

## АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОПЛОДОТВОРЯЕМОСТИ ЗАВЕРШИВШИХ ФАЗУ РОСТА *IN VIVO* ООЦИТОВ *SUS SCROFA DOMESTICUS* ИЗ Фолликулов РАЗНОГО ДИАМЕТРА

Т. И. КУЗЬМИНА<sup>1</sup>, С. И. КОВТУН<sup>2</sup>, Е. С. УСЕНБЕКОВ<sup>3</sup>, О. А. ЕПИШКО<sup>4</sup>,  
В. Н. СТЕФАНОВА<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных» (Санкт-Петербург – Пушкин, Россия) [prof.kouzmina@mail.ru](mailto:prof.kouzmina@mail.ru)

<sup>2</sup>Институт разведения и генетики животных имени М.В.Зубца НААН (Чубинское, Украина) [kovtun\\_si@i.ua](mailto:kovtun_si@i.ua)

<sup>3</sup>Казахский национальный аграрный университет (Алматы, Республика Казахстан) [usen03@mail.ru](mailto:usen03@mail.ru)

<sup>4</sup>УО «Гродненский государственный аграрный университет» (Гродно, Республика Беларусь) [dnateh@mail.ru](mailto:dnateh@mail.ru)

<sup>5</sup>ФГБНУ Институт цитологии Российской академии наук (Санкт-Петербург, Россия) [vestefan@mail.ru](mailto:vestefan@mail.ru)

Проанализирована компетентность к развитию завершивших фазу роста *in vivo* ооцитов *Sus Scrofa Domesticus*, выделенных из фолликулов разного диаметра (<3 мм, 3–5 мм и 6–8 мм). Не отмечено достоверных различий по уровню дробления и выходу эмбрионов на стадии бластоцисты и их морфологической характеристике. Полученные данные свидетельствуют о равных потенциях к созреванию и оплодотворению ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo*, выделенных из фолликулов разного диаметра.

**Ключевые слова:** ооцит, фолликул, эмбрионы, *Sus Scrofa Domesticus*, ВСВ-тест, *in vitro*

## ANALYSIS OF INDICATORS OF FERTILITY OF PORCINE OOCYTES THAT HAVE FINISHED GROWTH PHASE *IN VIVO* ASPIRATED FROM THE FOLLICLES OF DIFFERENT DIAMETERS

T. I. Kuzmina <sup>1</sup>, S. I. Kovtun <sup>2</sup>, E. S. Usenbekov <sup>3</sup>, O. A. Epishko <sup>4</sup>, V. N. Stefanova <sup>5</sup>

<sup>1</sup>Russian Research Institute for Farm Animal Genetics & Breeding (St.Petersburg–Pushkin, Russia)

<sup>2</sup>Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

<sup>3</sup>Kazakh National Agrarian University (Almaty, Kazakhstan)

<sup>4</sup>Grodno State Agrarian University (Grodno, Belarus)

<sup>5</sup>Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (St.Petersburg–Pushkin, Russia)

Developmental competence of *Sus Scrofa Domesticus* oocytes that have finished growth phase *in vivo*, isolated from the follicles of various diameters (<3 mm, 3–5 mm and 6–8 mm) was analyzed. There were no significant differences in the level of cleavage and embryos on the blastocyst stage and their morphological characteristics. The findings suggest an equal potency to the maturation and fertilization of oocytes that have finished growth phase *in vivo*, independently of diameter of follicles.

**Keywords:** oocyte, follicle, embryos, *Sus Scrofa Domesticus*, VCB-test, *in vitro*

## АНАЛІЗ ПОКАЗНИКІВ ЗАПЛІДНЕНОСТІ ООЦИТІВ *SUS SCROFA DOMESTICUS*, ЯКІ ЗАВЕРШИЛИ ФАЗУ РОСТУ *IN VIVO*, ІЗ ФОЛІКУЛІВ РІЗНОГО ДІАМЕТРУ

Т. І. Кузьміна<sup>1</sup>, С. І. Ковтун<sup>2</sup>, Е. С. Усенбеков<sup>3</sup>, О. О. Епішко<sup>4</sup>, В. М. Стефанова<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Федеральна державна бюджетна наукова установа «Всеросійський науково-дослідний інститут генетики та розведення сільськогосподарських тварин» (Санкт-Петербург - Пушкін, Росія)

<sup>2</sup>Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)

<sup>3</sup>Казахський національний аграрний університет (Алмати, Республіка Казахстан)

<sup>4</sup>УО «Гродненський державний аграрний університет» (Гродно, Республіка Білорусь)

<sup>5</sup>ФДБНУ Інститут цитології Російської академії наук (Санкт-Петербург, Росія)

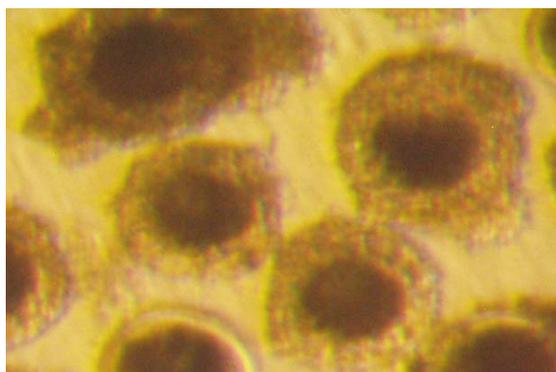
Проаналізовано компетентність до розвитку ооцитів *Sus Scrofa Domesticus*, які завершили фазу росту *in vivo* та були вилучені з фолікулів різного діаметру (<3 мм, 3–5 мм і 6–8 мм). Не відмічено достовірних відмінностей за рівнем дроблення і виходу ембріонів на стадії бластоцисти та їх морфологічною характеристикою. Отримані дані свідчать про рівні потенції до дозрівання і запліднення ооцитів, які завершили фазу росту *in vivo* та були вилучені з фолікулів різного діаметру.

**Ключові слова:** ооцит, фолікул, ембріони, *Sus Scrofa Domesticus*, ВСВ-тест, *in vitro*

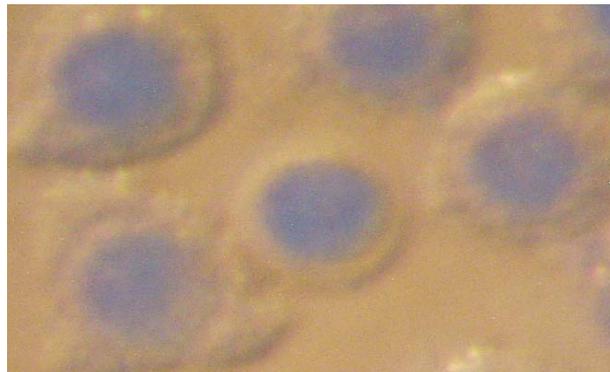
**Введение.** Последнее десятилетие ознаменовалось интенсификацией разработок и совершенствования инновационных клеточных репродуктивных биотехнологий в свиноводстве. Технология получения эмбрионов вне организма для трансплантации, трансгенез и клонирование, создание линий эмбриональных стволовых клеток для дальнейшей ксенотрансплантации органов основываются на базовом методе созревания донорских ооцитов свиней *in vitro* [1]. Несмотря на несомненные успехи в этой области, уровень оплодотворяемости ооцитов и развития интактных, клонированных или трансгенных эмбрионов продолжает оставаться на низком уровне [2]. Базовый метод всех перечисленных выше технологий – экстракорпоральное созревание ооцитов, извлеченных из яичников животных *post mortem*. Понятно, что биологический материал неживых животных неоднороден и представлен яичниками на разных стадиях овариального цикла. Стандартизируют начальный этап селекции гамет путем аспирации донорских ооцитов из фолликулов диаметром 3–6 мм, при этом учитываются их тургор и степень васкуляризации. Следующий шаг отбора такого материала для исследований – морфологическая оценка ооциркумлюсного комплекса. При, казалось бы, достаточно строгих критериях селекции донорского ооцита, лишь около 40% женских гамет после их оплодотворения развиваются до эмбрионов на завершающих стадиях доимплантационного развития. Использование ВСВ-диагностики (превентивная оценка донорской популяции на основе окраски ооцитов витальным красителем бриллиантовым кристаллическим голубым (brillant cresyl blue – ВСВ) – индикатора активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы) обеспечивает возможность использования отобранных клеток для дальнейшего культивирования ооцитов, их оплодотворения и получения эмбрионов. ВСВ детерминирует интрацеллюлярную активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, которая играет важную роль в клеточном росте, являясь ключевым ферментом пентозо-фосфатного цикла. Активность фермента возрастает в растущем ооците, к моменту завершения роста – снижается [3]. Нетоксичность данного красителя при его использовании в качестве теста при определении уровня глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы была показана в ооцитах овец, в зависимости от их размера, а также при определении компетенции к мейотическому созреванию ооцитов свиней [4, 5]. Эффективность ВСВ-диагностики женских гамет в настоящее время показана на многих видах животных, в том числе и на человеке [6]. Проведены сравнительные исследования по оценке ряда показателей ядерно-цитоплазматического созревания ооцитов, которые завершили фазу

роста *in vivo* или *in vitro*. Выявлены достоверные различия в уровне митохондриальной активности ВСВ(+) и ВСВ(-) ооцитов, экспрессии ряда генов, детерминирующих репродуктивные признаки [7, 8]. Оценка компетентности к оплодотворению ооцитов в различном функциональном состоянии (растущие или завершившие фазу роста) выявили достоверные различия в уровне дробящихся клеток и эмбрионов коров и свиней, достигших стадий поздних морул или бластоцисты [9]. Следует отметить, что все вышеуказанные данные получены из ооцитов, выделенных из фолликулов диаметром 3–6 мм. Актуальным представляется вопрос о «судьбе» ооцитов, завершивших фазу роста, выделенных из фолликулов диаметром менее 3 мм и более 6 мм. В связи с вышеизложенным, цель настоящего исследования – сравнить компетентность к экстракорпоральному созреванию и оплодотворению завершивших фазу роста ооцитов, выделенных из фолликулов диаметром менее 3 мм, 3–5 мм, 6–8 мм постмортальных яичников свиней.

**Материалы и методы исследований.** В экспериментах использовали постмортальные яичники свиней породы ландрас в возрасте 6–8 месяцев. Ооциты округлой формы с тонко гранулированной ооплазмой, с равномерной по ширине зоной пеллюцида и окруженных 5-ю и более слоями клеток кумулюса выделяли из антральных фолликулов диаметром < 3 мм, 3–5 мм, 6–8 мм, с широко разветвленной сетью капилляров, с высоким тургором, прозрачной оболочкой. Для проведения ВСВ-теста ооцит-кумулюсные комплексы отмывали в растворе Дюльбекко с добавлением 0,4% бычьего сывороточного альбумина (А-7888), затем помещали на 90 минут в 13  $\mu$ М раствор ВСВ (В-5388), приготовленного на основе Дюльбекко. Выбор концентрации основывался на данных, полученных Egerszegi I. et al. [7]. Ооцит-кумулюсные комплексы отмывали в растворе Дюльбекко и делили на: ВСВ(+) - ооциты с окрашенной цитоплазмой (завершившие фазу роста *in vivo*) и ВСВ(-) – неокрашенные ооциты (растущие).



а



в

Рис. 1. ВСВ – диагностика ооцитов свиней

а – «растущие» ооциты, в – ооциты, завершившие фазу роста *in vivo*

Средой для культивирования служила NCSU 23. Это синтетическая питательная среда, с гормонами (10 М.Е. хорионического гонадотропина человека и 10 М.Е. хорионического гонадотропина лошади), 10% фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–6 мм) и стенками фолликулов (диаметр фолликулов 3–6 мм, секции стенки неатретических фолликулов длиной 600 – 900  $\mu$ м). После 42–44 часов культивирования ооцит-кумулюсные комплексы обрабатывали 0,1% гиалуронидазой в NCSU 23, затем трижды промывали в NCSU 23 и помещали в среду следующего состава: 1мМ кофеина с 0,1% in BSA. Для оплодотворения 30–40 денудированных ооцитов переносили в капли среды (50 мкЛ) под вазелиновым маслом и помещали на 30 минут в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Семя хряков (нативное) помещали в среду Дюльбекко, дополненной 0,1% BSA, пенициллином и стрептомицином в концентрации 100 ед/мл и 50 мкг/мл (рН=7,2), центрифугировали при 1900 об/мин 4 минуты, процедуру повторяли трижды. Окончательно осадок ресуспендировали в среде оплодотворения.

Концентрация спермы для оплодотворения  $5 \times 10^5$  сперматозоидов на мл. После инкубации ооцитов со сперматозоидами в течение 8 часов зиготы отмывали трижды в среде для культивирования эмбрионов NCSU 23 и пересаживали в четырехлуночные плато в капли вышеуказанной среды (500мкл) и инкубировали при  $39^{\circ}\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . Контроль за развитием эмбрионов проводили под МБС-9.

Режимы культивирования и оплодотворения ооцитов *in vitro*, культивирования эмбрионов соответствовали описанным в методических рекомендациях, разработанных в лаборатории биологии развития ФБГНУ ВНИИГРЖ [10]. Для цитогенетического исследования ядерного материала клеток готовили препараты хромосом по методу А. Tarkowsky [11]. Все реагенты, использованные в настоящем исследовании производства фирмы Sigma-Aldrich.

Для сравнения результатов, полученных в опытных и контрольных группах, использовали критерии  $\chi^2$ . Данные обрабатывали с помощью статистической программы Sigma Stat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости:  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$ .

**Результаты исследований.** Яичники коров, используемые в клеточных репродуктивных технологиях, неоднородны по составу – забор материала ведется в разные стадии овариального цикла животного. Ооцит-кумулюсные комплексы свиной для созревания *in vitro* выделяют из фолликулов диаметром 3–6 мм, осуществляя, таким образом, стандартизацию протокола эксперимента. В соответствии с проведенным нами ВСВ-тестом исходной популяции ооцитов свиной, выделенных из фолликулов разного диаметра (< 3 мм, 3–5 мм, 6–8 мм) выявлена их гетерогенность. Доля ВСВ (+) ооцитов, обнаруженных в фолликулах диаметром меньше 3 мм, 3–6 мм и более 6 мм составила – 71%, 86% и 86%, соответственно (рис.2). Завершенность фазы роста исследователи связывают с понятием приобретения компетентности к созреванию и оплодотворению женской гаметы млекопитающих. В свою очередь установлен факт о взаимосвязи диаметра растущего фолликула, с диаметром содержащегося в нем фолликула [12]. Компетентность к созреванию ооцита также определяют по уровню содержания в антральном фолликуле эстрадиола [13]. В наших предыдущих исследованиях иммуноцитохимическим анализом выявлена повышенная экспрессия рецепторов к эстрогену в кумулюсных клетках ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo* по сравнению с уровнем экспрессии к эстрогеновым рецепторам в клетках кумулюса, окружающих ооциты, находившиеся в момент извлечения из фолликулов на стадии роста [14]. Algriani et.al. выявлено, что жидкость из фолликулов малого диаметра (<2 мм) оказывает ингибирующий эффект на созревание ооцитов и развитие из них доимплантационных эмбрионов, а фолликулярная жидкость, выделенная из фолликулов более 5 мм, наоборот обеспечивает повышение уровня дробления и количество полученных зародышей на стадиях поздней морулы и бластоцисты [15].

Исходя из вышеизложенного, в следующей серии экспериментов мы оценили компетентность ооцитов, оцененных, как завершивших стадию роста *in vivo* – ВСВ(+), выделенных из фолликулов разного диаметра, к созреванию, оплодотворению и развитию из них доимплантационных эмбрионов. Эксперименты проводили в соответствии со схемой, отображенной на рис. 3.

Анализ показателей мейотического созревания ооцитов (доли клеток реиницировавших мейоз, достигших стадии метафазы-II, уровень клеток с деструкцией хроматина) не обнаружил достоверных различий между исследуемыми группами. Так от 87% до 92% ооцитов реиницировали мейоз, а 78, 79, 85% ооцитов из фолликулов диаметром менее 3 мм, 3–5 мм и 6–8 мм соответственно завершили свое созревание *in vitro*. При этом доля клеток с дегенерированным хроматином в группе, где культивировали ооциты, аспирированные из фолликулов диаметром менее 3 мм не отличалась от таковой в группах ооцитов выделенных из фолликулов диаметром 3–5 мм и 6–8 мм (21%, 19%, 22%).

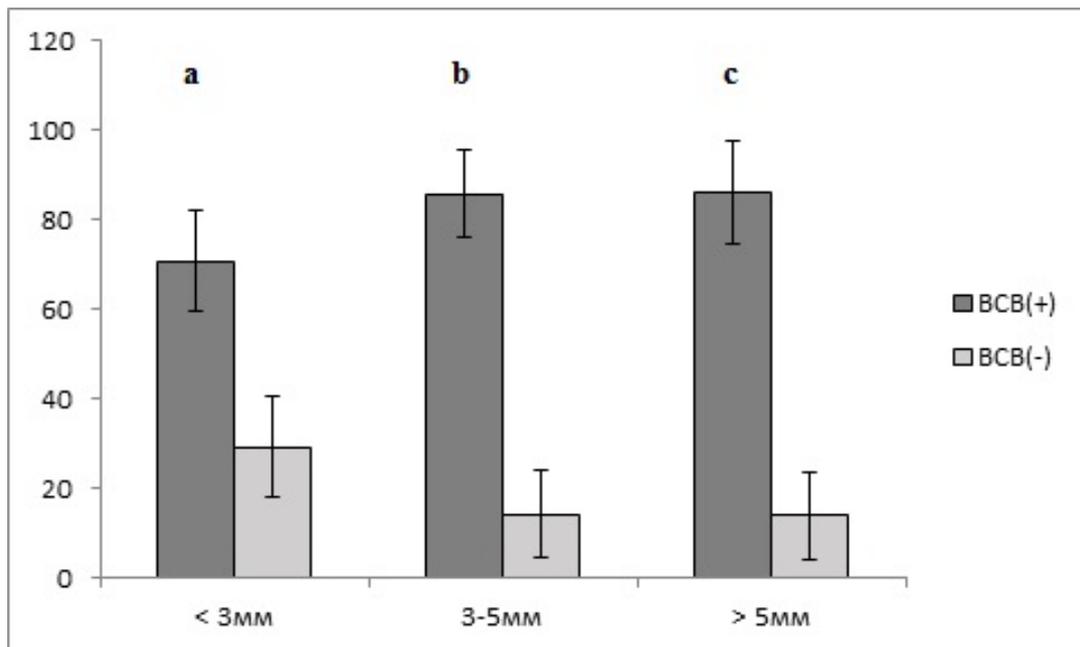


Рис. 2. Доля (%) растущих или завершивших фазу роста ооцитов *Sus Scrofa Domestica*, выделенных из фолликулов разного диаметра (< 3 мм, 3 – 5 мм, 6 – 8 мм). Достоверность различия <sup>a, b; a, c</sup> P < 0,01 (критерий  $\chi^2$ ).

При оплодотворении яйцеклеток получены нижеследующие результаты, представленные в таблице. 43% зигот раздробилось в группе, где оплодотворяли завершившие фазу роста ооциты, выделенные из фолликулов диаметром менее 3 мм. Процент дробления в экспериментальных группах, где культивировали оплодотворенные ооциты из фолликулов 3–5 мм и более 6 мм составил соответственно – 46% и 48%. Не обнаружено также достоверных различий между выходом эмбрионов (%), достигших стадии бластоцисты, между всеми исследуемыми группами.

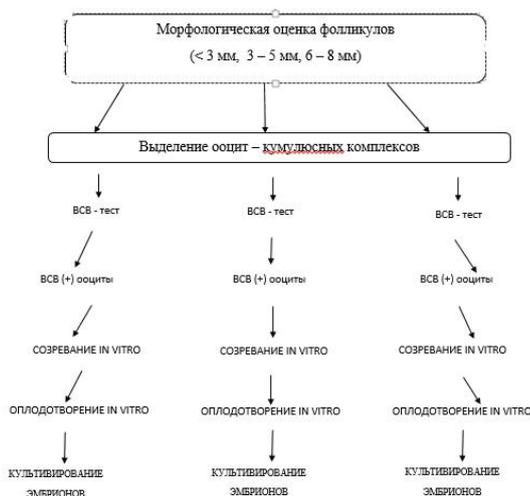


Рис. 3. Структурно-логическая схема экспериментов

Морфологический анализ полученных эмбрионов проводили на разных стадиях развития (от 2-х клеточных до морул и бластоцист). При этом оценивали следующие показатели: компактность клеток; правильность формы эмбриона; отклонения в размере клеток; цвет и

структура; наличие больших везикул; присутствие экстрадированных элементов клеток; диаметр; форма зоны пеллюциды; наличие фрагментов клеток, фрагментация цитоплазмы; несоответствие числа бластомеров количеству ядер; эмбрионы с пикнотическими ядрами в бластомерах. Результаты экспериментов свидетельствуют об отсутствии достоверных различий в доле эмбрионов с признаками дегенерации во всех исследуемых группах.

**Развитие эмбрионов *Sus Scrofa Domesticus* из завершивших фазу роста *in vivo* ооцитов, выделенных из фолликулов разного диаметра (число повторностей – 3, число ооцитов – 219) \***

Диаметр фолликулов	Число ооцит-кумулюсных комплексов (n)	Число (%) дробящихся клеток	Число (%) эмбрионов на стадии бластоцисты
<3	63	27/63 (43)	18/63 (29)
3-6	98	45/98 (46)	34/98 (35)
6-8	58	28/58 (48)	16/58 (28)

**Примечание.** \* Состав среды культивирования – NCSU 23 – синтетическая питательная среда, гормоны – 10 М.Е. хорионический гонадотропин человека +10 М.Е. хорионический гонадотропин лошади, 10% фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–5 мм), стенки фолликулов (диаметр фолликулов 3–5 мм).

**Выводы.** В целом, данные проведенных экспериментов свидетельствуют о равных потенциях к созреванию и оплодотворению ооцитов *Sus Scrofa Domesticus*, завершивших фазу роста *in vivo*, выделенных из фолликулов, обозначенных в исследованиях диаметров. Полученные результаты указывают на возможность использования для получения эмбрионов *in vitro* в качестве донорских ооцитов гаметы, выделенные из фолликулов разного диаметра (< 3 мм, 3–5 мм, 6–8 мм), предварительно оцененные ВСВ-тестом, как завершившие фазу роста *in vivo*.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Кузьмина, Т. И. Моделирование систем созревания ооцитов свиней *in vitro* / Т. И. Кузьмина, Д. А. Новичкова, Н. А. Волкова // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 2. – С. 52–57.
2. Production of Transgenic-clone Pigs by the Combination of ICSI-mediated Gene Transfer with Somatic Cell Nuclear Transfer / M. Kurome, H. Ueda, R. Tomii, K. Naruse, H. Nagashima // Transgenic Research. – 2006. – V. 15. – P. 229–240.
3. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity / H. Alm, H. Torner, B. Lohrke et al. // Theriogenology. – 2005. – Vol.63. – P. 2194–2205.
4. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test / E. Rodriguez-Gonzalez, M. Lopez-Bejar, E. Velilla, M. T. Paramio // Theriogenology. – 2002. – V.57. – P.1397–1409.
5. Selection of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assays with the brilliant cresyl blue test / J. Roca, E. Martinez, J. M. Vazquez, X. Lucas // Reproduction, Fertility and Development. – 1998. – V.10. – P. 479–486.
6. Safety of brilliant cresyl blue staining protocols on human granulosa and cumulus cells/ D. D. Alcoba, M. Conzatti, G. D. Ferreira, A. M. Pimentel, A. P. Kussler, E. Capp, H. von Eye Corleta, I. S. Brum // Zygote. – 2016, Feb. – V. 24(1). – P. 83–88
7. Egerszegi, I. Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities/ I. Egerszegi, H. Alm, J. Ritky // Reprod Fert. Dev. – 2010. – V. 22. – P. 830–838.
8. Differences in Cytoplasmic Maturation Between the BCB+ and Control Porcine Oocytes Do Not Justify Application of the BCB Test for a Standard IVM Protocol / P. Pawlak, E. Warzych, A. Chabowska, D. Lechniak // Journal of Reproduction and Development. – 2014. – V.60 (1). – P.28–36.
9. ВСВ-диагностика донорских ооцитов *Bos Taurus* и *Sus Scrofa Domesticus* - перспективы использования в клеточных репродуктивных технологиях / Т. И. Кузьмина,

Т. И. Станиславович, Д. Н. Татарская, Х. М. Мутиева, И. Я. Шахтамиров // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – №2. – С. 212–214.

10. Кузьмина, Т. И. Методы получения эмбрионов свиней *in vitro* / Т. И. Кузьмина, Х. Альм, Х. Торнер // СПб-Пушкин, 2008. – 36 с.

11. Tarkowski, A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs / A. Tarkowski // *Cytogenetic.* – 1966. – V. 1. – P. 394–400.

12. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs / X. Luca, E. A. Martinez, J. Roca, J. M. Vizquez, M. A. Gil, L. M. Pastor, J. L. Alabart // *Theriogenology.* – 2002. – 58(5):871–875.

13. Dode, M. A. N., Graves C. N. Role of estradiol-17 $\alpha$  on nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes // *Animal Reproduction Science.* 2003. – 78. – P. 99–110

14. Developmental competence of porcine oocytes that have finished growth phase from follicles of different diameter. / Т. Kuzmina, V. Kravtsov, H. Alm, H. Torner, K.-P. Brissow // *Anim. Reprod.* – 2015. – V.12 (3) – P. 604.

15. Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on *in vitro* cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes / O. Algriany, M. Bevers, E. Schoevers, B. Colenbrander, S. Dieleman // *Theriogenology.* – 2004. – 62(8). – P. 1483–1497.

## REFERENCES

1. Kuzmina, T. I., D. A. Novichkova, and N. A. Volkova. 2013. Modelirovanie sistem sozrevaniya ootsitov sviney *in vitro* – Modelling of maturation systems for porcine oocytes *in vitro*. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya – Agricultural Biology.* 2:52–57.

2. Kurome, M., H. Ueda, R. Tomii, K. Naruse, and H. Nagashima. 2006. Production of Transgenic-clone Pigs by the Combination of ICSI-mediated Gene Transfer with Somatic Cell Nuclear Transfer. *Transgenic Research.* 15:229–240.

3. Alm, H., H. Torner, and B. Lohrke. 2005. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology.* 63:2194–2205.

4. Rodriguez-Gonzalez E., M. Lopez-Bejar, E. Velilla, and M. T. Paramio. 2002. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology.* 57:1397–1409.

5. Roca, J., E. Martinez, J. M. Vazquez, and X. Lucas. 1998. Selection of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reproduction, Fertility and Development.* 10:479–486.

6. Alcoba, D. D., M. Conzatti, G. D. Ferreira, A.M. Pimentel, Kussler AP, E. Capp, H. von Eye Corleta, and I. S. Brum. 2016. Safety of brilliant cresyl blue staining protocols on human granulosa and cumulus cells. *Zygote.* 24(1):83–88

7. Egerszegi, I., H. Alm, and J. Ritky. 2010. Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reprod Fertil. Dev.* 22:830–838.

8. Pawlak, P., E. Warzych, A. Chabowska, and D. Lechniak. 2014. Differences in Cytoplasmic Maturation Between the BCB+ and Control Porcine Oocytes Do Not Justify Application of the BCB Test for a Standard IVM Protocol. *Journal of Reproduction and Development.* 60(1):28–36.

9. Kuzmina, T. I., T. I. Stanislavovich, D. N. Tatarskaya, H. M. Mutieva, and I. Ya. Shahtamirov. 2015. BCB-diagnostics of donor's oocytes of *bos taurus* and *sus scrofa domesticus* - prospects in cell reproductive technologies. *Questions regulatory veterinary medicine.* 2:212–214.

10. Kuzmina, T. I., H. Alm, and J. Torner. 2008. *Methods for producing of porcine embryos in vitro.* St.-Petersburg–Pushkin, 36.

11. Tarkowski, A. 1966. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs. *Cytogenetic.* 1:394–400.

12. Luca, X., E. A. Martinez, J. Roca, J. M. Vizquez, M. A. Gil, L. M. Pastor, and J.L. Alabart. 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology*. 58(5):871–85.

13. Dode, M.A.N., and C. N. Graves. Role of estradiol-17 $\alpha$  on nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Animal Reproduction Science*. 78 (2003):99–110

14. Kuzmina, T. V. Kravtsov, H. Alm, H. Torner, and K.-P. Brissow. 2015. Developmental competence of porcine oocytes that have finished growth phase from follicles of different diameter. *Anim. Reprod.* 12(3):604.

15. Algriany, O., M. Bevers, E. Schoevers, B. Colenbrander, S. Dieleman. 2004. Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on in vitro cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes. *Theriogenology*. 62(8):1483–97.

УДК 636.2.082.4:591.3

## ЕМБРІОПРОДУКТИВНІСТЬ КОРІВ-ДОНОРІВ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНА АСИМЕТРІЯ ЯЄЧНИКІВ

С. О. СІДАШОВА<sup>1</sup>, В. Ф. СТАХОВСЬКИЙ<sup>2</sup>, С. І. КОВТУН<sup>2</sup>

<sup>1</sup> СТОВ «АФ «Петродолинське» (Петродолинське, Україна)

<sup>2</sup> Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)  
[sidashova2013@yandex.ua](mailto:sidashova2013@yandex.ua)

Викладено результати вивчення закономірностей зв'язку між функціональною асиметрією яєчників високопродуктивних корів-донорів і рівнем їх ембріопродуктивності. Пальпаторно встановлено, що у корів з достатнім і високим рівнем вилучених ембріонів (не менше чотирьох) за одне вимивання, після гормонально індукованої поліовуляції співвідношення кількості жовтих тіл лівого яєчника до правого має тенденцію наближатися до пропорції 38% : 62%, яка є характерною для лютеогенезу корів в індуковані або спонтанні цикли. У корів з низьким виходом якісних ембріонів (менше чотирьох) за одне вимивання співвідношення жовтих тіл яєчників суттєво відрізнялось у сторону зменшення латеральної дистанції між яєчниками. Виявлений показник функціональної асиметрії яєчників потребує більш детального вивчення і в перспективі його буде застосовано як ресурсозберігаючий критерій для підвищення ефективності добору постійних донорів ембріонів серед високопродуктивних корів.

**Ключові слова:** корова-донор ембріонів, ембріопродуктивність, ректальна пальпація, яєчники, жовте тіло, функціональна асиметрія

## EMBRYO YIELD OF COWS-DONORS AND FUNCTIONAL ASYMMETRY OF THE OVARIES

S. O. Sidashova<sup>1</sup>, V. F. Stahovski<sup>2</sup>, S. I. Kovtun<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ALLC «Agrofirma«Petrodolynske»(Petrodolynske, Ukraine)

<sup>2</sup> Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)  
[sidashova2013@yandex.ua](mailto:sidashova2013@yandex.ua)

The results of the study of patterns of relationship between functional asymmetry of ovaries of high-producing cows-donors and their level of embryo yield are shown. Palpation revealed that at cows with sufficient technology and high embryo yield after hormonally induced superovulation, ratio