней тривалість дозрівання займає 46 годин. Саме цей часовий термін взято нами для відтворення процесів дозрівання ооцитів в умовах *in vitro*.

Метою даних досліджень є порівняння результатів дозрівання ооцитів, отриманих із яєчників свинок порід ландрас і велика біла в умовах *in vitro*.

Для культивування в умовах *in vitro* відібрали 273 ооцит-кумулюсних комплексів I-III-ї груп, вилучених із яєчників свинок порід ландрас та велика біла. Культивування *in vitro* вилучених ооцитів проводили протягом 46

годин, після чого виготовляли цитогенетичні препарати і аналізували стан хроматину. У свиней, як і у більшості ссавців мейоз призупинений на стадії диплотени, або першої мейотичної профазі, поки дія гонадотропінів (ФСГ) фолітропіну та лютропіну) не викличе відновлення першого поділу мейозу (стадія метафази I) і не запусить овуляцію [189, 45]. Морфологічно відновлення мейозу характеризується руйнуванням ядерної мембрани ооцитів. Перший поділ мейозу закінчується формуванням першого полярного тільця (метафаза II), після чого ооцити знову призупиняють його аж до моменту запліднення. На цій стадії тепер уже ооцит II порядку може вступати у процес запліднення, під впливом якого і відбувається завершення мейозу. Ооцит II порядку містить хромосоми, кожна з яких складається із двох сестринських хроматид.

В обох мейотичних поділах здійснюється асиметричний цитокінез. Це обумовлюється тим, що контрактильне кільце, завдяки якому здійснюється цитокінез, формується не в центрі ооцита, а ближче до одного з його полюсів. Тому коли виділяється полярне тільце, його розміри значно менші розмірів ооцита. До складу другого полярного тільця надходить близько 1 % цитоплазми ооцита. В області ооцита, що відповідає майбутньому місцю утворення полярного тільця, локально змінюється морфологія плазматичної мембрани.

В наших дослідженнях морфологічною та цитологічною оцінкою встановлено, що 87,2 % ооцит-кумулюсних комплексів свинок породи ландрас і 87,9 % свинок породи велика біла відновили мейотичне дозрівання і досягли стадії ядерного дозрівання – метафази II мейозу (табл. 3.21; рис. 3.39).

Таблиця 3.21.

**Дозрівання *in vitro* ооцитів, вилучених із яєчників свинок
порід ландрас і велика біла**

Порода	Кількість ооцит-куму- люсних ком- плексів, n	Кількість ооцитів на стадії мейозу, n (%)			Ооцитів з ознаками деге- нерації хро- матину, n (%)
		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 той же час, менше семи відсотків всіх ооцитів, що культивувались, зупинили свій розвиток, не досягнувши стадії дозрівання. Таких ооцитів у свинок породи ландрас виявлено на чверть менше, ніж у великої білої. Під час проведення цитогенетичного аналізу ооцитів, в яких мейоз в умовах *in vitro* не відновився, виявлені дегенеративні зміни ядерного матеріалу: злипання хроматину та його деконденсацію.

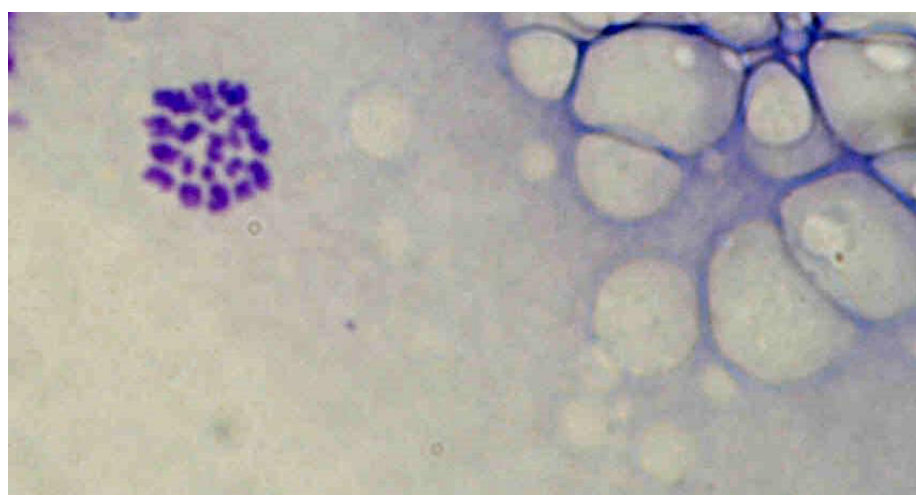


Рис. 3.39. Цитогенетичний препарат ооциту свині після дозрівання *in vitro* на стадії метафази II мейозу. Ідентифіковано гаплоїдний набір хромосом (n=19). Зб. об.100х, ок.10х.

В цілому рівень дозрівання *in vitro* ооцитів, вилучених з яєчників свинок порід ландрас і велика біла, склав 87,5 % (239/273). Отже, ооцит-кумулясні комплекси, вилучені із яєчників свинок даних порід можна успішно використовувати для отримання дозрілих *in vitro* гамет.

3.2.2. Вплив ВДК/N-галактози на дозрівання ооцитів свиней в умовах *in vitro*

З метою вибору оптимальних умов для біотехнологічних маніпуляцій із ооцитами і ембріонами сільськогосподарських тварин вивчали вплив наноматеріалу ВДК/N-галактози на мейотичні перетворення ооцитів свиней при дозріванні в умовах *in vitro*. Поверхня ВДК була модифікована N-галактозою (Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України). N-галактоза належить до аміноцукорів які є складовою частиною деяких глікопротеїнових гормонів, таких як фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) і лютеїнізуючого гормону (ЛГ). [35]. Саме ці гормони відіграють ключову роль в дозріванні яйцеклітин ссавців. Передбачалось, що додавання такого наноконструкту в середовище для дозрівання ооцитів ссавців поза організмом сприятиме покращенню гормонального фону культурального середовища для дозрівання, що забезпечить підвищення рівня дроблення ембріонів.

Вилучені ооцити (n=261) від забитих клінічно здорових свинок розділяли на дві групи:

- контрольну – дозрівання ооцитів *in vitro* проводили в стандартному середовищі;
- дослідну – культивування ооцитів проводили в середовищі, до якого додали ВДК/N-галактози у концентрації 0,001 %.

Після культивування *in vitro* упродовж 46 годин за морфологічною оцінкою та даними цитогенетичного аналізу встановлено вірогідну різницю ($p < 0,05$) між контрольною та дослідною групою ооцитів, які не відновили мейотичне дозрівання і залишились на стадії диплотени, в кількості ооцитів. Кількість таких гамет не перевищувала 20 % в контрольній групі і складала

лише близько 9 % в дослідній групі. Стадії ядерного дозрівання, тобто стадії телофази I пізньої – метафази II у контрольній групі досягли 70,6 % ооцитів, в той же час цей показник у дослідній групі вищий 13,6 %, що свідчить про високий рівень дозрівання (рис. 3.40). Ооцитів з дегенерованим хромосомним матеріалом після культивування у контрольній групі виявлено на 2,0 % більше, ніж у дослідній (табл. 3.22).

Таблиця 3.22

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, n (%)	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.

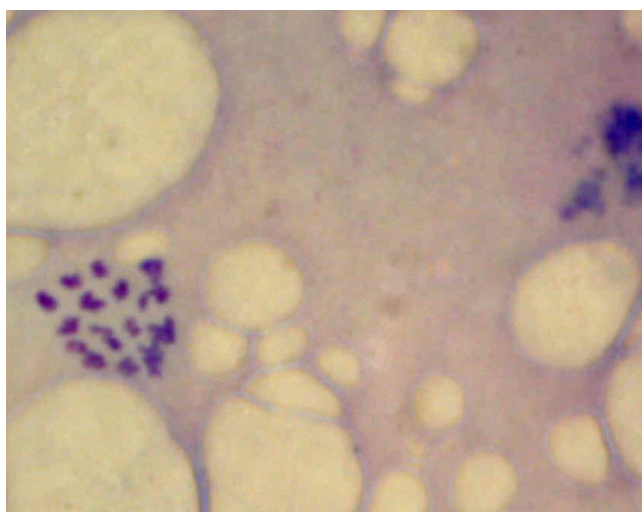


Рис. 3.40. Цитогенетичний препарат ооциту свині після дозрівання *in vitro* на стадії пізньої телофази. Зб. об.100х, ок.10х.

Таким чином, результати експерименту свідчать про позитивний вплив ВДК/N-галактози в концентрації 0,001 % на умови культивування *in vitro* ооцит-кумулюсних комплексів свиней. Його додавання сприяло підвищенню кількості ооцитів, які дозріли до стадії мейотичного дозрівання метафази II 84,2 % (85 із 101), завдяки забезпеченню активізуючих умов в культуральному середовищі.

3.2.3. Аналіз рівня дозрівання *in vitro* ооцитів свиней миргородської породи

Сучасна селекція в свиноводстві спрямована на збільшення м'ясної продуктивності, скоростиглості та зниження конверсії корму за високих показників репродуктивної здатності тварин. Такі вимоги ринку ставлять під загрозу існування місцевих порід, які на даний час є неконкурентоспроможними внаслідок недостатньої пристосованості до умов інтенсивних промислових технологій, проте характеризуються унікальними адаптаційними властивостями, якістю м'ясної продукції і специфічністю генофонду. Збереження автохтонних порід у вигляді закритих популяцій обмеженої чисельності *in situ* та *ex situ* призводить до загрози виникнення інбредної депресії тварин внаслідок накопичення генетичного вантажу та зниження рівня загальної генетичної гетерогенності. В Україні нині однією з порід свиней на яка перебуває на грані зникнення є миргородська порода свиней [34]. Так, станом на 01 січня 2013 року миргородська порода свиней, згідно «Держплемреєстра» розводиться лише в двох господарствах України: ДП «ДГ ім. Декабристів» Полтавської області (2542 голови) і СВК АФ «Перше травня» Сумської області (879 голів). Кількість основних свиноматок загалом по миргородській породи становить 383 голови, що є критичним показником щодо її подальшого чистопородного розведення. У системі схрещування, гібридизації та створення нових порід миргородську використовують як материнську форму [37, 13, 10]. За адаптивністю до місцевих умов утримання та високими технологічними характеристиками

м'язової тканини (наявність жирових прошарків між м'язами, вологоутримуюча здатність м'яса після забою) її можна віднести до порід з унікальними генетичними властивостями [3]. Робота із збереження зникаючих автохтонних порід свиней вимагає розробки і застосування сучасних біотехнологічних та генетичних підходів. Такі підходи як вилучення і дозрівання ооцитів в умовах *in vitro* та використання їх для кріоконсервування, забезпечують можливість у перспективі відновити необхідні види тварин та дозволить реалізувати завдання щодо накопичення генетичного матеріалу з метою його довгострокового збереження [28, 5]. Тому завданням даного дослідження є отримання поза організмом повноцінних яйцеклітин з ОКК, вилучених із фолікулів яєчників свиноматок миргородської породи [33].

Для вилучення ооцит-кумулюсних комплексів відібрали яєчники від трьох свиноматок миргородської породи різного генеалогічного походження: Смородина № 674, Сойка № 314, Русалка № 274/05128. Яєчники всіх свиноматок знаходились на лютеїновій стадії статевого циклу і містили чітко виражені жовті тіла різного розміру (рис. 3.41).



Рис. 3.41. Яєчники свиноматки Смородини № 674 миргородської породи (стрілками вказані жовті тіла).

Найбільшу кількість 71 ОКК вилучено із фолікулів яєчників свиноматки Смородина № 674, з яких 74,6 % були придатні до культивування і після культивування досягли метафази II. Із яєчників свиноматки Русалка № 274/05128 вилучили 50 ОКК з них 65,5 % досягли метафази II в умовах *in vitro*. Найменше, всього лише 29 ОКК вдалося вилучити із яєчників свиноматки Сойка № 314, з яких відновили мейотичні перетворення і досягли метафази II 65,5 % (рис. 3.42).

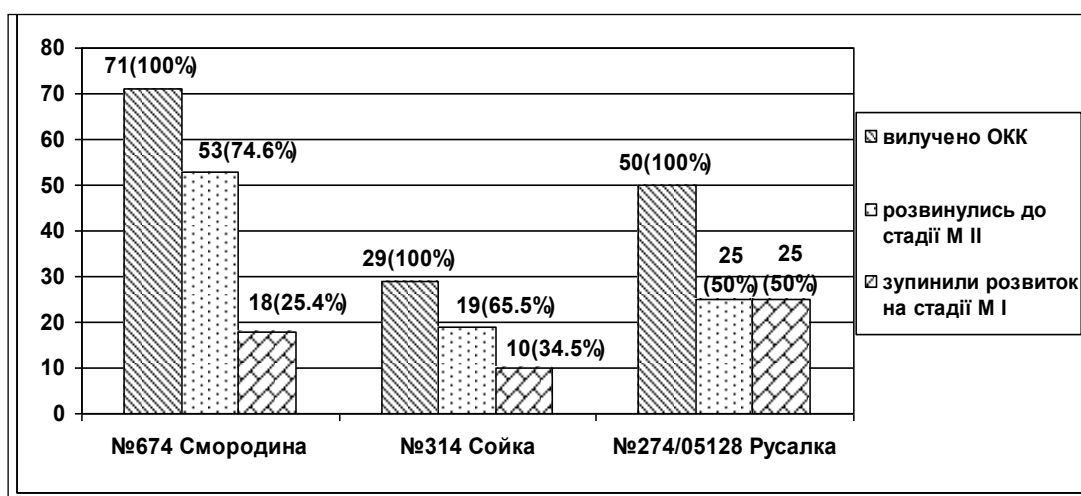


Рис. 3.42. Аналіз рівня дозрівання ооцитів поза організмом свиноматок миргородської породи

Таким чином, одним із лімітуючих факторів при збереженні генетичних ресурсів свиней є індивідуальна варіабельність у кількості повноцінних та життєздатних ооцитів. Така різниця в кількості одержаних яйцеклітин, придатних для кріоконсервування, головним чином пов'язана з віком тварини та стадією статевого циклу на якому вона перебувала на момент вилучення ооцит-кумулюсних комплексів.

Слід відмітити, що вилучені з яєчників свиноматок миргородської породи ооцит-кумулюсні комплекси характеризуються значною гетерологічністю популяції ооцитів як за якістю, так і загальною їх кількістю. В середньому із яєчників однієї свиноматки миргородської породи можна

отримати 32 повноцінних ооцита, які здатні досягли метафази II в умовах *in vitro*.

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

3.2.4. Формування *in vitro* ембріонів свиней

Метою наступних досліджень є порівняння ефективності формування ембріонів поза організмом з ооцитів, отриманих із яєчників свинок породи ландрас та породи велика біла.

Для проведення запліднення поза організмом відібрали 123 дозрілих в умовах *in vitro* ооцита, отриманих із фолікулів яєчників свинок порід ландрас і 116 велика біла. Запліднення ооцитів проводили нативною спермою кнура. Сперматозоїди кнура відсортовували методом «swim-up». Спільну інкубацію дозрілих ооцитів і сперматозоїдів проводили у модифікованому середовищі Тіроде (TALP) упродовж 18 годин. Відмиті від сперматозоїдів зиготи культивували в середовищі NCSU-23 [123, 22].

Значної різниці між рівнем формування зигот не встановлено. Так з популяції ооцитів отриманих від свинок породи ландрас запліднення відбулось в 68,3 % (84/123), а в ооцитів отриманих від свинок породи велика біла в 67,2 % (78/116). Не відмічена вірогідна різниця також і в формуванні 2-4 клітинних ембріонів (рис. 3.43).



Рис. 3.43. Зажиттєве фото сформованого поза організмом 2-клітинного ембріона свиней. Зб. об.10х, ок.10х.

Ембріонів, які розвинулись до передімплантаційних стадій з популяції ооцитів отриманих від свинок породи ландрас отримано на рівні 28,6 %, а в ооцитів отриманих від свинок породи велика біла в 29,5 %, вірогідної різниці не встановлено (табл. 3.23; рис. 3.44, 3.45).

Таблиця 3.23.

Рівень формування ембріонів умовах *in vitro* залежно від породною належності свинок-донорів ооцитів

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

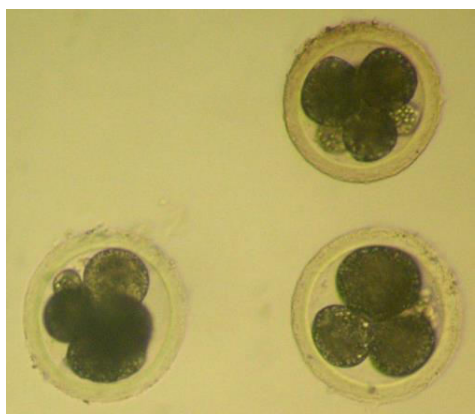


Рис. 3.44. 4-х клітинні ембріони свиной отримані *in vitro*.

Зб. об.10х, ок.10х.

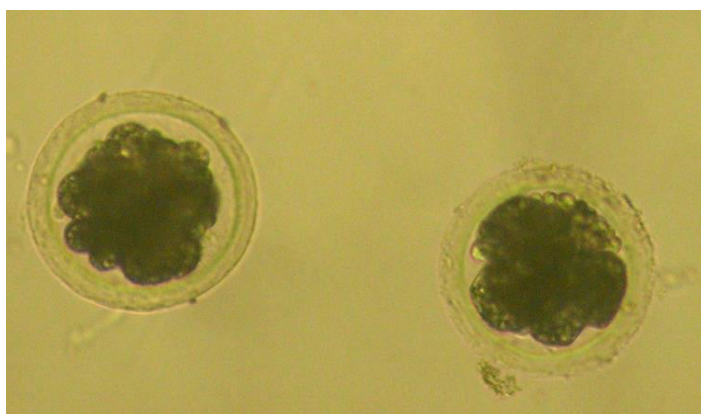


Рис. 3.45. Ембріони свиной не стадії морули, отримані *in vitro*.

Зб. об.10х, ок.10х.

Проведений аналіз цитогенетичних препаратів ембріонів свиней, отриманих поза організмом на стадіях розвитку від двох бластомерів до ранньої морули підтвердив результати візуальної оцінки за морфологічними ознаками. Ембріони, які за візуальною оцінкою були визначені морфологічно нормальними містили повноцінні ядра із ядерцями, кількість яких відповідала кількості бластомерів ембріонів, а хроматин цих ядер відповідав стадії розвитку.

Встановлено, що ооцит-кумулюсні комплекси отримані із фолікулів яєчників свинок порід ландрас і велика біла після культивування поза організмом, повноцінно дозріли. Це підтверджує високий рівень формування зигот (67,8 %) та ембріонів доімплантаційних стадій (29,0 %). Отже, немає вірогідної різниці у кількості і якості отриманих *in vitro* ембріонів свиней різних порід в нашому дослідженні.

Аналізом генетичних закономірностей раннього ембріогенезу свиней порід ландрас і велика біла доведено доцільність використання репродуктивного потенціалу свинок порід ландрас і велика біла в технології *in vitro* та програмах збереження генофонду селекційно цінних представників породи.

3.2.5. Вплив наноматеріалу ВДК/N-галактози на розвиток ембріонів *in vitro*

Для підтвердження повноцінності дозрівання *in vitro* ооцитів свиней та дослідження впливу додавання 0,001 % ВДК/N-галактози при дозріванні, проводили запліднення *in vitro*. Розділені на дві групи: контрольну (дозрівали в умовах *in vitro* в стандартному середовищі) та дослідну (дозрівали в середовищі, до якого додали ВДК/N-галактоза у концентрації 0,001 %) ооцити запліднювали кріоконсервованими еякульованими сперматозоїдами кнура. Після запліднення та сумісного культивування упродовж 18 годин ооцитів свиней та сперматозоїдів кнура *in vitro* за результатами

морфологічного та цитогенетичного аналізу встановлено, що рівень запліднення в дослідній групі досяг 42,8 % (27/63), а в контрольній 31,8 % (28/88), що на 11 % нижче ніж в дослідній, хоч дана різниця і не вірогідна.

Показник дроблення ембріонів *in vitro* був на 31,7 % нижче у контрольній групі порівняно із дослідною в якій середовище для дозрівання містило 0,001 % ВДК/N-галактози. Встановлено, вірогідну різницю ($p < 0,05$, критерій Ст'юдента) між групами в рівні формування 2-х клітинних ембріонів (рис. 3.46, 3.47).

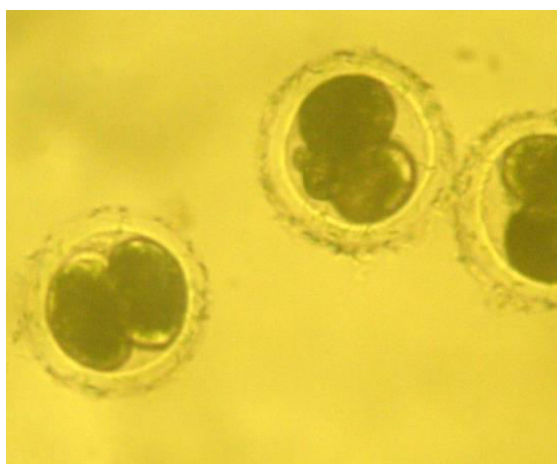


Рис.3.46. двоклітинні ембріони свиней отримані *in vitro*.
Зб. об.10х, ок.10х.



Рис. 3.47. Цитогенетичний препарат двоклітинного ембріона свиней отриманого *in vitro*. Стрілки вказують на ядра. Зб. об.100х, ок.10х.

До передімплантаційної стадії розвинулося більше на 4,3 % ембріонів в дослідній групі, хоча дана різниця і невірогідна. Не подолали блок дроблення вірогідно більша різниця ($p < 0,01$, критерій Ст'юдента) частина зигот в контрольній групі. В дослідній групі залишились нероздробленими лише 11,1 % зигот, а в контрольній – 42,8 %. Це вказує на забезпечення активізуючих умов середовища для повноцінного дозрівання ооцитів (табл. 3.24).

Таблиця 3.24.

Аналіз дроблення ембріонів свиней *in vitro*

Група	Зигот, n (%)	Кількість, n (%)		
		2–4- клітинних ембріонів	ранніх морул	не роздробле- них 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

Отже, додавання ВДК/N-галактози в даній концентрації не тільки немає негативного впливу на дозрівання та формування зигот і дроблення ембріонів у свиней, а ще й сприяє отриманню більшої кількості ембріонів розвинутих *in vitro*. Таким чином, додавання 0,001 % ВДК/N-галактози забезпечує оптимізацію середовища для культивування *in vitro* ооцитів свиней і сприяє розвитку ембріонів поза організмом (рис. 3.48).

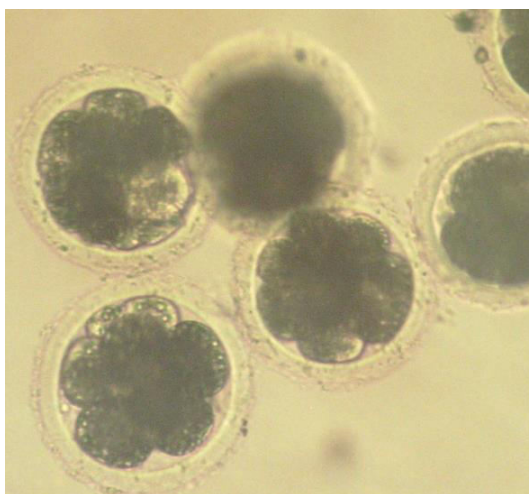


Рис. 3.48. Ембріони свиней на стадії ранньої морули.
Зб. об.10х, ок.10х.

Доведено, що додавання ВДК/N-галактози в концентрації 0,001 % до середовища для дозрівання, забезпечило повноцінне дозрівання ооцитів свиней, що дозволило збільшити рівень запліднення *in vitro* на 11 % та отримати вищий на 31,7 % рівень дроблення ембріонів.

Ефективність одержання біологічно повноцінних ембріонів сільськогосподарських тварин в умовах *in vitro*, порівняно з одержаними *in vivo* ембріонами, має не завжди високі та стабільні результати. Оскільки ембріональний розвиток є результатом взаємозв'язку ембріона із статевими шляхами самки у ембріонів, які культивують поза організмом, існує «блок» розвитку [23]. У свиней – це 4-клітинна стадія, яка пов'язана з початком синтезу РНК. Вирішальним чинником для успішного культивування ембріонів поза організмом є склад середовища який повинен задовольняти потреби клітини в поживних речовинах і відповідати особливостям метаболізму клітин *in vitro* [173]. Для вирішення даних проблем важливим є оптимізація середовища для культивування гамет та ембріонів за допомогою наноматеріалів, зокрема вискодисперсних речовин [29]. Наявність на поверхні ВДК певної кількості хімічно активних гідроксильних груп обумовлює модифікацію поверхні різними функціональними групами, що дає змогу використовувати ВДК як матрицю для синтезу матеріалів з певними фізико-хімічними та біологічними властивостями.

Наші дослідження були спрямовані на вивчення впливу ВДК t °C 200 в концентрації 0,001 % на ефективність формування ембріонів свиней в умовах *in vitro* та їх розвиток поза організмом до передімплантаційних стадій.

Після запліднення та культивування упродовж 18 годин ооцитів свиней та сперматозоїдів кнурів поза організмом зиготи розділяли на дві групи:

- контрольну, в якій культивування зигот проводилось в стандартному середовищі (NCSU-23);
- дослідну групи, в якій до стандартного середовища (NCSU-23) додавали 0,001 % ВДК t °C 200.

Після 24 годин культивування зигот *in vitro* певний відсоток запліднених яйцеклітин не долає блоку дроблення для переходу до розвитку ембріонів. Але показник формування у запліднених яйцеклітинах пронуклеусів вказує на забезпечення активізуючих умов середовища для одержання ембріонів поза організмом.

За результатами морфологічного аналізу встановлено, що рівень формування ембріонів свиней *in vitro* із додаванням до середовища для культивування ВДК t °C 200 в концентрації 0,001 % є досить високим і становив 40,2 %. Показник дроблення ембріонів *in vitro* був на 3,8 % нижче у контрольній групі порівняно із середовищем яке містило 0,001 % ВДК t °C 200 (табл. 3.25).

Таблиця 3.25

Рівень формування *in vitro* ембріонів свиней по групах

Група	Запліднено-ооцитів, n	Кількість, n (%)		
		зигот	2-4-клітинних ембріонів, n	ранніх морул
дослідна	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; культивування до стадії морул відбувалося в одному досліді.

Встановлено, що відсоток ранніх морул в дослідній групі з додаванням ВДК t °C 200 в концентрації 0,001 % у середовище для культивування ембріонів свиней вищий на 16 % порівняно із контрольною групою (11,6 %, 14 із 121).

Отже, додавання ВДК t °C 200 в даній концентрації не тільки немає негативного впливу на формування зигот свиней та дроблення ембріонів, а ще й сприяє отриманню більшої кількості ембріонів розвинутих *in vitro* до стадії ранньої морули (рис. 3.49)

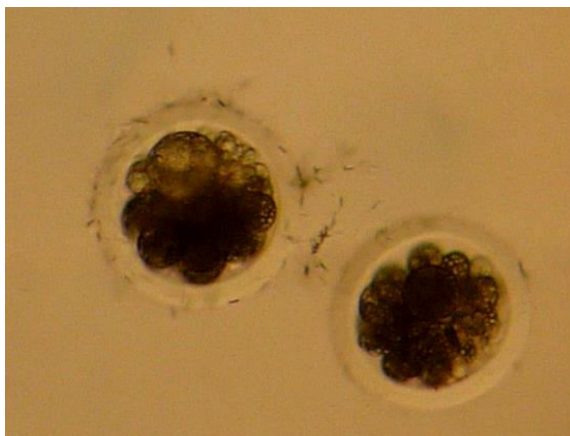


Рис. 3.49. Зажиттєве фото сформованих *in vitro* ембріонів свиней на стадії ранньої морули. Зб. об.10х, ок.10х.

За результатами аналізу цитогенетичних препаратів встановлено, що у нероздроблених зигот суттєво вищу заплідненість спостерігали у дослідній групі з ВДК t °C 200 в концентрації 0,001 %. Додавання 0,001 % ВДК t °C 200 сприяло збільшенню на 14,1 % рівня запліднення яйцеклітин *in vitro* порівняно з контролем.

Аналіз цитогенетичних препаратів отриманих з ембріонів свиней на різних стадіях розвитку (від двох бластомерів до ранньої морули) підтвердив, повноцінність отриманих ембріонів (рис. 3.50).

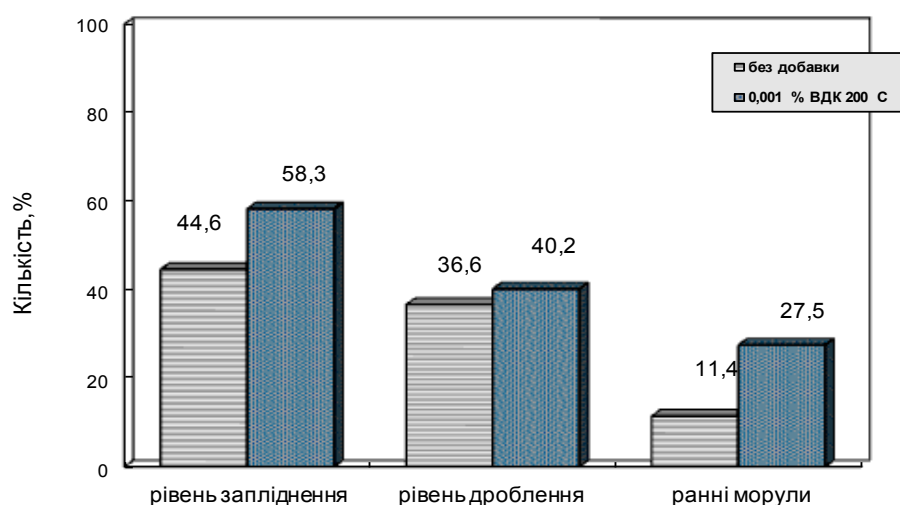


Рис. 3. 50. Вплив ВДК t °C 200 в концентрації 0,001 % на ефективність розвитку ембріонів свиней *in vitro*.

Отже, додавання наноматеріалів, які синтезовано на основі високодисперсного кремнезему, забезпечує оптимізацію середовища для культивування *in vitro* ембріонів свиней і сприяє розвитку ембріонів до доімплантаційних стадій розвитку поза організмом.

В результаті проведених досліджень вивчено вплив ВДК t° С 200 в концентрації 0,001 % на ефективність формування зигот свиней та подальший розвиток ембріонів в умовах *in vitro*. Доведено, що додавання ВДК t° С 200 в середовище для культивування ембріонів 0,001 % сприяє отриманню в умовах *in vitro* більшої кількості ембріонів свиней розвинутих до передімплантаційних стадій.

3.3. Морфологічна та цитогенетична оцінка популяцій

ооцит-кумулюсних комплексів кіз

Не дивлячись на значний прогрес в сфері біотехнології, сучасні *in vivo* та *in vitro* методи отримання ембріонів кіз все ще мають істотні недоліки, а саме малий вихід повноцінних ембріонів доімплантаційних стадій. Ефективність отримання ембріонів поза організмом в кіз ще далека від оптимальної і залежить від умов дуже багатьох факторів [73]. Однією з основних причин, які знижують відсоток розвитку ранніх ембріонів кіз поза організмом до стадії імплантації, є недостатня кількість і незадовільна якість ооцит-кумулюсних комплексів [230, 78]. Тому дуже важливим є відпрацювання методів відбору повноцінних та придатних до подальшого розвитку ооцитів кіз, які здатні до відновлення мейозу в умовах *in vitro* та подальшого ембріонального розвитку після запліднення поза організмом [69,165]. Ця компетенція набувається впродовж фолікулогенезу під час росту яйцеклітини [160]. Досліджено багато факторів, які впливають на компетенцію до розвитку ооцитів поза організмом: розмір фолікула [169], його морфологічні порушення [84], статевий цикл самиці, гормональна стимуляція, умови навколишнього середовища, сезон, годівля і вік самиці [103].

Першими етапами успішного отримання ембріонів кіз поза організмом, є відбір і оцінка стану яєчників та ефективно вилучення і сортування ооцитів, а інформації саме по цих етапах для даного виду тварин недостатньо.

Відомо, що у кіз, правий яєчник важче (0,90 г), ніж лівий (0,85 г), а довжина правого яєчника (1,30 см) менша ніж лівого (1,35 см). Це нормальна фізіологічна особливість виявлена у кіз овець і корів яка пояснюється тим, що праві яєчники є більш активними, ніж ліві [86, 96]. Встановлено також незначну різницю в кількості вилучених методом аспірації ОКК з правого і лівого яєчників [195].

На рівень дозрівання ооцитів поза організмом найбільш суттєвий вплив має правильний відбір повноцінних ОКК для культивування за морфологічними ознаками [152]. На даний час найчастіше використовується метод життєвої оцінки якості ооцитів кіз на основі товщини і компактності клітин кумулюсу та однорідності ооплазми. Оскільки встановлено, що зовнішній вигляд кумулюсних клітин та структура ооплазми мають вплив на здатність ооцитів до дозрівання *in vitro* [147].

Одним із завдань запланованих досліджень було визначення потенціалу яєчників кози як джерела ооцит-кумулюсних комплексів.

В дослідженні використовували яєчники фізіологічно здорової кози вилучені після забою тварини без ознак овуляції і жовтих тіл (рис. 3.51).



Рис. 3.51. Яєчники кози
(антральні фолікули вказані стрілками).

З метою відбору найбільш придатних гамет для повноцінного дозрівання поза організмом та оцінкою якості незрілих ооцитів ми розподіляли вилучені ОКК кіз як і в попередніх дослідженнях по інших видах тварин на чотири групи на основі морфологічної оцінки (рис. 3.52, 3.53, 3.54, 3.55).



Рис. 3.52. Ооцити кози I-ї групи.
Зб. об.10х, ок.10х.



Рис. 3.53. Ооцити кози II-ї групи.
Зб. об.10х, ок.10х.



Рис. 5.54. Ооцити кози III-ї групи. Зб. об.10х, ок.10х.



Рис. 5.55. Ооцити кози IV -ї групи. Зб. об.10х, ок.10х.

Загалом вилучено із правого та лівого яєчника кози 70 ооцит-кумулюсних комплексів. З них найбільша кількість 32,9 % належала до III-ї групи. В середньому 28,6 % належало до I-ї групи і 15,7 % до II-ї групи. Непридатних для культивування поза організмом ОКК IV-ї групи виявлено 22,8 %. Не встановлено різницю між кількістю компетентних до подальшого розвитку ооцитів, отриманих з лівого та правого яєчників (табл. 3.26).

Таблиця 3.26.

**Розподіл вилучених ОКК кіз по групах на основі
морфологічної оцінки**

Яєчник кози	Загальна кількість вилучених ОКК, n	Кількість ОКК кози			
		I група, n (%)	II група, n (%)	III група, n (%)	IV група, n (%)
правий	30	8 (26,7±8,0)	5 (16,7±6,8)	10 (33,3±8,6)	7 (23,3±7,7)
лівий	40	12 (30,0±7,2)	6 (15,0±5,6)	13 (32,5±7,4)	9 (22,5±6,6)
всього	70	20 (28,6±5,4)	11 (15,7±4,3)	23 (32,9±5,6)	16 (22,8±5,0)

Отже, з одного яєчника кози можна в середньому отримати 27 ОКК придатних для культивування в умовах *in vitro*.

Для підтвердження морфологічної оцінки ооцитів, здійсненої на основі товщини і компактності клітин кумулюсу та однорідності ооплазми, аналізували цитогенетичні препарати ОКК які належали до різних груп.

За результатами цитогенетичного аналізу встановлено, що хроматин у більшості ОКК, вилучених з яєчників кіз, перебував на стадії диплотени профазі мейозу I. Встановлено вірогідну різницю ($p < 0,001$) між кількістю ооцитів I-ї і IV-ї груп, які перебували на стадії диплотени дифузної, коли чітко ідентифікується ядро з ядерцем (рис. 3.56).

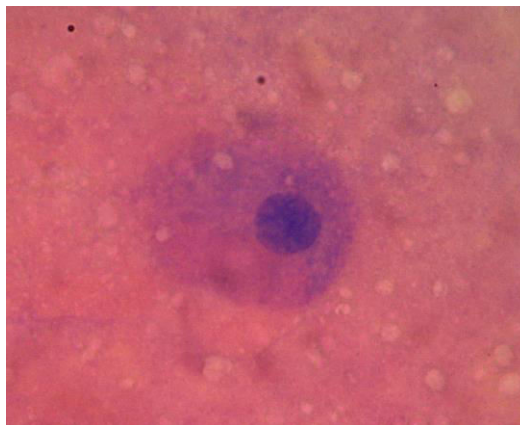


Рис. 3.56. Цитогенетичний препарат ооциту кози. Стадія дифузної диплотени профазі I мейозу. Зб. об.100х, ок.10х.

Найбільший відсоток ооцитів на стадії фібрилярної диплотени відмічено у гамет другої групи – 36,4 % (рис. 3.57). В IV-й групі спостерігалась вірогідно найбільша кількість клітин (68,8 %, $p < 0,001$) з дегенерованим хроматином (табл. 3.27).

Таблиця 3. 27.

Цитогенетичний аналіз ооцитів вилучених із яєчників кози

Група ОКК	Загальна кількість ОКК, n	Кількість ооцитів на стадії диплотени, n (%)			Метафази II, n (%)	Дегенерація хроматину, n (%)
		дифузної	фібрилярної	видимих бівалентів		
I група	20	12 ^a (60,0±10,9)	6 ^c (30,0±10,2)	1 ^d (5,0±4,8)	0 ^e	1 ^f (5,0±4,8)
II група	11	5 ^a (45,5±15,0)	4 ^c (36,4±14,5)	0 ^d	0 ^e	2 ^f (18,2±11,6)
III група	23	6 ^a (26,1±9,1)	8 ^c (34,8±9,9)	2 ^d (8,7±5,8)	2 ^e (8,7±5,8)	5 ^f (21,7±8,6)
IV група	16	2 ^b (12,5±8,2)	2 ^c (12,5±8,2)	0 ^d	1 ^e (6,3±6,0)	11 ^g (68,8±11,5)

Примітки: a:b; f:g – $p < 0,001$; критерій Ст'юдента

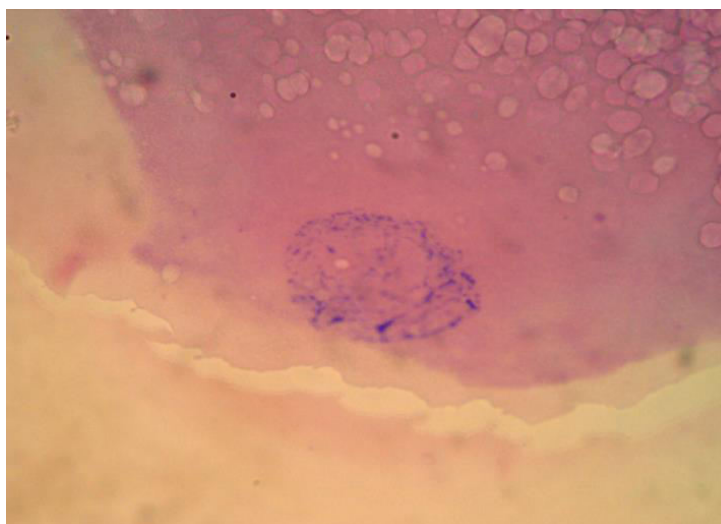


Рис. 3.57. Цитогенетичний препарат ооциту кози.

Стадія фібрилярної диплотени профазі I мейозу. Зб. об.100х, ок.10х.

В результаті проведених досліджень впроваджено метод зажиттєвого розподілу ооцит-кумулюсних комплексів, отриманих із яєчників кіз, за станом кумулюсу та ооплазми.

Встановлено, що хроматин більшості ооцит-кумулюсних комплексів, вилучених із яєчників кіз, перебуває на стадії диплотени профазі мейозу I, найбільша кількість хроматину у ооцитів кіз перебуває на стадії диплотени дифузної (36 %).

3.3.1. Аналіз популяцій ооцит-кумулюсних комплексів вилучених із яєчників кіз на різних фазах естрального циклу

Відомо, що у фізіологічно зрілої кози (12–18 місяців) загальна кількість фолікулів, отже і ооцитів, становить близько 28,6 тисяч [6]. Встановлено, що вік тварини та стадія статевого циклу на якому перебуває самиця, істотно впливають на рівень дозрівання *in vitro* яйцеклітин в овець [198] корів та кіз [56, 102, 109, 131].

Мета проведених досліджень – здійснити комплексний аналіз популяцій ооцит-кумулюсних комплексів, вилучених із яєчників кіз на різних фазах естрального циклу.

Для проведення досліджень були відібрані яєчники кіз на стадії фолікулярного росту ($n=4$) та на лютеїновій ($n=4$). Яєчники, вилучені із самок, які знаходились на стадії фолікулярного росту не мали ознак овуляції та без жовтих тіл. А яєчники на лютеїновій фазі мали сформовані жовті тіла (рис. 3.58, 3.59).



Рис. 3.58. Яєчники кози на фазі фолікулярного росту

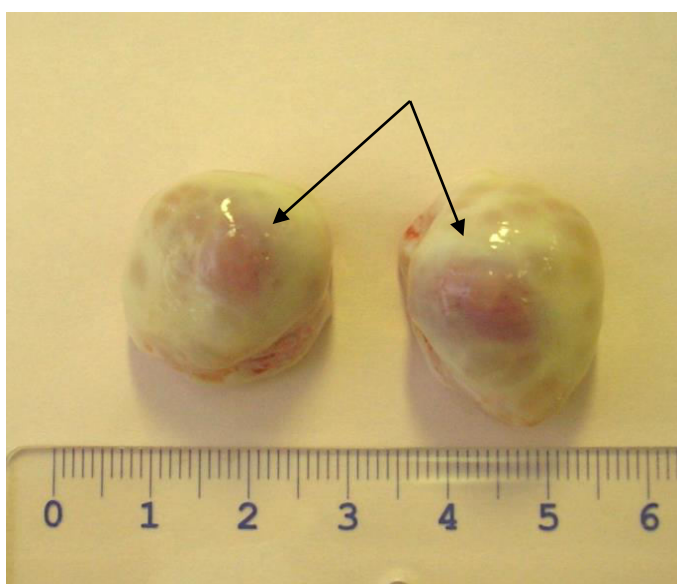


Рис. 3.59. Яєчники кози на стадії лютеїнової фази (стрілками вказані жовті тіла).

В результаті вилучення ооцитів з усіх досліджуваних яєчників ($n=8$) одержано 288 ОКК, при цьому з чотирьох яєчників на стадії фолікулярного росту одержали 179 ОКК, а з 4-х яєчників на лютеїновій фазі – 109 ОКК, тобто на 24,4 % менше, ніж із яєчників на стадії фолікулярного росту. Популяції ооцитів залежно від стану кумулюса та ооплазми, розподіляли, як і в попередніх дослідженнях, на чотири групи [15].

Морфологічною оцінкою популяцій ОКК встановлено, що придатних до культивування (I-ї – III-ї груп) ооцитів із яєчників на стадії фолікулярного росту вилучено на 16,7 % більше ніж із яєчників на лютеїновій фазі (рис. 3.60). Крім того в популяції ОКК вилучених із яєчників на лютеїновій фазі виявлено значно більшу кількість ($p < 0,01$) дегенерованих ооцитів (табл. 3.28).

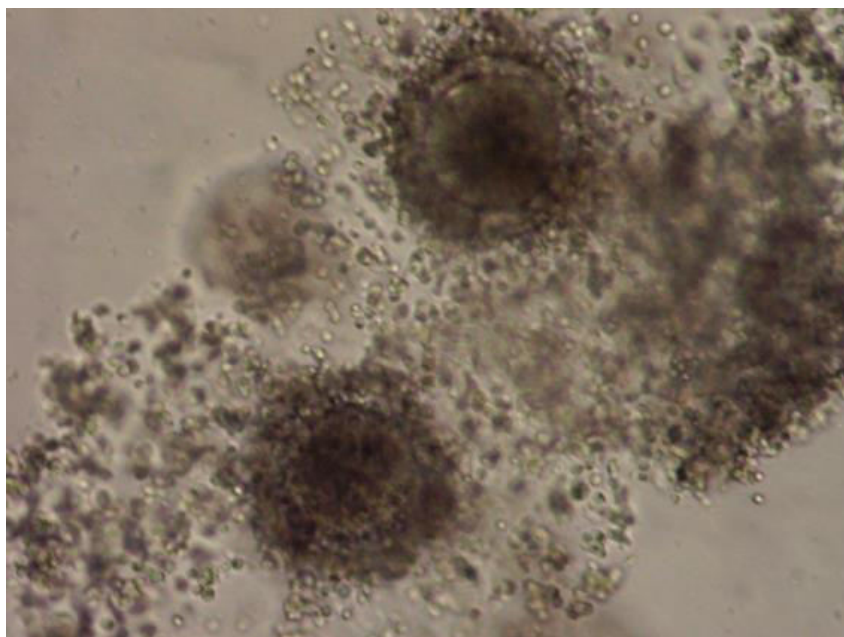


Рис. 3.60. Ооцити кози II-ї групи. Зб. об.10х, ок.10х.

Таблиця. 3.28.

**Морфологічний аналіз ооцит-кумулюсних комплексів вилучених
із яєчників кіз 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 <i>in vitro</i>
		I група, n (%)	II група, n (%)	III група, n (%)	IV група, n (%)
фолікулярна	179	75 ^a (41,9 ±3,6)	47 ^b (26,3±3,2)	31 ^c (17,3±2,8)	26 ^d (14,5±2,6)
лютеїнова	109	35 ^a (32,1±4,4)	29 ^b (26,6±4,2)	11 ^c (10,1±2,8)	34 ^c (31,2±4,4)

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

В отриманих на різних фазах естрального циклу ооцит-кумулюсних комплексах ми досліджували стан хроматину, шляхом аналізу виготовлених цитогенетичних препаратів.

Результати досліджень показали, що більшість ооцит-кумулюсних комплексів кіз, вилучених із яєчників на фолікулярній і лютеїновій фазах перебували на стадії диплотени. При цьому, найбільше гамет 49,0 %, вилучених із яєчників на фазі фолікулярного росту і 35,7 % ОКК із яєчників на лютеїновій фазі, перебували на стадії дифузної диплотени (табл. 3.29) .

Зміна структури хроматину на фібрилярну відбулась в середньому у 24,4 % ооцитів (рис. 3.61). З статистично вірогідною різницею ($p < 0,05$) більша кількість гамет (33,9 %) з ознаками дегенерації хроматину виявлена в популяції ОКК вилучених із яєчників на лютеїновій фазі. Не виявлено вірогідної різниці між популяціями ОКК в кількості ооцитів які перебували на стадії видимих бівалентів та метафазі II (рис. 3.62).

Таблиця 3.29.

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

Фази естрального циклу	Загальна кількість ОКК, n	Кількість ооцитів на стадії диплотени, n (%)			Метафази II, n (%)	Дегенера- ція хрома- тину, n (%)
		дифузної	фібри- лярної	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

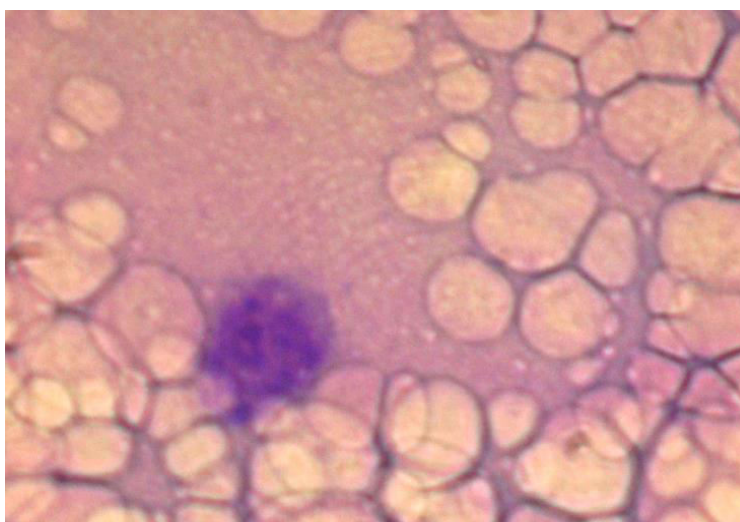


Рис. 3.61. Цитогенетичний препарат ооциту кози.

Стадія фібрилярної диплотени профазі I мейозу. Зб. об.100х, ок.10х.

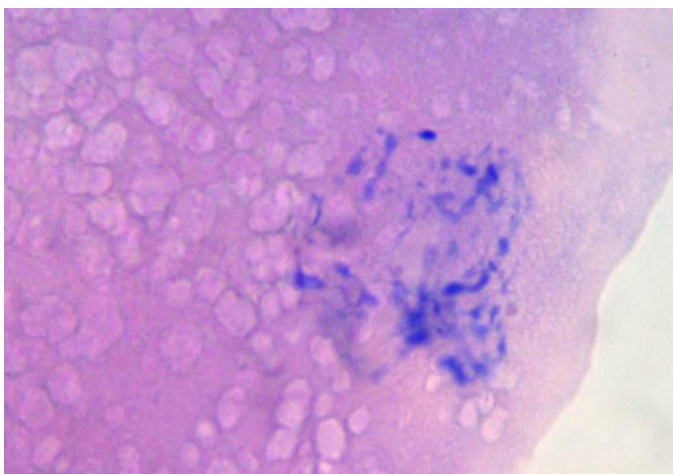


Рис. 3.62. Цитогенетичний препарат ооциту кози.

Стадія диплотени видимих бівалентів мейозу I. Зб. об.100х, ок.10х.

За результатами проведених досліджень встановлено, що як джерело ооцитів більш доцільним є використання яєчників кіз на стадії фолікулярного росту оскільки із їх яєчників можна вилучити більше на 15,9 % придатних до культивування поза організмом ооцитів і вірогідно меншу кількість дегенерованих гамет ($p < 0,05$).

3.3.2. Визначення оптимальних умов для дозрівання *in vitro* ооцит-кумулясних комплексів кіз

Вилучення ОКК із яєчників кіз та їх дозрівання в умовах *in vitro* є важливим біотехнологічним методом для одержання в необхідній кількості дешевого матеріалу для відпрацювання методик по отриманню ембріонів кіз поза організмом [118]. Очевидною перевагою методу вилучення і дозрівання поза організмом ооцитів кіз є швидкість процесу, велика кількість і якість ооцитів. [108].

Встановлено, що кількість ооцитів кіз дозрілих до метафази II при культивуванні 24 - 27 год. значно більша ніж при культивуванні 21 год. Відомо також, що рівень запліднення значно вищий за умови використання ооцитів, які культивували 24-27 годин, ніж тих, які культивували 21 годину або 30 годин [120].

Мета досліджень на даному етапі роботи визначення оптимальних часових параметрів для дозрівання ооцитів кіз поза організмом.

Для цього, виходячи із даних літератури, вибрали для культивування ооцитів три часові параметри – 24-ти 27-ти і 30-годинне культивування.

Критерієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільца (рис. 3. 63).

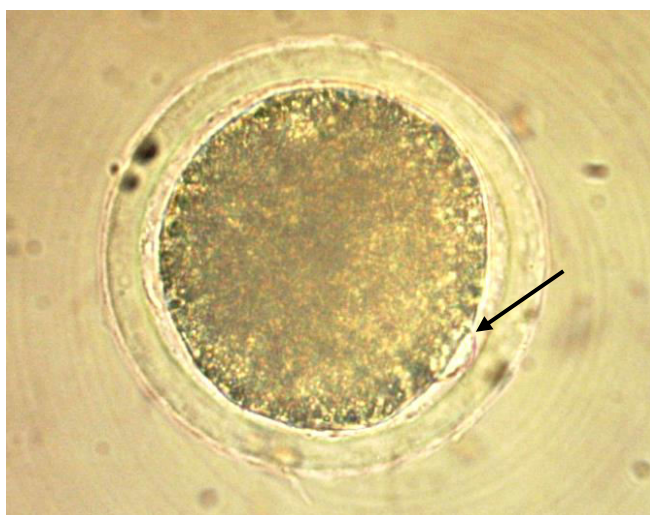


Рис. 3.63. Ооцит кози після культивування *in vitro*. Стрілкою вказано перше полярне тіло. Зб. об.10х, ок. 10х.

Для підтвердження морфологічної оцінки та визначення стану хроматину виготовляли цитогенетичні препарати. Аналізом цитогенетичних препаратів ооцитів, які культивували протягом 24 годин в умовах *in vitro* встановлено, що лише у 32,2 % ооцитів відбулось ініціювання мейозу і такі клітини перебували на стадії метафази I (рис. 3.64) і метафази II мейозу.

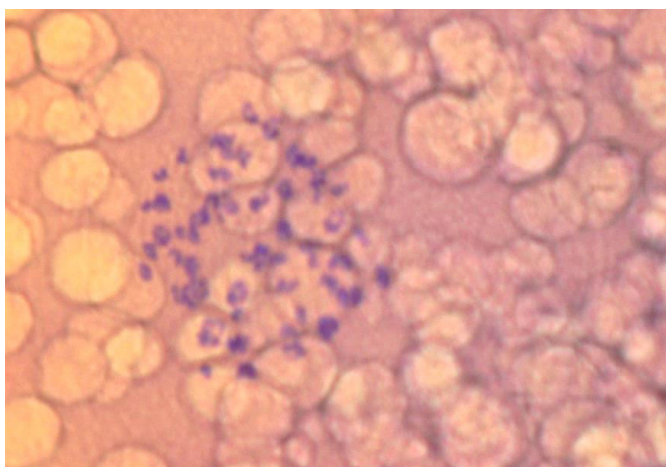


Рис. 3. 64. Цитогенетичний препарат ооциту кози після культивування (24 год.) *in vitro*. Стадія анафази метафази I мейозу. Зб. об.100х, ок.10х.

Решта ооцитів кіз 57,6 % залишалась на стадії диплотени (табл. 3.30). Отже, 24-годинне культивування незрілих ооцитів кіз забезпечує лише невеликий відсоток дозрівання в умовах *in vitro*, тому необхідно продовжити час культивування для досягнення стадії метафази II мейозу та забезпечення цитоплазматичного дозрівання.

Таблиця 3.30.

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

Час культивування ОКК (год.)	Кількість ооцитів, n	Ооцити на стадії					Ооцитів з дегенерованим хроматином, n (%)
		диплотени, n (%)			метафази I,	метафази II,	
		дифузної	фібрилярної	видимі біваленти	n (%)	n (%)	
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.

В наступних дослідженнях час культивування *in vitro* незрілих ооцитів кіз був подовжений до 27 годин. Культивування ооцитів кіз протягом 27 годин в умовах *in vitro* дозволило вірогідно підвищити ($p < 0,001$) рівень дозрівання. Стадії метафази II мейозу досягло 52,7 % ооцитів. На стадії диплотени через 27 години дозрівання в умовах *in vitro* залишилась вірогідно менша кількість гамет ($p < 0,05$), які не відновили мейотичні перетворення і залишилися на стадії диплотени дифузної 16, %, фібрилярної – 14,6 %.

При подовженні часу культивування до 30 годин відмічено зменшення кількості гамет, які перебували на стадії диплотени дифузної на 11,1 %, хоча дана різниця не вірогідна. Не встановлено вірогідної різниці за умови культивування 27 і 30 годин в кількості ооцитів, які досягли метафази II (рис. 3.65).

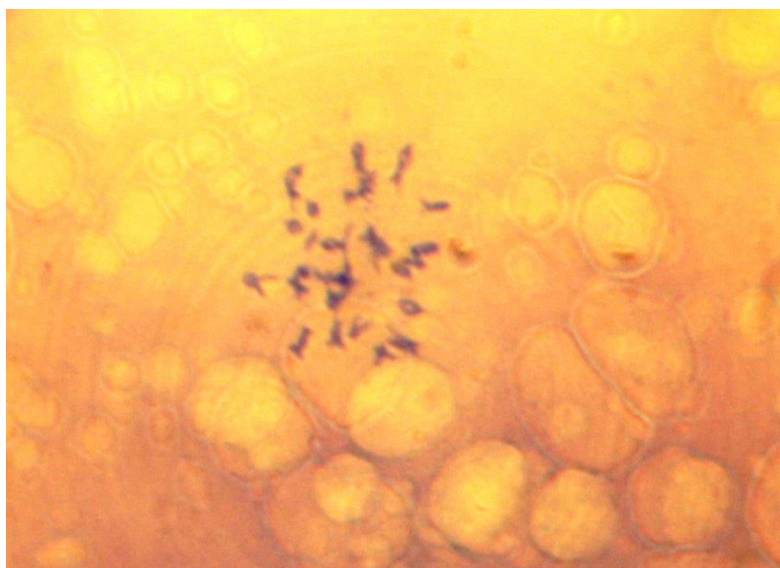


Рис. 3.65. Цитогенетичний препарат ооциту кози після культивування в умовах *in vitro* (27 год.) на стадії метафази II мейозу. Ідентифіковано гаплоїдний набір хромосом ($n = 30$). Зб. об.100х, ок.10х.

Кількість ооцитів із дегенерованим хроматином при культивуванні поза організмом протягом 24 та 27 годин майже не відрізнялась і становила 10,2 % і 9,1 % відповідно. При подовженні часу культивування до 30 годин

відмічено тенденцію до збільшення кількості ооцитів із дегенерованим хроматином на 10 %.

Отже, в результаті проведеного дослідження встановлено, що через 27 годин культивування більшість (52,7 %) ооцит-кумулюсних комплексів вилучених із яєчників кіз в підібраних умовах відновили мейотичні перетворення і досягли М II. При подовженні часу культивування до 30 годин вірогідної різниці у збільшенні кількості ооцитів, які досягли М II не відмічено. Але при цьому збільшилась на 10 % кількість ооцитів із дегенерованим хроматином, хоча дана різниця невірогідна це може в подальшому вплинути на здатність ооцитів до запліднення поза організмом.

Нині розроблені методи дозрівання ооцитів кіз поза організмом ще далекі від оптимальних і різко відрізняються за ефективністю. Це залежить від умов культивування та складу середовища для культивування ооцитів [73, 102]. Істотно впливає на дозрівання ооцитів кіз в *in vitro* і стадія циклу та вік тварини [147]. Завданням даного дослідження було порівняння рівня дозрівання *in vitro* популяцій ооцит-кумулюсних комплексів вилучених із яєчників кіз на різних фазах естрального циклу.

Для культивування *in vitro* відібрали 115 ОКК вилучених із яєчників кіз, 59 ОКК – I група вилучених із яєчників на стадії фолікулярного росту і 56 ОКК – II група вилучених із яєчників на лютеїновій фазі. Відібрані ооцити помістили в середовище TCM-199 на розчині Ерла, в яке додавали 20 % інактивованої еструсної сироватки корів та клітини гранульози вилучені з антральних фолікулів яєчників кози без ознак атрезії.

Через 27 годин культивування *in vitro* 55,1 % популяції ооцитів I-ї групи і 52,8 % ооцитів II-ї групи, відновили мейотичне дозрівання і досягли стадії ядерного дозрівання – метафази II мейозу (рис. 3.66).

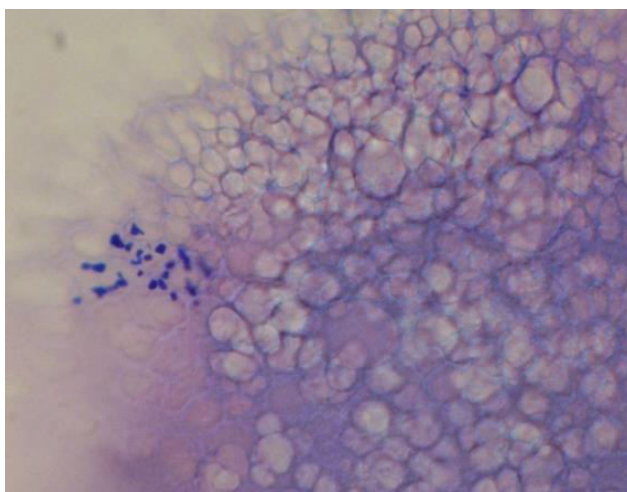


Рис. 3. 66. Цитогенетичний препарат ооциту кози після культивування *in vitro*. Ідентифіковано гаплоїдний набір хромосом ($n = 30$).

Зб. об.100х, ок.10х.

Кількість ооцитів, які не відновили мейотичне дозрівання і залишились на стадії диплотени, невелика в обох групах: в I-й групі – 13 % а в II-й лише 5,7 % (табл. 3.31). Це свідчить про ефективність застосованих умов для культивування ОКК кіз поза організмом.

Таблиця 3.31.

**Рівень дозрівання *in vitro* ооцит-кумулюсних комплексів
вилучених із яєчників кіз на різних фазах естрального циклу**

група ОКК	Кількість ооцитів, n	Ооцити на стадії			Кількість ооцитів з дегенерованим хроматином, n (%)
		диплотени, n (%)	метафази I, n (%)	метафази II, n (%)	
I група	69	9 ^a (13,0±4,0)	11 ^b (15,9±4,4)	38 ^c (55,1±5,9)	11 ^d (15,9±5,0)
II група	53	3 ^a (5,7±4,4)	5 ^b (9,4±4,0)	28 ^c (52,8±6,8)	17 ^e (32,1±6,4)

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

Встановлено вірогідну різницю ($p < 0,05$) між досліджуваними групами у кількості ооцитів з дегенерованим хроматином. У першій групі таких гамет на 16,2 % менше ніж у другій групі.

В результаті проведених досліджень вірогідної різниці у рівні дозрівання поза організмом між групами ооцитів, вилучених із яєчників кіз на стадії фолікулярного росту та на лютеїновій фазі не встановлено (55,1 % та 52,8 %). Але відмічено вірогідну різницю між групами в кількості ооцитів з дегенерованим хроматином ($p < 0,005$). У першій групі таких гамет на 16,2 % менше, ніж у другій групі.

РОЗДІЛ 4
АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ
ЕМБРІОНІВ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН *IN VITRO*
(обговорення отриманих результатів досліджень)

Впровадження перспективних інноваційних клітинних репродуктивних технологій у медицині і тваринництві потребує для досліджень велику кількість біологічно повноцінних нативних ембріонів. З етичних причин використання ооцитів людини для дослідницьких цілей сильно обмежене. Удосконалення і відпрацювання методик отримання ембріонів тварин різних видів дає змогу використовувати для вирішення завдань репродуктивної медицини не лише лабораторних тварин, а і тварин сільськогосподарського призначення.

Запліднення *in vitro* дозрілих в поживному середовищі ооцитів, вилучених із яєчників забитих тварин, є ефективним способом отримання ембріонів тварин. Удосконалення методів культивування ооцитів і ранніх ембріонів різних видів і порід сільськогосподарських тварин дає змогу отримувати ембріони у великій кількості, що необхідно для вирішення низки наукових і практичних питань.

У тваринництві методи роботи з ембріонами поза організмом мають велике значення у вирішенні низки наукових питань і практичних завдань, спрямованих на підвищення ефективності розведення тварин. До тих пір, поки дослідники не отримають в своє розпорядження достатню кількість ембріонів на ранніх стадіях розвитку, неможливо ґрунтовно займатись розробкою проблем клітинної і генної інженерії в тваринництві, оскільки отримати необхідну кількість ембріонів для цих цілей від природного запліднення дуже складно. Вирішити проблему отримання достатньої кількості ембріонів для досліджень дає змогу розробка техніки запліднення

in vitro і забезпечення перших стадій розвитку ембріонів ссавців, в тому числі і окремих видів сільськогосподарських тварин.

Нині найкраще розробленою і опрацьованою є методика отримання ембріонів великої рогатої худоби. Розроблені також методики отримання ембріонів поза організмом свиней, овець, коней. Однак, не дивлячись на те, що основні підходи до методу розроблені і про народження потомства із ооцитів, що дозріли *in vitro*, повідомляється у наукових публікаціях, вихід ооцитів на стадії метафази II залишається низьким порівняно із результатами, отриманими *in vivo*. Не знаючи фізіологію запліднення і не уявляючи механізмів мейотичних процесів у тварин, практично неможливо досконало оволодіти технікою запліднення *in vitro*.

Тому існує необхідність удосконалення наявних методичних підходів до одержання ембріонів поза організмом, зокрема спрямованих на створення оптимальних умов для їх розвитку *in vitro*, а саме таких як: складу середовища, культивування і температурного режиму, на основі результатів досліджень фізіологічних і цитоморфологічних характеристик динаміки оогенезу.

Для досліджень нами вибрані три види сільськогосподарських тварин – кролі, свині, кози. Вибір виду тварин мотивувався: доступністю тварин для досліджень (кролі), схожістю фізіології даного виду тварин з фізіологією людини (свині) і розширенням числа видів тварин, придатних для використання в якості модельних для репродуктивної біотехнології (кози).

Відомо, що в яєчниках вибрактованих тварин залишається невикористаним значний пул первинних ооцитів, нездатних до проліферації. Так, у одному яєчнику свині зберігається близько 120 тисяч ооцитів. З них за життя використовується лише невелика частина.

Аналізом джерел літератури встановлено, що із яєчників різних видів тварин можна вилучити різну кількість ооцитів. Проведені нами дослідження показали, що з одного яєчника свині можна отримати в середньому 32 ооцити, із одного яєчника кролиці – 20 ооцитів, кози – 44 ооцити.

Аналіз вилучених нами у кролів, свиней і кіз ОКК показав, що їх популяція неоднаково розподіляється по групах. В усіх трьох видів тварин найбільше отримано ооцитів 1 групи (І група – ооцити оточені щільним багат шаровим кумулюсом, із однорідною невакуолізованою ооплазмою). Приблизно однакову кількість ооцитів кролів і свиней віднесено до 2 і 3 груп, в той же час як кількість ооцитів кіз до 2 групи (ооцити оточені розпушеним шаром кумулюса та однорідною невакуолізованою ооплазмою) віднесено значно менше, а до третьої (ооцити, які частково втратили кумулюс, але з невакуолізованою однорідною ооплазмою) значно більше, ніж ооцитів кролів і свиней. Непридатних, атретичних, денудованих, з вакуолізованою ооплазмою до культивування ооцитів у свиней вилучено менше, ніж у кролів і кіз (рис. 4.1, 4.2, 4.3).

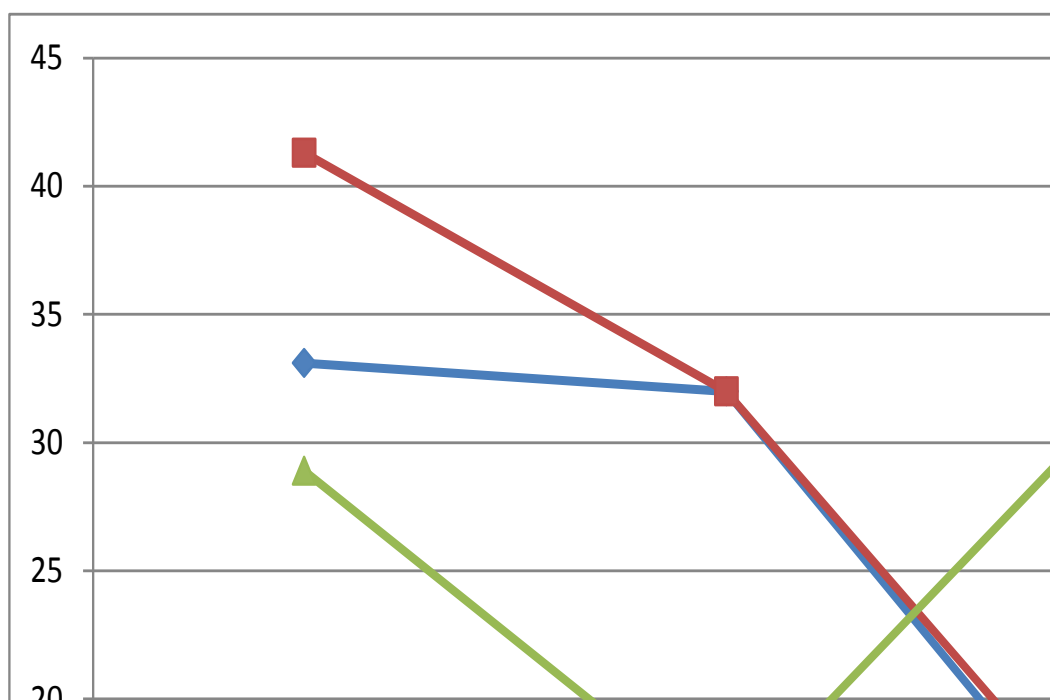


Рис. 4.1. Розподіл отриманих ооцитів кролів, свиней і кіз за групами

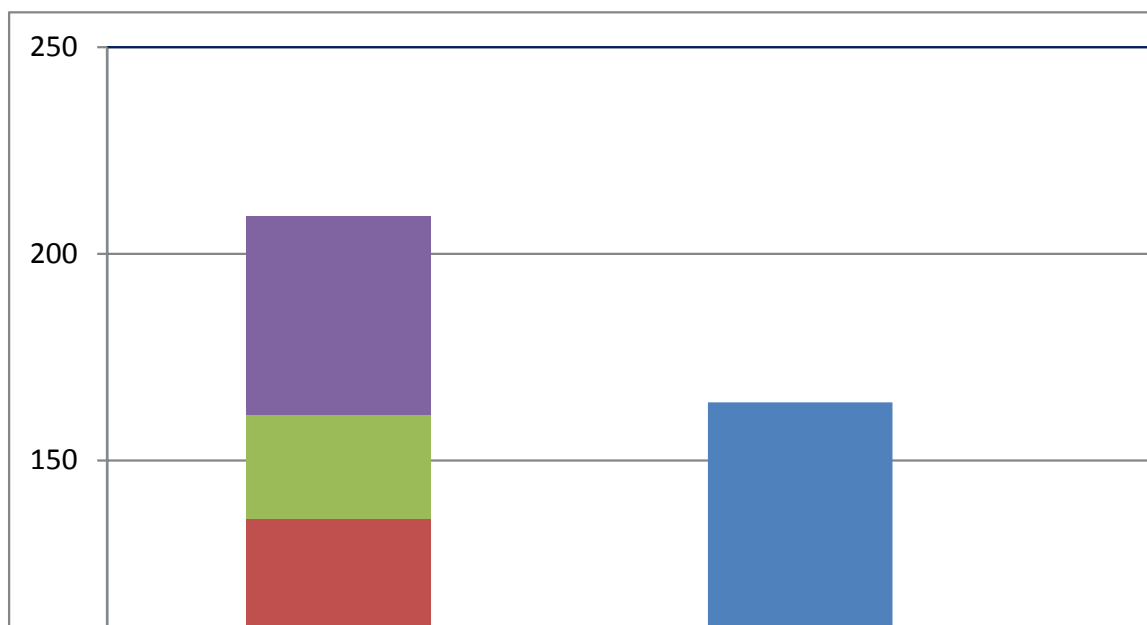


Рис. 4.2. Динаміка отримання ембріонів кролів *in vitro*

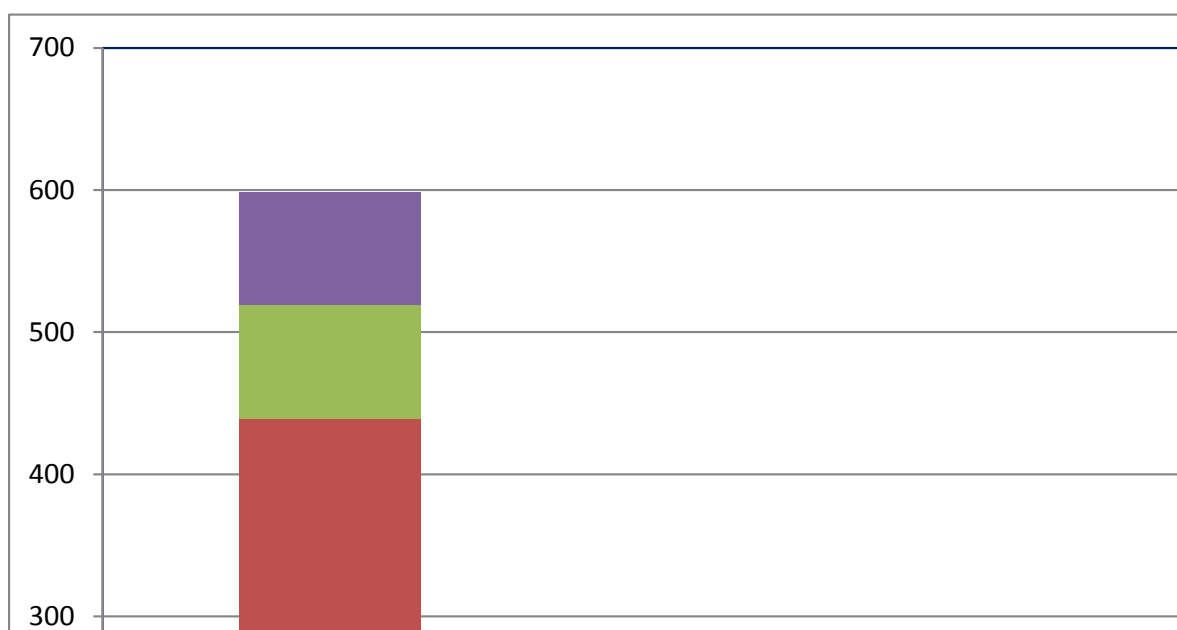


Рис. 4.3. Динаміка отримання ембріонів свиней *in vitro*

Важливим елементом технології отримання ембріонів тварин в умовах *in vitro* є досконале знання фізіологічних процесів у репродуктивній системі самок і їх використання для встановлення оптимального фізіологічного статусу самки як джерела незрілих ооцитів. Так, результатами проведених досліджень встановлено, що як джерело ооцитів більш доцільним є

використання яєчників кіз на стадії фолікулярного росту оскільки із їх яєчників можна вилучити більше на 15,9 % придатних до культивування поза організмом ооцитів і вірогідно меншу кількість дегенерованих гамет ($p < 0,05$) (рис. 4.4).

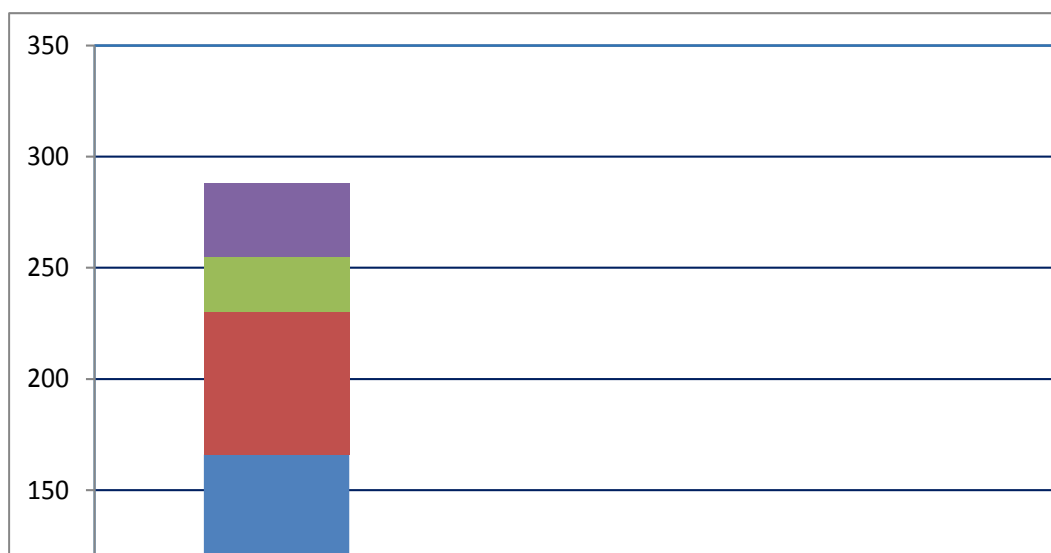


Рис. 4.4. Динаміка отримання дозрілих яйцеклітин кіз *in vitro*

Таким чином, отримані результати аналізу джерел ооцитів для отримання біологічно повноцінних ембріонів свідчать, що такий підхід придатний як для отримання і консервування ооцитів цінних тварин, які закінчили свій життєвий цикл, так і для накопичення генетичного матеріалу у вигляді ооцитів тварин зникаючих і автохтонних порід сільськогосподарських видів.

На питання – чи впливає порода тварини на кількість і якість отриманих ооцитів і їх подальший розвиток, за результатами експериментів можна стверджувати, що вплив породи на ці процеси відсутній. Встановлено відсутність вірогідної різниці у кількості і якості отриманих *in vitro* ембріонів свиней порід ландрас, велика біла, миргородська та порід кролів сірий велетень і метелик. Різниця у кількості отриманих ембріонів свиней від донорів трьох порід становить 7,2 %, кролів від донорів порід сірий велетень і метелик становить 5,6 %, що вказує на недостовірну різницю.

Велике значення в роботах *in vitro* має вибір середовища. Технології формування ембріонів в штучних умовах потребують в першу чергу пошуку оптимальних середовищ для культивування гамет і ембріонів сільськогосподарських тварин різних видів [53].

За повідомленнями багатьох дослідників, для культивування ооцитів і ембріонів сільськогосподарських тварин використовують культуральні синтетичні середовища – TC-199, HamF-10, Тіроде та інші. Для отримання повноцінних ембріонів у середовища, як правило, додають гормони ЛГ, ФСГ, естрадіол гомологічну сироватку крові, 10-20 % інактивованої нагріванням сироватки великої рогатої худоби.

В своїх дослідженнях у культивуванні *in vitro* для дозрівання ооцитів кролів, свиней і кіз нами використане середовище 199 на розчині Ерла з 20 % інактивованої нагріванням еструсної сироватки корів, 0,068 мг/мл канаміцину сульфату, 0,11 мг/мл пірувату натрію, 0,1 мг/мл глютаміну і клітини гранульози у кількості $3-5 \times 10^6$ на 1 мл. Такий склад середовища використовується у більшості лабораторій у роботах із запліднення ооцитів поза організмом. У своїх дослідженнях ми використали нову тенденцію у виборі умов культивування поза організмом – додавання у середовища наноматеріалів. Застосований для удосконалення середовищ культивування ооцитів та ембріонів поза організмом наноматеріал на основі високодисперсного кремнезему з розміром часток не більше 100 нанометрів ($1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$) використовується як складова різних лікарських засобів. Поверхня ВДК, завдяки здатності гідроксильних груп до заміщення різними сполуками і біомолекулами, дає змогу використовувати його як матрицю для синтезу похідних речовин. До подібних матриць можна віднести такі біополімери, як крохмаль, хітозан, циклодекстрин та високодисперсний кремнезем, які діють як стабілізатори і як відновлювальні агенти. Застосування біополімерів у виробництві наночастинок має кілька переваг порівняно зі звичайними синтетичними реагентами. Високомолекулярні ланцюги таких біополімерів з великим числом гідроксильних груп можуть

утворювати комплекси з цільовими молекулами, що дозволяє контролювати розмір, форму і дисперсність наночастинок що робить їх менш токсичними до клітин ссавців. Високодисперсний кремнезем має унікальний комплекс фізико-хімічних і медико-біологічних властивостей (висока сорбційна ємність до білків, токсинів, відсутність алергенної і шкідливої дії на клітини, активація репаративних процесів).

В своїх дослідженнях ми використали іммобілізований до поверхні високодисперсного кремнезему N – галактозамін. Галактозамін є похідним від гексозаміна галактози. Ці аміноцукри є складовою частиною деяких глікопротеїнових гормонів, таких як фолікулостимулюючий (ФСГ) і лютеїнізуючий (ЛГ) гормони. Інші цукрові компоненти ФСГ і ЛГ включають глюкозамін, галактозу і глюкозу. Саме ці гормони відіграють ключову роль в дозріванні яйцеклітин ссавців. Додавання такого наноконструкту призводить до екваїлібрації гормонального фону, що при дозріванні ооцитів ссавців поза організмом сприятиме покращенню культуральних середовищ для дозрівання і підвищення рівня дроблення ембріонів.

Результати свідчать про різний вплив використаних нами наноматеріалів в якості добавок для оптимізації середовищ з метою моделювання фізіологічних умов організму самки. Для дозрівання і запліднення ооцитів кролів і свиней *in vitro* у середовищах додавали наноматеріали ВДК t°C200, ВДК/D-галактозаміну ВДК/N-галактозу. Наноматеріал ВДК t°C200 в концентрації 0,001% у складі середовища стимулює процес дроблення зигот кролів і свиней та сприяє розвитку вірогідно більшої кількості їх ембріонів до передімплантаційних стадій розвитку. Наноматеріал ВДК/N-галактоза сприяє збільшенню рівня запліднення *in vitro* свиней на 11 % та рівню дроблення ембріонів на 31,7 %. Додавання у середовища наноматеріалу ВДК/D-галактозаміну не сприяло збільшенню виходу більшої кількості ембріонів, в той же час і не зафіксовано негативного впливу на рівень запліднення і розвиток ембріонів кролів в умовах *in vitro*.

Одним і з важливих елементів технології отримання *in vitro* повноцінних ембріонів тварин є визначення оптимальної тривалості культивування для їх дозрівання і для запліднення (табл. 4.1).

Таблиця 4.1.

**Порівняння тривалості культивування трьох видів тварин –
свиней, кіз і кролів**

Вид тварин	Власні дослідження			Дослідження інших авторів			джерело літератури
	тривалість культивування (годин) з метою:						
	дозрівання	запліднення	розвитку ембріонів	дозрівання	запліднення	розвитку ембріонів	
кролі	24	18	4-8 діб	22	18	6	Shiomi, M., 2009 . M. Zabetian, M. Tahmoorespur, Kh. Hosseini, 2011
свиня	46	18	4-8 діб	44	18	6	Кузьмина и др., 2013
коза	27	-	-	24	15-18	7	Wang Z. G., Xu Z.R., Yu S.D., 2007

Результати досліджень свідчать, що вилучені ооцити досліджених видів тварин – кролів, свиней та кіз в культуральних умовах у переважній більшості дослідів відновлювали мейотичний розвиток. У кролів і великої рогатої худоби процес дозрівання ооцитів поза організмом триває 24 години, у кіз – 27 годин, а у свиней майже вдвічі довше 44-48 годин.

Першими ознаками початку дозрівання ооцита є зміни в його ядрі. Формується діктіотенне ядро (або зародковий міхурець) Зникають ядерця і починається конденсація хроматину. Цитологічна картина послідовних етапів перетворення ядерного матеріалу в ооцитах досліджених нами видів тварин – кроля, свині і кози – схожа. На початку ініціації мейозу зі стадії діктіотени ядро ооцита втрачає оболонку і перетворюється в щільну

хроматинову масу. Хромосоми у ооциті, що дозріває, деспіралізуються і набувають структури типу «лампових щіток», що забезпечує їх високу генетичну активність. Це явище характерне для ссавців і є морфологічним виявом транскрибування генів. У кролів для ядра ооцита, що дозріває, характерний високий ступінь деспіралізації хромосом, через що в ядрі видно ядерцеподібні утворення [14]. При ретельному дослідженні у них виявляються хромосоми типу «лампових щіток». Як повідомляють інші дослідники, схожа картина спостерігається і у вищих ссавців. На стадії діктіотени ядерцеподібні структури, що відповідають хромосомам, добре помітні і при світловій мікроскопії.

Пізніше (через кілька годин культивування) в хроматиновій масі поступово розрізняються хромосоми, які починають утворювати метафазну пластинку. Протягом наступних кількох годин відокремлюється перше полярне тільце (телофаза I). Далі ооцит проминувши, очевидно, інтерфазу і типову профазу, переходить до прометафази II.

За даними літератури відомо, що у жіночих особин більшості видів ссавців перед народженням у яєчниках припиняються гонідіальні поділи і статеві клітини вступають у профазу I мейозу, де на стадії диплотени на довгий час зупиняють свій розвиток.

В ооциті ссавців, що вступив у фазу росту, хромосоми деспіралізуються і набувають вигляду лампових щіток, що забезпечує їх високу генетичну активність. Це явище притаманне не лише ооцитам нижчих хребетних, як вважалось раніше, де хромосоми типу лампових щіток є класичним об'єктом для вивчення морфологічного вияву транскрибування генів, а і для всіх ссавців і людини. Водночас у одних ссавців ступінь деспіралізації хромосом є більшою, ніж у інших.

Під час культивування ооцитів кролів (через 12 годин після початку культивування) нами на цитологічному препараті виявлено ядерцеподібні утворення в ооцитах кроля. Аналіз препаратів інших тварин, ооцити яких ми культивували, виявив схожу картину. Проведені іншими авторами

дослідження підтверджують отримані нами дані і пояснюють їх. Багато дослідників вважають, що оогенез приматів і гризунів відрізняється. Оогенез гризунів відрізняється від оогенезу приматів тим, що у останніх тривала діктіотенна стадія вклинюється між диплотоною і мейотичним поділом. Аргументами на користь цієї думки було те, що, на їх думку, в період росту ооцита у кролів і миші (гризунів) біваленти хромосом розрихлюються і набувають вигляд «лампових щіток». Деконденсація хромосом супроводжується утворенням рибонуклеїнового чохла навколо них. Ці ядерцеподібні тільца зв'язані з різними хромосомами, поступово ростуть і заповнюють частину каріоплазми ооцита. Далі під час конденсації хромосом на стадії кінця диплотени – початку діакінезу ядерцеподібні тільца відділяються від хромосом. У кролів «лампові щітки» появляються на стадії диплотени і досягають максимального розвитку

Тонка структура «лампових щіток» у кролів схожа з хромосомами ооцитів приматів та інших хребетних [52]. За даними інших авторів для ооцитів різних представників хребетних тварин (риби, амфібії, рептилії, птиці) характерним є розвиток на «лампових щітках» ядерцеподібних тілець [1]. Вони не містять РНК, тобто не є ядерцями. У ссавців виникнення на хромосомах ядерцеподібних тілець описано у в оогенезі норки, миші, кроля [14]. У гризунів у період перед ростом ооцита (стадія диплотени) формуються хромосоми типу «лампових щіток» і виявляються ядерцеподібні утворення. Відомо, що у жіночих особин більшості видів ссавців, у тому числі і кролиць, перед народженням у яєчниках припиняються гонідіальні поділи і статеві клітини вступають у профазу I мейозу, де на стадії диплотени на довгий час зупиняють свій розвиток. Стадія характеризується високою транскрипційною активністю хромосом типу «лампових щіток», морфологічним виявом функціональної активності яких є формування ядерцеподібних тілець, які мають крупні розміри і яких добре видно в світлооптичний мікроскоп. Дослідження ультраструктури ооцитів кролика (Зибіна, 1975) показали, що такі ядерцєродібні структури виникають у ядрі

ооцита з початком періоду його росту. На препаратах вони мають вигляд чітко окреслених округлих формувань темнішого ніж ооплазма ядра кольору. В своїх дослідженнях схожі структури виявлені нами у ядрах ооцитів кролів через 12 годин після початку культивування (рис. 4.5).

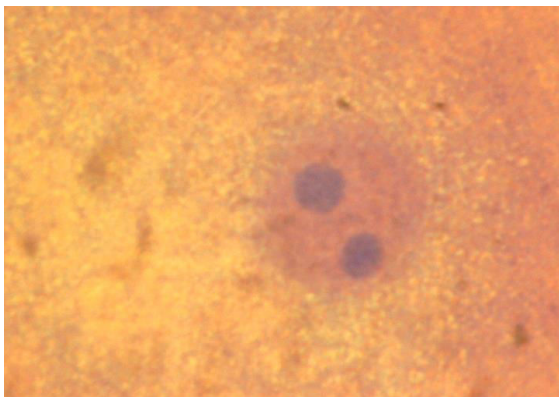


Рис. 4.5.Ооцит кроля після 12-годинного культивування

Отже, на основі отриманих нами даних у процесі дослідження дозрівання ооцитів і на основі літературних даних можна зробити висновок, що оогенез гризунів (кроля) не відрізняється від характеристик цього процесу у приматів і інших хребетних тварин. Таким чином використання кролів, як виду сільськогосподарських тварин в якості джерела ооцитів для репродуктивної біотехнології є перспективним.

Можливість отримання повноцінних ембріонів цінних тварин зникаючих і автохтонних порід сільськогосподарських видів вирішує складне питання їх збереження шляхом глибокого охолодження і розміщення у кріобанку. Теоретично одиницею збереження цінних генотипів сільськогосподарських тварин є алель. збереження алелів і генів тварин у вигляді (у формі) довготривалого зберігання гамет, ембріонів чи соматичних клітин за температури -196°C в рідкому азоті є обґрунтованим і раціональним. Зберігання ооцитів у кріобанку дозволяє законсервувати генетичний матеріал у формі гамет від жіночих особин і за потреби відновити їх для використання в програмах розвитку і збереження генофондових стад.

Збереження автохтонних порід у вигляді закритих популяцій обмеженої чисельності *in situ* та *ex situ* призводить до загрози виникнення інбредної депресії тварин внаслідок накопичення генетичного вантажу та зниження рівня загальної генетичної гетерогенності. В Україні на даний час налічується шість порід свиней місцевої селекції: миргородська, українська степова біла, українська степова ряба, полтавська м'ясна, українська м'ясна та червона білопояса. Однією із характерних автохтонних порід свиней України є миргородська [34, 3]. Оскільки миргородську породу віднесено до вітчизняного генофондового об'єкту, створення ооцитобанку є одним з пріоритетних напрямків роботи із збереження та відновлення чисельності тварин зникаючих автохтонних порід у свинарстві, що мають комплекс генів високої адаптивності до місцевих паратипових факторів [37].

Отже, існує необхідність розробки нових та удосконалення існуючих методів вилучення, культивування та прогнозованої оцінки придатності до тривалого збереження шляхом кріоконсервування ооцитів свиноматок, щоб за мінімальної кількості наявного генетичного матеріалу дозволяла досягти максимально раціонального його використання. Робота із збереження зникаючих автохтонних порід свиней вимагає розробки і застосування сучасних біотехнологічних та генетичних підходів. Такі підходи, як кріоконсервування ооцитів, сперми та ембріонів, забезпечують можливість у перспективі відновити необхідні види тварин та дозволяє реалізувати завдання щодо накопичення генетичного матеріалу з метою його довгострокового збереження [28, 5]. Ініціатором створення низькотемпературного генетичного банку статевих і соматичних клітин та зигот був Б.М. Вепрінцев, який запропонував поєднання прийомів кріоконсервації з методами біології розвитку. Перспективним для збереження генофонду тварин, які знаходяться на межі зникнення, і заслуговує на особливу увагу метод кріоконсервування яйцеклітин, дозрілих *in vitro* до стадії метафази II мейозу [5].

Якщо свині і кролі певною мірою є затребуваними для використання їх у біотехнологічних роботах, то кози привертають все більшу увагу в зв'язку

із реальною можливістю їх використання як біореакторів лікарських білків нового покоління. Наприклад, генетично модифіковані кози здатні продукувати молоко з білком лактоферином, функція якого полягає в захисті новонародженої дитини від кишкових хвороб до становлення в неї власного механізму захисту [153]. Також кози є більш зручним видом сільськогосподарських тварин для відпрацювання поточних біотехнологічних та генетичних методик, ніж велика рогата худоба завдяки меншій вибагливості до кормів і меншим затратам на утримання. Саме тому цей вид тварин ми використали в своїх дослідженнях та метою досліджень визначили аналіз результатів морфологічного та цитогенетичного дослідження ооцит-кумулюсних комплексів кіз, для їх подальшого ефективного застосування у біотехнологічних розробках. За результатами досліджень якості вилучених ооцитів кіз і їх біологічної повноцінності можна стверджувати, що даний біотехнологічний об'єкт є цілком перспективним і ефективним у розвитку репродуктивної біотехнології тварин.

Аналіз генетичних особливостей перетворень хроматину та хромосомних аберацій в мейозі дозволяє визначати оптимальні умови для культивування *in vitro* ооцитів різних видів сільськогосподарських тварин, що сприяє підвищенню ефективності їх дозрівання поза організмом.

Успішні розробки оптимальних методів запліднення *in vitro* незрілих ооцитів сільськогосподарських тварин можуть знайти своє практичне використання для біотехнологічних лабораторій в таких напрямках:

а) довготривале збереження генетичного матеріалу зникаючих порід і видів сільськогосподарських тварин і використання їх у селекційному процесі в перспективі;

б) тиражування цінних генотипів сільськогосподарських тварин і використання їх у селекційних програмах розвитку певної породи;

в) отримання біологічно повноцінних ембріонів тварин для експериментальної бази репродуктивної медицини.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено особливості цитоморфологічних характеристик ооцит-кумулюсних 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 вискодисперсного 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Арронет В. Н. Белковые гранулы и сферы в ядрах ооцитов рептилий / В. Н. Арронет // Цитология. – 1975. – Т.17, № 2. – С. 137–142.
2. Буркат В. П. Нанобиотехнологические методы для сохранения генофонда / В. П. Буркат, С. И. Ковтун, Н. П. Галаган // Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных : материалы междунар. науч.-практ. конф. – Дубровицы ; Быково. – 2007. – С. 450–452.
3. Бірта Г. О. Влияние генотипа на мясные качества свиней / Г. О. Бірта, Ю. Г. Бургу // Вісник Полтавської держ. аграр. акад. – 2012. – № 1. – С. 212–214.
4. Биофункциональные наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема, белка и аминокислот / Н. П. Галаган, Н. Ю. Клименко, И. Л. Орел [и др.] // Biopolymers and Cell. – 2010. – V. 26, № 3. – P. 205–213.
5. Вепринцев Б. Н. Стратегия сохранения животного и растительного мира земли / Б. Н. Вепринцев, Н. Н. Ротт // Консервация генетических ресурсов. – Пущино, 1991. – С. 47–62.
6. Ветеринарне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології : підручник / В. А. Яблонський, Г. М. Калиновський, М. І. Харенко [та ін.]. – Вінниця : Нова книга. – 2006. – 592 с.
7. Галаган Н. П. Вплив нанокompозиту з білком на життєздатність кріоконсервованих гамет кнурів / Н. П. Галаган, С. І. Ковтун, І. В. Грищенко // Матеріали ІХ Укр. біохімічного з'їзду. – 2006. – Т. 2 – С. 144–145.
8. Галаган Н. П. Наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема и биомолекул в средах с репродуктивными клетками / Н. П. Галаган // Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья :

материалы II Всерос. науч. конф. с междунар. участием. – Москва ; Белгород, 2006. – С. 55–59.

9. Галаган Н. П. Матеріали на основі високодисперсного кремнезему підвищують життєздатність клітин у біосередовищах / Н. П. Галаган, Т. В. Кулик, О. О. Чуйко // Укр. біохім. журн. – 2002. – № 74. – С. 204–205.

10. Генофонд свійських тварин України : навч. посібник / Д. І. Барановський [та ін.] ; за ред. проф. Д. І. Барановського та В. І. Герасимова. – Харків : Еспада. – 2005. – 400 с.

11. Динамика морфофункциональных изменений в стареющих яйцеклетках коров при пролонгированном культивировании in vitro / И. Ю. Лебедева, Г. Н. Сингина, А. В. Лопухов [и др.] // Цитология. – 2014. – Т. 56, № 1. – С. 57–65.

12. Дыбан А. П. Раннее развитие млекопитающих / А. П. Дыбан. – Л. : Наука. – 1988. – 228 с.

13. Эрнст Л. К. Генетические основы селекции сельскохозяйственных животных / Л. К. Эрнст. – М. : РАСХН, ВГНИИ животноводства. – 2004. – 736 с.

14. Зыбина Е. В. Ультраструктура ооцита кролика на стадии двухслойного фолликула / Е. В. Зыбина // Цитология. – 1975. – Т. 17, № 2. – С. 126–131.

15. Зюзюн А. Б. Морфологічний та цитогенетичний аналіз ооцит-кумуляусних комплексів кіз // Матеріали VI конференції молодих вчених та аспірантів / А. Б. Зюзюн ; Ін-т розведення і генетики тварин УААН. – с. Чубинське. – 2008. – С. 31–32.

16. Ковтун С. И. Влияние наноматериалов на получение эмбрионов свиней вне организма / С. И. Ковтун, Н. П. Галаган // Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья : материалы II Всерос. науч. конф. с междунар. участием. – М. ; Белгород. – 2006. – С. 106–109.

17. Ковтун С. І. Методика одержання доімплантаційних зародків великої рогатої худоби та свиней поза організмом / С. І. Ковтун,

Д. М. Басовський, Ю. В. Куновський // Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві : наук. зб. – К. : Аграр. наука, 2005. – С. 192–200.

18. Ковтун С. І. Збереження життєздатності епідидимальних сперматозоїдів кнурів / С. І. Ковтун, М. Г. Порхун // Наук.-техн. бюл. / УААН, Ін-т тваринництва. – Харків, 2006. – № 94. – С. 166–169.

19. Ковтун С. І. Методика отримання, короткотривалого зберігання і кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів бугаїв та кнурів / С. І. Ковтун Н. Я. Мелешко, О. В. Щербак // Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві : наук. зб. – К. : Аграр. наука, 2005. – С. 200–204.

20. Ковтун С. И. Успешное использование эпидидимальных сперматозоидов быков для получения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма // Використання сучасних молекулярно–генетичних і біотехнологічних розробок у генетико–селекційних дослідженнях : матеріали II Міжнар. конф. – К., 1998. – С. 106–107.

21. Ковтун С. І. Стан та перспективи використання епідидимальних сперматозоїдів сільськогосподарських тварин для одержання зародків *in vitro* / С. І. Ковтун, Н. Я. Мелешко, Ю. В. Куновський // Наук. праці Полтавської держ. аграр. акад. – 2002. – Т. 1 (20). – С. 122–124.

22. Комплексний аналіз генетичних закономірностей раннього ембріогенезу свиней різних порід / А. Б. Зюзюн, О. В. Щербак, С. І. Ковтун [та ін.] // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / Нац. акад. наук України – К. : Логос. – 2011. – Т. 10. – С. 220–224.

23. Культивирование созревших и оплодотворенных *in vitro* ооцитов в средах с клетками воспроизводительного тракта / Н. И. Смылова, Н. И. Сергеев, Т. Е. Тарадайкин [и др.] // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 1999. – № 2. – С. 47–49.

24. Кузнєцов В. Є. Біотехнологія у тваринництві // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть : у 4-х т. – К. : Логос. – 2001. – Т. 4 / гол. ред. В. В. Моргун. – С. 31–57.
25. Куновський Ю. В. Цитогенетичний аналіз різних груп незрілих ооцитів свиней / Ю. В. Куновський // Конференція молодих вчених та аспірантів / Ін-т розведення і генетики тварин УААН. – с. Чубинське. – 2003. – С. 31–32.
26. Куновський Ю. В. Отримання зародків свиней *in vitro* з використанням гамет самиць різного віку / Ю. В. Куновський, О. В. Щербак // Вісн. аграр. науки. – 2006. – № 6. – С. 78–79.
27. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
28. Лебедева Н. В. Измерение и оценка биологического разнообразия / Н. В. Лебедева. – Ростов-на-Дону : УПЛ РГУ. – 1999. – Ч. 2. – 41 с.
29. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / под ред. А. А. Чуйко. – К. : Наук. думка, 2003. – 415 с.
30. Молекулярно-генетичні та біотехнологічні дослідження в галузі тваринництва / Б. Є. Подоба, К. В. Копилов, С. І. Ковтун [та ін.]. – К. : Аграр.наука – 2013. – 248 с.
31. Нарушения мейоза при культивировании ооцитов коров / Л. К. Эрнст, А. К. Голубев, А. А. Янушка [и др.] // Цитология. – 1980. – Т. 22, № 4 – С. 475–477.
32. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Ф. И. Осташко. – К. : Урожай, 1978. – 255 с.
33. Оптимізація біотехнологічних підходів у системі збереження генофонду свиней миргородської породи / О. І. Метлицька, О. В. Щербак, С. І. Ковтун [та ін.] // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. – К. : Логос. – 2014. – Т. 15. – С. 107–112.
34. Програма збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року / заг. наук.

ред. І. В. Гузєва ; конс. та специф. Ю. В. Мельника. – К. : Арістей. – 2009. – 132 с.

35. Радилов А. С. Обеспечение безопасности разработки нанотехнологий, оборота наноматериалов и продукции на их основе : доклад на II Международном форуме по нанотехнологиям «Rusnanotech'08» / А. С. Радилов. – Санкт-Петербург. – 2008. – 34 с.

36. Рекомендації по одержанню ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* / [В. Є. Кузнєцов, М. Я. Єфіменко, І. Б. Кузнєцова, Б. Є. Подоба]. – К. : ТОВ "Міжнар. фін. агенція". – 1998. – 33 с.

37. Світовий генофонд свиней : монографія / В. І. Герасимов, М. Д. Березовський, В. М. Нагаєвич [та ін.] ; за ред. В. І. Герасимова, М. Д. Березовського та В. М. Нагаєвича. – Харків : Еспада. – 2006. – 520 с.

38. Справочник по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных / [Ф. В. Ожин, Г. В. Паршутин, И. И. Родин и др.] – М. : Россельхозиздат. – 1983. – 179 с.

39. 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.

40. Abeydeera L. R. In vitro production of embryos in swine / L. R. Abeydeera // Theriogenology. – 2002. – V. 57, N. 1. – P. 256–273.

41. Abilities of cumulus and granulosa cells to enhance the developmental competence of bovine oocytes during in vitro maturation period are promoted by midkine; a possible implication of its apoptosis suppressing effects / S. Ikeda, K. Saeki, H. Imai [et. al.] // Reproduction. – 2006. – V. 132 (4). – P. 549–57.

42. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies / H. Baldassarre, B. Wang, N. Kafdi [et al.] // Theriogenology. – 2002. – V. 57 – P. 275–284.

43. Advances in swine in vitro embryo production technologies / M. A. Gil, C. Cuello, I. Parrilla [et. al.] // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2010. – V. 45. – P. 40–48.
44. A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins / L. Jovine, H. Qi, Z. Williams [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2004. – V. 101 (16). – P. 5922–5927.
45. Aerts J. M. J. Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects / J. M. J. Aerts, P. E. J Bols // *Reprod Domest Anim*. – 2010. – V. 45. – P. 180–187.
46. Al-Katanani Y.M. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows / Y. M. Al-Katanani, F. F. Paula-Lopes, P. J. Hansen // *Journal of Dairy Science*. – 2002. – V. 85. – P. 390–396.
47. Apical structures and zona pellucida-domain proteins / S. Plaza, H. Chanut-Delalande [et. al.] // *Trends Cell Biology*. – 2010. – V. 20. – P. 524–532
48. Application of ovum pick-up, intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practice / S. Colleoni, S. Barbacini, D. Necchi [et al.] // *American Association of Equine Practitioners*. – 2007. – V. 53. – P. 554–559.
49. Age-associated changes in mouse oocytes during postovulatory in vitro culture possible role for meiotic kinases and survival factor / C. Tatone, M. C. Carbone, R. Gallo [et. al.] // *Biology of Reproduction*. – 2006. – V. 74. – P. 395–402.
50. Babcock D. P. Alterations in membrane permeability to Ca and their consequence during maturation of mammalian spermatozoa / D. P. Babcock, N. A. Lardy // *Membranes and Transp*. – 1982. – V. 1. – P. 671–676.
51. Bailey J. L. Factors regulating sperm capacitation / J. L. Bailey // *J. Systems Biology in Reproductive Medicine*. – 2010. – V. 56. – 334–348.

52. Baker T. G. The fine structure of oogonia and oocytes in the Rhesus monkey / T. G. Baker, L. L. Franchi // *Zs. Zellforsch.* – 1972. – V. 126. – P. 53–74.
53. Banwell K. M. In vitro maturation of mammalian oocytes: outcomes and consequences / K. M. Banwell, J. G. Thompson // *Semin. Reprod.* – 2008. – V. 26 – P. 162–174.
54. Beneficial Effect of Young Oocytes for Rabbit / D. Fuliang, J. Xu, J. Zhang [et. al.] // *Somatic Cell Nuclear Transfer Cloning Stem Cells.* – 2009. – V. 11 (1) – P. 131–140.
55. Bianchi E. Cross-species fertilization: the hamster egg receptor, juno, binds the human sperm ligand izumo 1 / E. Bianchi, G. J. Wright // *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* – 2014. – 370 p.
56. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised / D. F. Salamone, P. Damiani, R. A. Fissore [et. al.] // *Biology of Reproduction.* – 2001. – V. 64 – P. 1761–1768.
57. Birth of piglets after transferring of in vitro-produced embryos pre-matured with R-roscovitine / P. Coy, R. Romar, S. Ruiz [et. al.] // *Reproduction.* – 2005. – V. 129. – № 6. – P. 747–755.
58. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage / Y. Fukuda, M. Ichikawa, M. Naito [et al.] // *J. Biology of Reproduction.* – 1990. – V. 42. – P. 114–119.
59. Bleil J. D. Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity / J. D. Bleil, P. M. Wassarman // *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA.* – 1988. – V. 85, № 24 – P. 6778–6782.

60. Bormann C. L. The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential in vitro / C. L. Bormann, E. M. Onger, R. L. Krisher // *Theriogenology*. – 2003. – V. 59 – P. 1373–1380.

61. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes / P. J. Hendriksen, P. L. Vos, W. N. Steenweg [et. al.] // *Theriogenology*. – 2000. – V. 53. – P. 11–20.

62. Buffalo (*Bubalus bubalis*) pre-antral follicle population and ultrastructural characterization of antral follicle oocyte / R. G. Mondadori, T. R. Santin, A. A. Fidelis [et. al.] // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2010. – V. 45. – P. 33–37.

63. Breckett B. G. A review of bovine fertilization in vitro / B. G. Breckett // *Theriogenology*. – 1983. – V. 19, № 1. – P. 1–15.

64. Breckett B. G. In vitro fertilizing ability of testicular, epididymal, and ejaculated rabbit spermatozoa. B. G. Brackett, J. L. Hall, Y. K. Oh // *Fertility and Sterility*. – 1978. – V. 29. – P. 571–582.

65. Brackett B. G. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos / B. G. Brackett, K. Zuelke // *Theriogenology*. – 1993. – V. 39. – P. 43–64.

66. Campbell K. H. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer / K. H. Campbell, P. Loi // *Reviews of Reproduction*. – 1996. – V. 1. – P. 40–46.

67. Caprine blastocyst formation following intracytoplasmic sperm injection and defined culture in vitro / L. Keskindepe, P. Morton, S. E. Smith [et. al.] // *Zygote*. – 1997. – V.5. – P. 261–265.

68. Caracterización de los oocitos foliculares de la coneja Y SU capacidad para madurar in vitro / P. L. Lorenzo, P. G. Rebollar, M. I. Martín [et. al.] // *Archivos de zootecnia*. – 1996. – V. 45. – P. 25–35.

69. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency / F. Gandolfi, T. A. Brevini,

F. Cillo [et al.] // Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris). – 2005. – V. 24 (1). – P. 413–423.

70. Cervera R. P. Oocyte and nuclear donor cell type affect the technical efficiency of somatic cloning in rabbits / R. P. Cervera, F. Garcia-Ximenez // Zygote. – 2003. – V. 11. – P. 151–158.

71. Cervera R. P. Effects of the time interval between fusion and activation on in vitro rabbit nuclear transfer efficiency when nuclear donor cells are derived from older adults / R. P. Cervera, F. Garcia-Ximenez // Zygote. – 2004. – V. 12. – P. 133–141.

72. Current Technology for the Derivation of Pluripotent Stem Cell Lines from Human Embryos / K. Hasegawa, E. Jordan, M. Pomeroy [et. al.] // Cell Stem Cell – 2010. – V. 6. – P. 521–531.

73. Current status of embryo technologies in sheep and goat / Y. Cognie, G. Baril, N. Poulin [et al.] // Theriogenology. – 2003. – V. 59, №1. – P. 171–188.

74. Culture of in vitro fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rat liver (BRL) cells, or BRL-cell-conditioned medium / W. A. Reed, T. Suh, T. D. Bunch [et. al.] // Theriogenology. – 1996. – V. 45. – P. 439–449.

75. Collas P. Preparation of nuclear transplant embryos by electroportation / P. Collas, R. Fissore // Analytical Biochemistry. – 1993. – V. 208. – P. 1–9.

76. Collas P. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo / P. Collas, J. M. Robl // Biology of Reproduction. – 1990. – V. 43. – P. 877–884.

77. Collas P. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos / P. Collas, J. M. Robl // Biology of Reproduction. – 1991. – V. 45. – P. 455–465.

78. Contribution of the oocyte to embryo quality / M. A. Sirard, F. B. Richard, P. C. Blondin [et. al.] // Theriogenology. – 2006. – № 65. – P. 126. – 136.

79. Chang M. Fertilization of rabbit ova in vitro / M. Chang // *Nature*. – 1959. – V. 184, № 7 – P. 466.

80. Challah-Jacques M. Production of cloned rabbits by somatic nuclear transfer / M. Challah-Jacques, P. Chesne // *Cloning Stem Cells*. – 2003. – V. 5. – P. 295–299.

81. Cheng W.T.K. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes / W. T. K. Cheng, C. Polge, R. M. Moor // *Theriogenology*. – 1986. – V. 25. – 126 p.

82. Chesne P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells / P. Chesne, P. G. Adenot // *J. Nature Biotechnology*. – 2002. – V. 20. – P. 366–369.

83. Crozet N. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro / N. Crozet, M. Ahmed-Ali, M. P. Dubos // *J. Reproduction and Fertility*. – 1995. – V. 103. – P. 293–298.

84. Crozet N. B. Ultrastructure of in vivo fertilization in the goat / N. B. Crozet, M. C. Theron, P. E. Chemineua // *J. Gamete Research*. – 1987. – V. 18. – P. 191–199.

85. Cytoskeletal abnormalities in relation with meiotic competence and ageing in porcine and bovine oocytes during in vitro maturation / T. Somfai, R. Kikuchi, M. Kaneda [et. al.] // *Anatomia Histologia Embryologia*. – 2011. – V. 40. – P. 335–344.

86. Datta T. K. Comparative efficiency of three oocyte recovery methods from sheep ovaries / T. K. Datta, S. L. Goswami, S. K. Das // *Indian Journal of Animal Sciences*. – 1993. – V. 63 (11). – P. 1178–1179.

87. Development of goat embryos after in vitro fertilization and parthenogenetic activation by different methods / E. M. Onger, C. L. Bormann, R. E. Butler [et. al.] // *Theriogenology*. – 2001. – V. 55. – P. 1933–1945.

88. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery / J. Koeman,

C. L. Keefer, H. Baldassarre [et. al.] // *Theriogenology*. – 2003. – V. 60. – P. 879–889.

89. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro / M. Mattioli, M. L. Bacci, G. Galeati [et. al.] // *Theriogenology*. – 1989. – V. 31. – P. 1201–1207.

90. DNA synthesis in the fertilizing hamster sperm nucleus: sperm template availability and egg cytoplasmic control / S. J. Naish, S. D. Perreault, A. L. Foehner [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 1987. – V. 6 (1). – P. 245–53.

91. Dhawan A. Inhibition by human embryos of mouse granulosa cell progesterone production: development of a sensitive bioassay / A. Dhawan, M. C. Léveillé, B. C. Vanderhyden // *Human Reprod.* – 2000. – V.15. – P. 917–923.

92. Dinnyes A. Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblasts: effect of activation treatment and donor cell preparation / A. Dinnyes, Y. Dai // *Biology of Reproduction* – 2001. – V.64. – P. 257–263.

93. Differential development of rabbit embryos following microinsemination with sperm and spermatids / N. Ogonuki, K. Inoue, H. Miki [et. al.] // *Molecular Reproduction and Development*. – 2005. – V. 72. – P. 411–417.

94. Differences in the role of cAMP during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid / J. J. Parrish, J. Susko-Parrish, C. Uguz [et. al.] // *Biology of Reproduction*. – 1994. – V. 51. – P. 1099–108.

95. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study / F. J. Pomar, K. J. Teerds, A. Kidson [et. al.] // *Theriogenology*. – 2005. – V. 63. – P. 2254–2268.

96. Eckert J. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocyst of bovine oocytes in protein-free media / J. Eckert, H. Niemann. // *Theriogenology*. – 1995. – V. 43 (7). – P. 1211–1225.

97. Effect of dibutyryl cAMP on the cAMP content, meiotic progression, and developmental potential of in vitro matured pre-pubertal and adult pig oocytes / M. A. Bagg, M. B. Nottle, C. G. Grupen, [et al.] // *Molecular Reproduction and Development*. – 2006. – V. 73. – P. 1326–1332.

98. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes / H. Alm, H. Torner, S. Blottner [et al.] // *Theriogenology*. – 2001. – V. 56. – P. 817–829.

99. Effect of nanocomposites based of ultrafine silica on reproductive cells / N. P. Galagan, S. I. Kovtun, V. L. Osaulenko [et al.] // *Ukrainian–German Symposium on Nanobiotechnology*. – 2006. – P. 62.

100. Effect of Goat Follicular Fluid on in vitro Production of Embryos in Black Bengal Goats / S. A. Masudu Hoque, M. A. M. Yahia Khandoker, S. K. Kabiraj [et. al.] // *Iranian Journal Animal Science*. – 2012. – V. 2 (3). – P. 287–294.

101. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes / L. B. Live, Y. H. Choi, C. C. Love [et. al.] // *Theriogenology*. – 2003. – V. 59. – P. 765–774.

102. Effects on in vitro embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes / E. Rodriguez-Gonzalez, M. Lopez-Bejar, M. J. Mertens [et. al.] // *Molecular Reproduction and Development*. – 2003. – V. 65 – P. 446–453.

103. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows / S. M. Snijders, P E Dillon, D. C. Callaghan [et. al.] // *Theriogenology*. – 2000. – V. 53. – P. 981–989.

104. Effect of oocyte harvested techniques on in- vitro maturation and in-vitro fertilization in sheep / N. A. Wani, G. M. Wani, M. Z. Khan [et. al.] // *Small Ruminant Research*. – 2000. – V. 36. – P. 63–67.

105. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes / P. Wongsrikeao, O. Takeshige,

N. W. K. Karja [et. al.] // J. Reproduction and Development. – 2005. – V. 51. – P. 87–97.

106. Effects of cumulus cells on rabbit oocyte in vitro maturation / Y. Tao, C. Cao, M. Zhang [et. al.] // Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. – 2008. – V. 92, № 4. – P. 438–447.

107. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP on health and welfare of bovine offspring. / A. M. Van Wagendonk-de Leeuw, E. Mullaart, A. P. W. Roos [et. al.] // Theriogenology. – 2000. – V. 53. – P. 575–597.

108. Effect of oocyte harvested techniques on in- vitro maturation and in-vitro fertilization in sheep / N. A. Wani, G. M. Wani, M. Z. Khan [et. al.] // Small Ruminant Research. – 2000. – V. 36. – P. 63–67.

109. Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes / D. Izquierdo, P. Villamediana, M. Lopez-Bejar [et. al.] // Theriogenology. – 2002. – V. 57. – P. 1431–1441.

110. Effect of delayed insemination on in vitro fertilization, culture and transfer of human oocytes / A. O. Trounson, L. R. Mohr, C. Wood [et. al.] // J. Reprod Fertil. – 1982. – V. 64. – P. 284–294.

111. Embryo technologies in the horse / E. L. Squires, E. M. Carnevale, P. M. McCue [et. al.] // Theriogenology. – 2003. – V. 59. – P. 151–170.

112. Erickson B. H. Development And Radio-Response Of The Prenatal Bovine Ovary / B. H. Erickson // J. Reproduction and Fertility. – 1966. – V. 11. – P. 97–105.

113. Embryo production by ovum pick up from live donors / C. Galli, G. Crotti, C. Notari [et. al.] // Theriogenology. – 2001. – V. 55. – P. 1341–1357.

114. Erickson B. H. Radioresponse of Pre-puberal Porcine Ovary / B. H. Erickson // International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine. – 1967. – V 13. – P. 57–67.

115. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle / K. C. Silva-Santos, G. M. Santos, L. S. Siloto [et. al.] // *Theriogenology*. – 2011. – V. 76. – P. 1051–1057.

116. Fan J. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models / J. Fan, T. Watanabe // *J. Pharmacology and Therapeutics*. – 2003. – V. 99. – P. 261–282.

117. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro / Y. Fukui, L.T. Gowan, R. W. James [et. al.] // *J. Reprod. Fertil.* – 1991. – V. 92. – P. 125–131.

118. Factors influencing in-vitro embryo production efficiency of Caprine oocytes: A review / S. D. Kharche, P.Goel, B. K Jha [et. al.] // *Iranian Journal of Applied Animal Science*. – 2011. – V. 81 (4). – P. 344–361.

119. Factors affecting fertilization and embryonic development during intracytoplasmic sperm injection in pigs / M. Nakai, N. Kashiwazaki, J. Ito [et. al.] // *J. Reproduction and Development*. – 2011. – V.57. – P. 183–187.

120. Factors influencing in vitro fertilization in goats / Jia-Bo Zhou, W. U. Yan-Guang, L. Ming-Jiu [et. al.] // *J. Acta Zoologica Sinica*. – 2004. – V. 50, № 2. – P. 216–221.

121. Fertilization of bovine oocytes by injection of immobilized, killed spermatozoa / K. Goto, A. Kinoshita, Y. Takuma [et. al.] // *Veterinary Record*. – 1990. – V. 127. – P.517–520.

122. Fukui Y. In vitro development to blastocyst of in vitro matured and fertilised bovine oocyte / Y. Fukui, H. Ono // *Veterinary Record*. – 1988. – V. 122. – 282 p.

123. Gajda B. In vitro culture of pig embryos / B. Gajda // *Roczniki Naukowe Zootechniki*. – 1998. – V. 25. – P. 31–38.

124. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads / K. Hamano, X. Li, X. Q. Qian, [et. al.] // *Biology of Reproduction*. – 1999. – V. 60. – P. 1194–1197.

125. General topic: applications of transgenic rabbits in biomedical research based on literature search / S. Zhao, K. Wei, Q. Y. Yu [et. al.] // J. World rabbit science. – 2010. – V. 18, № 9. – P. 118–125.

126. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary / J. Johnson, J. Canning, T. Kaneko, [et. al.] // Nature. – 2004. – V. 430. – P. 1062–1062.

127. Gilchrist R. B. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro / R. B. Gilchrist, J. G. Thompson, // Theriogenology. – 2007. – V. 67. – P. 6–15.

128. Gordon I. Large-scale production of cattle embryos by in vitro culture methods / I. Gordon // Ag. Biotech. News and Inform. – 1989. – V. 13. – P. 345–348.

129. Glister C. Oocyte-mediated suppression of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-induced secretion of steroids and inhibin-related proteins by bovine granulosa cells in vitro: possible role of transforming growth factor α / C. Glister, N. P. Groome, P. G. Knight // Biology of Reproduction. – 2003. – V. 68. – P. 758–765.

130. Gougeon A. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women / A. Gougeon, R. Ecochard, C. J. Thalabard // Biology of Reproduction. – 1994. – V. 50. – P. 653–663.

131. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis / J. Dong, D. F. Albertini, T. R. Kumar [et. al.] // Nature. – 1996. – V. 383. – P. 531–535.

132. Heparin induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rpadenosine-35-cyclic monophosphorothioate / C. Uguz, W. L. Vredenburg, J. Susko-Parish [et. al.] // Biology of Reproduction. – 1994. – V. 51. – P. 1031–1039.

133. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOF medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol

with or without serum-proteins / P. Holm, P. J. Booth, M H. Schmidt [et. al.] // *Theriogenology*. – 1999. – V. 52. – P. 683–700.

134. Hirao Y. Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes in vitro / Y. Hirao // *Animal Science*. – 2011. – V. 82. – P. 187–197.

135. Hoshi H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer / H. Hoshi // *Theriogenology*. – 2003. – V. 59. – P. 675 – 685.

136. Hunter V. Oocyte maturation and ovum quality in pigs / V. Hunter // *J. Reviews of Reproduction*. – 2000. – V. 56. – P. 122–130.

137. Hunter R. H. F. Ovarian control of very low sperm/egg ratio at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy / R. H. F. Hunter // *Molecular Reproduction and Development* . – 1996. – V. 44. – P. 417–422.

138. Hussein A. M. A. Effect of sperm selection by percoll and swim up techniques on the sex ratio of rabbit offspring / A. M. A. Hussein // *Asian J. Animal Science*. – 2014. – V. 9 (1). – P. 1–6.

139. Hormonal-Regulation of the Differentiation of Cultured Ovarian Granulosa-Cells / A. J. W. Hsueh, E. Y. Adashi, P. B. C. Jones [et. al.] // *Endocrinology Reviews*. – 1984. – V. 5. – P. 76–127.

140. Hwang K. The sperm penetration assay for the assessment of fertilization capacity / K. Hwang, D. J. Lamb // *Methods in Molecular Biology* (Book search). – 2013. – V. 927. – P. 103–111.

141. In vitro technologies related to pig embryo transfer / K.-P. Brüssow, H. Torner, W. Kanitz [et al.] // *Reproduction Nutrition Development*. – 2000. – № 40. – P. 469–480.

142. In vitro production of porcine embryos: current status, future perspectives and alternative applications / T. Q. Dang-Nguyen, T. Somfai, S. Haraguchi [et al.] // *J. Animal Science*. – 2011. – V. 82. – P. 374–382.

143. In vitro culture of sheep oocytes matured and fertilized in vitro / Y. Fukui, A. M. Glew, F. Gandolfi [et al.] // *Theriogenology*. – 1988. – V. 29. – P. 883–891.

144. In vitro fertilization: four decades of reflections and promises / Y. Zhao, P. Brezina, C. C. Hsu [et. al.] // *J. Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – V. 1810. – P. 843–852.
145. In vitro fertilization of goat oocytes during the non-breeding season / S. Samaké, E. A. Amoah, S. Mobini, [et. al.] // *Small Ruminant Research*. – 2000. – V. 35 – P. 49–54.
146. Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update / E. Garcha-Roselly, E. Garcha-Mengual, P. Coy [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2009. – V.44. – P. 143–151.
147. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system / Z. B. Han, G. C. Lan, Y. G. Wu [et. al.] // *Reproduction*. – 2006. – V. 132. – P.749–758.
148. Iritani A. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture / A. Iritani, K. Niwa // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 1977. – V. 50. – P. 119–121.
149. Isolation and Characterization of Preantral Follicles from Fetal Bovine Ovaries / S. C. J. Hulshof, J. R. Figueiredo, J. F. Beckers [et. al.] // *Veterinary Quarterly*. – 1994. – V. 16. – P.78–80.
150. Juno is the egg izumo receptor and is essential for mammalian fertilization / E. Bianchi, B. Doe, D. Goulding [et al.] // *Nature*. – 2014. – V. 508. – P. 483–487.
151. Kane M. T. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology / Kane M. T. // *Animal Reproduction Science*. – 2003. – V. 79. – P. 171–190.
152. Katska-Ksiazkiewicz L. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats / L. Katska-Ksiazkiewicz, J. Opiela, B. Rynska // *Theriogenology*. – 2007. – V. 68. – P. 736–744.

153. Keefer C. L. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models / C. L. Keefer. // *Anim. Reprod. Sci.* – 2004. – V. 82. – P. 5–12.
154. Keefer C. L. Cleavage development of bovine oocytes fertilized by sperm injection / C. L. Keefer, A. L. Younis, B. G. Bracket // *Molecular Reproduction and Development.* – 1990. – V. 25. – P. 281–285.
155. Kitajima S. E. Rabbit Biotechnology rabbit genomics, transgenesis, cloning and models / S. E. Kitajima, J. Liu // *World Rabbit Science.* – 2009. – V. 5, № 6. – P. 37–48.
156. Kinetics of Follicle Growth in the Prepubertal Gilt / D. E. Morbeck, K. L. Esbenshade, W. L. Flowers [et al.] // *Biology of Reproduction.* – 1992. – V. 47. – P. 485–491.
157. Koering M. J. Cyclic changes in ovarian morphology during the menstrual cycle in *Macaca mulatta* / M. J. Koering // *American journal of anatomy.* – 1969. – V. 126. – P. 73–101.
158. Kolbe T. Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) / T. Kolbe, W. Holtz // *Animal Reproduction Science.* – 2000. – V. 64. – P. 97–101.
159. Kosenyuk Y. Nuclear transfer in rabbit: the state of the art / Y. Kosenyuk // *Annals of Animal Science.* – 2006. – № 1. – P. 109–122.
160. Krisher R. L. The effect of oocyte quality on development / R. L. Krisher // *Journal of Animal Science.* – 2004. – № 82. – P. 14–23.
161. Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC / R. Yao, I. Chizuru, Y. Natsume [et. al.] // *J. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* – 2002. – V. 99. – P. 11211–11216.
162. Land R. B. Number Of Oocytes Present At Birth In The Ovaries Of Pure And Finnish Landrace Cross Blackface And Welsh Sheep / R. B. Land // *J. Reprod Fertil.* – 1970. – V. 21. – P. 517–521.
163. Li S. Rabbits generated from fibroblasts through nuclear transfer / S. Li, X. Chen // *Reproduction.* – 2006. – V. 131. – P. 1085–1090.

164. Lee J. H. Effects of enucleation and caffeine on maturation-promoting factor (MPF) and mitogenactivated protein kinase (MAPK) activities in ovine oocytes used as recipient cytoplasts for nuclear transfer / J. H. Lee, K. H. Campbell // *Biology of Reproduction*. – 2006. – V. 74. – P. 691–698.

165. Lonergan P. C. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro / P. C. Lonergan, P. H. Monaghan, D. F. Rizos // *Molecular Reproduction and Development*. – 1994. – № 37. – P. 48–53.

166. Lonergan P. C. State-of-the-art embryo technologies in cattle / P. C. Lonergan // *Society of Reproduction and Fertility supplement Journal's*. – 2007. – V. 64. – P. 315–325.

167. Lonergan P. C. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts / P. C. Lonergan, T. Fair // *Theriogenology*. – 2008. – V. 69. – P. 17–22.

168. Long C. R. In vitro production of pig embryos: comparison of culture media and boars / C. R. Long, J. R. Dobrinsky, L. A. Johnson // *Theriogenology*. – 1999. – V. 51. – P. 1375–1390.

169. Lucy M. C. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement / M. C. Lucy // *Reproduction Supplements*. – 2007. – № 64. – P. 237–254.

170. Martimbeau S. Physiological cell death in endocrine-dependent tissues: an ovarian perspective / S. Martimbeau, J. L. Tilly // *Clinical Endocrinology*. – 1997. – V. 46. – P. 241–254.

171. Markert C. L. Fertilization of mammalian eggs by sperm injection / C. L. Markert // *Journal of Experimental Zoology*. – 1983. – V. 228, №2. – P. 195–201.

172. Mattioli M. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation / M. Mattioli, G. Galeati, E. Seren // *Gamete Research*. – 1988. – V. 20. – P. 177–184.

173. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different system / P. Coy, S. Ruiz, R. Romar [et. al.] // *Theriogenology*. – 1999. – V. 51. – P. 799–812.

174. Merchant-Larios H. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary / H. Merchant-Larios, J. Chimal-Monroy // *Progress in Clinical and Biological Research*. – 1989. – V. 296. – P. 55–63.

175. Miyano T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows / T. Miyano // *Theriogenology*. – 2003. – V. 59. – P. 61–72.

176. Miyano T. Oocyte growth and acquisition of meiotic competence / T. Miyano, N. Manabe // *Society for Reproduction and Fertility*. – 2007. – V. 63. – P. 531–538.

177. McGrath S. A. Oocyte specific expression of growth/differentiation factor-9 / S. A. McGrath, A. F. Esquela, S. J. Lee // *Molecular Endocrinology*. – 1995. – V. 9. – P. 131–136.

178. Morrell J. M. Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency / J. M. Morrell, H. Rodriguez-Martinez // *Veterinary Medicine International*. – 2010. – V. 2011. – P. 9.

179. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens / J. O. Carrijo, A. P. Marinho, A. A. Campos [et al.] // *Cells Tissues Organs*. – 2010. – V. 191. – P. 152–160.

180. Notarianni E. Reinterpretation of evidence advanced for neo-oogenesis in mammals, in terms of a finite oocyte reserve / E. Notarianni // *J. Ovarian Research*. – 2011. – V. 4. – P. 1–20.

181. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development / M. Orisaka, K. Tajima, B. K. Tsang [et al.] // *J. Ovarian Research*. – 2009. – V. 2 (9). – P. 1–7.

182. Oocyte aspiration for in vitro embryo production in farm animals / J. A. Carter, M. Meintjes, M. S. Bellow [et al.] // *Louisiana Agriculture Magazine*. – 2000. – V. 43. – P. 8–10.

183. Oocyte aging cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility / Y. L. Miao, K. Kikuchi, Q. L. Sun [et al.] // Human Reproduction Update. – 2009. – V. 15. – P. 573–585.

184. Parks J. E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation / J. E. Parks, E. Ehrenwald // Fertilization in mammals. Norwell MA: Sereno Symposia USA. – 1990. – P. 155–167.

185. Paramio M. T. *In vivo* and *in vitro* embryo production in goats / M. T. Paramio // Small Ruminant Research. – 2010. – V. 89. – P. 144–148.

186. Peters H. The development and maturation of the ovary / H. Peters // Annales de biologie animale, biochimie, biophysique. – 1976. – V. 16. – P. 271–278.

187. Penetration of human spermatozoa through the zona pellucida of nonviable human oocytes / S. E. Lanzendorf, S. Oehninger, R. Scott [et al.] // Journal of the Society for Gynecologic Investigation. – 1994. – V. 1, № 1. – P. 69–73.

188. Picton H. M. Maintenance of oestradiol production and expression of cytochrome P-450 aromatase enzyme mRNA in long-term serum-free cultures of pig granulosa cells / H. M. Picton, B. K. Campbell, M. G. Hunter // Journal of Reproduction and Fertility. – 1999. – V. 115. – P. 67–77.

189. Picton H. M. Activation of follicle development: The primordial follicle / H. M. Picton // Theriogenology. – 2001. – V. 55. – P. 1193–1210.

190. Pincus G. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs *in vivo* and *in vitro* : I. The Activation of Ovarian Eggs / G. Pincus, E. V. Enzmann // J. Experimental Medicine. – 1935. – V. 62. – P. 665–675.

191. Peters H. The Ovary: A Correlation of Structure and Function in Mammals. In Morphology of the ovary / H. Peters, K. P. Natty // 1st edition. Great Britain: Granada Publishing. – 1980. – P. 12–35.

192. Peters H. The development of the mouse ovary from birth to maturity / H. Peters // Acta Endocrinologica. – 1969. – V. 62. – P. 98–116.

193. Prather R. S. Nuclear control of early embryonic development in domestic pigs / R. S. Prather // *J. Reprod. Fertil.* – 1993. – V. 48. – P. 17–29.

194. Prepubertal goat oocytes from large follicles result in similar blastocyst production and embryo ploidy than those from adult goats / R. Romaguera, X. Moll, R. Moraty [et. al.] // *Theriogenology*. – 2011. – V. 76 – P. 1–11.

195. Qualitative and quantitative analysis of goat ovaries, follicles and oocytes in view of in vitro production of embryos / M. R. Islam, M. A. M. Y Khandoker, S. Afroz [et al.] // *Journal of Zhejiang University science B.* – 2007. – V. 8 (7) – P. 465–469.

196. Rajikin M. H. Ultrastructural studies of developing goat oocytes in vitro / M. H. Rajikin, M. Yusoff, R. B. Abdullah // *Theriogenology*. – 1994. – V. 42. – P. 1003–1016.

197. Rahman A. N. M. A. Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured goat oocyte with abnormal ooplasmic morphology / A. N. M. A. Rahman, R. B. Abdullah, W. E. Wan Khadijah // *Proceedings of the 28th Malaysian Society of Animal Production Annual Conference, May 29-31, Kuching, Malaysia.* – 2007. – P. 59–60.

198. Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes / G. G. Leoni, D. Bebbere, S. Succu [et. al.] // *Molecular Reproduction and Development.* – 2007. – V. 74. – P. 249–257.

199. Requirements for bovine oocyte maturation in vitro / R. B. Stubbings, R. M. Liptrap, K. L. Betteridge [et. al.] // *Reproduction in Domestic Animals.* – 1990. – V. 25, № 4. – P. 158–166.

200. Richards J. S. Hormonal control of gene expression in the ovary / J. S. Richards // *J. Endocrine Reviews.* – 1994. – V. 15. – P. 725–751.

201. Rho G. J. Comparisons of oocyte maturation times and three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro / G. J. Rho, A. C. Hahnel, K. J. Betteridge // *Theriogenology*. – 2001. – V. 56. – P. 503–516.

202. Schenk S. L. Das Säugetierei Künstlich befruchtet ausserhalb des Muttertieres Mittheilungen aus dem Embryologischen / S. L. Schenk // Institute der Kaiserlich-Königlichen Universität in Wien. – 1878. – P. 1–107.

203. Sirard M. A. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes / M. A. Sirard // Journal of Assisted Reproduction. – 2011. – V. 28. – P. 483–488.

204. Sirard M. A. Activation of the embryonic genome / M. A. Sirard // Society for Reproduction and Fertility. – 2010. – V. 67. – P. 145–158.

205. Shiomi M. Rabbit as a model for the study of human diseases / M. Shiomi // World Rabbit Science. – 2009. – V. 7, № 1. – P. 49–53.

206. Structural characterization of fish egg vitelline envelope proteins by mass spectrometry / C. C. Darie, M. Miniossek, L. Jovine [et. al.] // Biochemistry. – 2004. – V. 43 (23). – P. 7459–7478.

207. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages / C. M. Lucci, C. A. Amorim, A. P. R. Rodrigues [et. al.] // Animal Reproduction Science. – 1999. – V. 56. – P. 223–236.

208. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation / E. Markstrom, E. Svensson, R. Shao [et. al.] // Reproduction. – 2002. – V. 123 (1). – P. 23–30.

209. Tao T. Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8-, and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured in vitro / T. Tao, H. Niemann // Human Reproduction. – 2000. – V. 15. – P. 881–889.

210. Tarkowski A. K. An air – drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A. K. Tarkowski // Cytogenetics. – 1966. – V. 5, № 3. – P. 394–400.

211. Teotia A. Fertilization and development of caprine oocytes matured over granulosa cell monolayers / A. Teotia, G. T. Sharma, A. C. Majumdar // Small Ruminant Research. – 2001. – V. 40. – P. 165–177.

212. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes *in vitro* / L. Keskinetepe, G. M. Darwish, A. T. Kenimer [et. al.] // *Theriogenology*. – 1994. – V.42. – P. 527–535.

213. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins / L. Jovine, H. Qi, Z. Williams [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2002. – V. 4 (6). – P. 457–461.

214. Thadani V. M. A study of hetero-specific sperm-egg interactions in the rat, mouse, and deer mouse using *in vitro* fertilization and sperm injection / V. M. Thadani // *J. Exp Zool*. – 1980. – V. 212. – P. 435–453.

215. Thibault C. Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation / C. Thibault, M. Gerard, Y. Menezo // *J. Reprod Fertil*. – 1975. – V. 45. – P. 606–610.

216. Thibault C. Acquisition par l'ovocyte de lapine et de veau du facteur de decondensation du noyau du spermatozoïde fécondant (MPGF) / C. Thibault, M. Gerard, Y. Menezo // *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*. – 1975. – V. 15. – P. 705–714.

217. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs / N. Inoue, M. Ikawa, A. Isotani [et. al.] // *Nature*. – 2005. – V. 434. – P. 234–238.

218. The *in vitro* and *in vivo* development of goat embryos produced by intracytoplasmic sperm injection using tail-cut spermatozoa / B. Wang, H. Baldassarre, J. Pierson [et. al.] // *Zygote*. – 2003. – V. 11. – P. 219–227.

219. Tibary A. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids / A. Tibary, A. A. Anouassi, H. Khatir // *Theriogenology*. – 2005. – V. 64. – P. 618–638.

220. Transgenic goats produced by DNA pronuclear microinjection of *in vitro* derived zygotes / B. Wang, H. Baldassarre, T. Tao [et. al.] // *Molecular Reproduction and Development*. – 2002. – V. 63. – P. 437–443.

221. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition / C. Vigneault, S. McGraw, L. Massicotte [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 2004. – V. 70. – P. 1701–1709.

222. Uehara T. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. Parrish / T. Uehara, R. Yanagimachi // *Biology of Reproduction*. – 1976. – V. 15. – P. 467–470.

223. Uehara T. Behavior of nuclei of testicular, caput and cauda epididymal spermatozoa injected into hamster eggs / T. Uehara, R. Yanagimachi // *Biology of Reproduction*. – 1977. – V. 16. – P. 315–321.

224. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals / F. Paulini, R. C. Silva, J. L. Jivago [et al.] // *J. Ovarian Research*. – 2014. – V. 7 (102). – P. 1–12.

225. Up date of *in vitro* production of porcine embryos / T. Nagai, H. Funahashi, K. Yoshioka [et al.] // *Frontiers in Bioscience*. – 2006. – V. 1. – P. 2565–257.

226. Use of zona free hamsters ova to assess sperm fertilizing ability of bull and stallion / B. G. Brackett, M. A. Cofone, M. L. Boice [et al.] // *Gamete Research*. – 1982. – V. 5. – P. 217–227.

227. VanWezel I. L. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo / I. L. VanWezel, R. J. Rodgers // *Biology of Reproduction*. – 1996. – V. 55. – P. 1003–1011.

228. Wang J. In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement / J. Wang, M. V. Sauer // *J. Therapeutics and Clinical Risk Management*. – 2006. – V. 2, № 4. – P. 355–364.

229. Wassarman P. M. The strange case of sperm protein 56 / P. M. Wassarman // *Bio Essays*. – 2009. – V. 31. – P. 153–158.

230. Wassarman P. M. Egg's ZP3 structure speaks volumes / P. M. Wassarman // *Cell*. – 2010. – V. 143. – P. 337–338.

231. Wassarman P. M. The sperm's sweet tooth / P. M. Wassarman // *Science*. – 2011. – V. 233. – P. 1708–1709.

232. Watson A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence / A. J. Watson // *Journal of Animal Science*. – 2007. – V. 85. – P. 11–13.

233. Yanagimachi R. Mammalian fertilization / R. Yanagimachi // *Physiology of reproduction*. – 1994. – P. 189–317.

234. Yanagimachi R. Physiological changes in the postnuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells / R. Yanagimachi, Y. D. Noda // *J. Ultrastructure Research*. – 1970. – V. 31. – P. 486–493.

235. Yanagimachi R. Ultrastructural changes in the hamsterspermhead during fertilization / R. Yanagimachi, Y. D. Noda // *J. Ultrastructure Research*. – 1970. – V. 31. – P. 465–485.

236. Younis A. I. Fertilization of bovine oocytes by sperm injection / A. L. Younis, C. L. Keefer, B. G. Brackett // *Theriogenology*. – 1989. – V. 31. – P. 276–277.

237. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method / C. M. Lucci, R. Rumpf, J. R. Figueiredo [et. al.] // *Theriogenology*. – 2002. – V. 57. – P. 1467–1483.