

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

П. А. Троцький, О. В. Щербак, О. Ю. Лизогуб, С. І. Ковтун

**ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ТРАНСПОРТУВАННЯ
ЖИТТЄЗДАТНИХ ЯЄЧНИКІВ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН**

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Чубинське, 2025

Методичні рекомендації розглянуто, схвалено та рекомендовано до друку вченою радою Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН (протокол № 11 від 14.11.25 р.).

Методичні рекомендації розробили:

П. А. Троцький, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник;
О. В. Щербак, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник;
О. Ю. Лизогуб, здобувач наукового ступеня доктора філософії;
С. І. Ковтун, доктор с.-г. наук, професор, академік НААН.

(Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН)

О-60 **Оптимізація** умов транспортування життєздатних яєчників сільськогосподарських тварин : методичні рекомендації / П. А. Троцький, О. В. Щербак, О. Ю. Лизогуб, С. І. Ковтун. Чубинське : ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН, 2025. 39 с.

У рекомендаціях узагальнено методичні підходи щодо початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів сільськогосподарських тварин, що розширює строки використання біологічного матеріалу для подальших біотехнологічних маніпуляцій з гаметами. Представлено результати впливу різних часових параметрів початку активізації *in vitro* дозрівання ооцитів на ефективність одержання ембріонів поза організмом та їх подальший розвиток. Показано, що для раціонального використання племінних (генетичних) ресурсів у тваринництві необхідно розробляти та удосконалювати біотехнологічні методи відтворення з метою подальшого впровадження їх в практику.

Рекомендації розраховані на спеціалістів з біотехнології відтворення людини та сільськогосподарських тварин, науковців, викладачів, студентів і здобувачів наукового ступеня доктора філософії та докторантів закладів вищої освіти біологічного й аграрного профілів, а також для зооветеринарних спеціалістів, ембріологів, техніків з трансплантації ембріонів людини та тварин.

Рецензенти:

УДК 591.3:57.089.3: 636

© Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, 2025 р.

ЗМІСТ

	Стор
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	6
1. ЕФЕКТИВНІСТЬ РІЗНИХ ЧАСОВИХ ПАРАМЕТРІВ ПОЧАТКУ АКТИВАЦІЇ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ <i>IN VITRO</i> ..	8
2. МОРФОЛОГІЧНИЙ ТА ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РОЗВИТКУ ООЦИТІВ КОРІВ <i>IN VITRO</i> ЗА РІЗНИХ ЧАСОВИХ ПАРАМЕТРІВ ПОЧАТКУ ЇХ АКТИВАЦІЇ.....	28
3. ЕФЕКТИВНІСТЬ ОДЕРЖАННЯ ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ <i>IN VITRO</i> ЗА ЗАСТОСУВАННЯ РІЗНИХ ЧАСОВИХ ПАРАМЕТРІВ ПОЧАТКУ АКТИВАЦІЇ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ <i>IN VITRO</i>	31
ВИСНОВКИ	36
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	37

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФА	активні форми азоту
АФК	активна форма кисню
ВКМ	внутрішньо клітинна маса
г/л	грам/літр
ДРТ	допоміжні репродуктивні технології
М I	метафаза 1
М II	метафаза 2
мас./об.	маса/об'єм
мкг	мікрограм
мкл	мікролітр
мкМ	мікромоль
мл	мілілітр
мМ	мілімоль
мм	міліметр
МО	міжнародних одиниць
нг	нанограм
об./об.	об'єм/об'єм
ОКК	ооцит-кумулясний комплекс
°С	градус за Цельсієм
ТЕ	трофектодерма
УЗД	ультразвукова діагностика
хв	хвилин
ВAX	BCL2 associated X, apoptosis regulator – білок, який кодується однойменним геном
BSA	bovine serum albumin – альбумін сироватки крові великої рогатої худоби
CDM	culture development medium – культуральне середовище для розвитку
dbcAMP	dibutyryl cyclic AMP – дибутирил циклічний АМР
dpi	day post-insemination – день після осіменіння
ESS	oestrous sheep serum – еструсна сироватка овець
FBS	fetal bovine serum – фетальна бичача сироватка
Fert.-TALP	Tyrode's albumin lactate pyruvate – середовище для запліднення яйцеклітин
FCS	fetal calf serum – фетальна сироватка телят
FSH	follicle-stimulating hormone – фолікулостимулюючий гормон

GV	germinal vesicle – зародкові везикули
GVBD	germinal vesicle breakdown – розпад зародкових везикул
hpi	hours post-insemination – годин після осіменіння
Hsp70.1	Hsp70 kilodalton heat shock proteins – група консервативних убікватарних білків теплового шоку
HTF	human tubal fluid – трубна рідина людини
ICSI	intracytoplasmic sperm injection – інтрацитоплазматична ін'єкція сперми
<i>in vitro</i>	характеристика певного біологічного процесу, змодельованого поза організмом
<i>in vivo</i>	характеристика певного біологічного процесу, який відбувається в організмі
IVC	<i>in vitro</i> culture – <i>in vitro</i> культивування
IVEP	<i>in vitro</i> embryo production – отримання ембріонів <i>in vitro</i>
IVF	<i>in vitro</i> fertilization – <i>in vitro</i> запліднення
IVM	<i>in vitro</i> maturation – <i>in vitro</i> дозрівання
IVP	<i>in vitro</i> production – <i>in vitro</i> отримання ембріонів
KCl	potassium chlorate – хлорид калію
LH	luteinizing hormone – лютеонізуючий гормон
m-HTF	modified human tubal fluid – модифікована трубна рідина людини
mSOF	modified synthetic oviduct fluid – модифікована синтетична рідина яйцепроводу
NaCl	sodium chloride – хлорид натрію
NCSU-37	North Carolina State University – розчин університету штату Північна Кароліна
NT	nuclear transfer – пересадка ядер
PBS	phosphate buffer saline – фосфатно-буферний фізіологічний розчин
PVA	polyvinyl alcohol – полівінілалкоголь
SCNT	somatic cell nuclear transfer – перенесення ядра соматичної клітини
SOF	synthetic oviductal fluid – синтетична рідина яйцепроводу
Sperm-TALP	Tyrode's albumin lactate pyruvate – середовище для капацитації сперматозоїдів
TCM-199	Tissue Culture Medium 199 – середовище культури тканин 199

ВСТУП

Сучасні біотехнологічні методи дають змогу раціонально впливати на репродуктивний потенціал самок, значно збільшувати кількість високопродуктивних особин і тим самим – виробництво продукції тваринництва. Досягнуті за останні десятиріччя успіхи в галузі біології розмноження сільськогосподарських тварин значно розширили можливості регулювання репродуктивної функції у тварин біотехнологічними методами, відкрили великі можливості зберігання та практичного використання репродуктивних клітин і ембріонів сільськогосподарських тварин залежно від потреб народного господарства. Зокрема, зберігання гамет обох батьків забезпечує необмежені варіанти їх поєднання в майбутньому, а створення ооцитобанку та банку запліднених яйцеклітин дає змогу різко знизити витрати на отримання ембріонів.

Не менш важливе значення має й вирішення проблеми короткострокового зберігання яєчників самиць сільськогосподарських тварин, що розширює доступ і строки використання базового біологічного матеріалу для подальших біотехнологічних маніпуляцій з клітинами. Короткострокове зберігання яєчників самиць тварин є одним із прогресивних напрямків розвитку сучасної біотехнології.

Нормальний клітинний метаболізм виробляє АФК і АФА, які регулюють різноманітні функції клітин. Ці форми високо реагують з ліпідами, білками та нуклеїновими кислотами, що призводить до втрати цілісності мембрани, структурних або функціональних змін у білках і пошкодження нуклеїнових кислот, що називається окислювальним стресом. Під час транспортування яєчника до лабораторії зупинка кровотоку зменшує надходження кисню та енергії, що призводить до ішемічного стану яєчників. Ішемія порушує життєздатність фолікулів і лютеїнову функцію яєчників; вільні радикали кисню, зокрема, є головними причинами пошкодження органів та тканин під час зберігання. Крім того, під час консервації порушується антиоксидантна система клітин яєчників. Щоб запобігти пошкодженню через реактивні види, клітини мають низку антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза та каталаза. Баланс між АФК і антиоксидантами всередині фолікула є критичним для функціонування ооцитів і клітин гранульози. Під час

транспортування яєчників генерація АФК та АФА у фолікулярному мікрооточенні ооцита та соматичними клітинами супроводжується зниженими рівнями антиоксидантних ферментів і може спричинити опосередкований окислювальним стресом апоптоз у фолікулах.

Тривалість транспортування та зберігання яєчників і температура середовища, що використовується під час транспортування є одними з факторів, що впливають на відновлення дозрівання ооцитів поза організмом. Клітинний автоліз може відбуватися в яєчниках під час тривалого транспортування за температури +35–38°C. Внутрішньофолікулярне середовище, що оточує ооцит, захищає його від несприятливого впливу низьких температур, тоді як вплив холоду на незрілі або зрілі ооцити спричиняє незворотні порушення у волокні веретена поділу в ооциті.

Ооцити з яєчників забитих тварин демонструють послаблену здатність до розвитку поза організмом порівняно з ооцитами, зібраними у живих тварин шляхом відбору яйцеклітин. Відмінності в якості ооцитів можуть бути пов'язані зі стресом, що виникає під час ІVP, яке починається з відокремлення яєчника. Практичні проблеми, з якими часто стикаються ембріологи, це вплив часу транспортування, середовища та температури під час транспортування.

1. ЕФЕКТИВНІСТЬ РІЗНИХ ЧАСОВИХ ПАРАМЕТРІВ ПОЧАТКУ АКТИВАЦІЇ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ *IN VITRO*

Допоміжні репродуктивні технології (ДРТ) в тваринництві широко застосовуються в програмах з генетичного вдосконалення та тиражування тварин з бажаним генотипом, оскільки вони є потужним інструментом для прискорення генетичного прогресу. Упродовж останніх десятиліть було досягнуто певних успіхів щодо ефективного одержання ембріонів сільськогосподарських тварин поза організмом. Як правило, отримання великої кількості ембріонів *in vitro* передбачає використання яєчників тварин після оваріоектомії, оскільки такий підхід забезпечує збір максимальної кількості ооцитів. Ооцити, отримані із яєчників забитих тварини проявляють знижений потенціал розвитку поза організмом. Крім того, місця забою тварин зазвичай розташовані на певній відстані від ембріологічних лабораторій. Зберігання яєчників упродовж тривалого періоду через великі відстані може вплинути на життєвий потенціал ооцита. Враховуючи, що якість ооцитів визначає компетентність розвитку ембріонів після запліднення, збереження цілісності ооцитів з моменту оваріоектомії яєчників тварин до моменту ембріологічних маніпуляцій з клітинами має ключове значення.

Одразу після відокремлення яєчника від тварини (операцією чи після забою) припиняється кровоток, що перешкоджає надходженню кисню та енергії і як наслідок призводить до ішемічного стану яєчників. Основним механізмом негативного впливу під час ішемії є гіпоксія, і клітини з високою швидкістю метаболізму, включаючи ті, що утворюють тканину яєчника, мають тенденцію до ушкодження дуже швидко. Гостра гіпоксія призводить до виснаження АТФ, що викликає перехід до гліколізу, основного анаеробного шляху виробництва АТФ. АТФ розщеплюється без повторного синтезу, і зрештою зменшується енергоефективність та відбувається накопичення молочної кислоти, яка утворюється в результаті гліколізу, що в свою чергу знижує внутрішньоклітинний рН та призводить до додаткової клітинної дисфункції.

Незважаючи на те, що взаємозв'язок між гіпоксією/ішемією та пошкодженням органів встановлено, фізіологічні механізми, які впливають на якість ооцитів під час збільшення терміну зберігання

яєчників, залишаються ще і досі повністю нез'ясованими. Необхідно з'ясувати механізми, що відбуваються в ооциті на клітинному та молекулярному рівнях, щоб вжити відповідних заходів для зменшення цього пошкодження [1].

Wang Y. S. із співавторами (2015) вивчали вплив температури зберігання яєчників під час транспортування на здатність до розвитку яйцеклітин великої рогатої худоби для використання в технології SCNT. Яєчники, отримані на бойні, зберігали у фізіологічному розчині упродовж 3–4 год за трьох температурних режимах: +15°C, +25°C або +35°C. Розвиток ооцитів, що використовували для SCNT, оцінювали за кількістю дозрілих клітин та утворенням бластоцист, загальною кількістю клітин, індексом апоптозу та відносною кількістю VAX і Hsp70.1 у бластоцистах на 7-й день.

Кількість ооцитів, дозрілих до стадії М II, що зберігали за температури +35°C, була значно нижчою, ніж у тих, що зберігали за +25°C або +15°C ($51,3 \pm 0,9\%$ проти $75,1 \pm 1,4\%$ і $71,7 \pm 1,3\%$, $P < 0,05$). Ооцити з яєчників, які зберігали за температури +15°C, формували бластоцисти з більшою кількістю клітин ($97,3 \pm 8,6$ проти $80,2 \pm 10,8$ і $77,4 \pm 11,7$; $P < 0,05$) і нижчим індексом апоптозу ($5,1 \pm 1,3$ проти $13,5 \pm 1,6$ і $18,6 \pm 1,1$, $P < 0,05$), ніж ті, що зберігали за температури +25°C або +35°C. Відносна кількість VAX і Hsp70.1 у бластоцистах на 7-й день, отриманих з ооцитів, що зберігали в яєчниках за температури +15°C, була нижчою, ніж у тих, що зберігали за температури +25°C або +35°C ($P < 0,05$). Встановлено, що температура зберігання +15°C упродовж 3–4 год мала значний позитивний вплив на якість і здатність до розвитку ооцитів, які використовували для SCNT, завдяки зменшенню стресу на ооцити, порівняно з тими, які зберігали за температури +25°C або +35°C [2].

Bohlooli Sh. із співавторами (2015) вивчали вплив транспортування яєчників у середовищі, що містило HEPES за різних температур на здатність до розвитку та якість отриманих *in vitro* ембріонів. Яєчники транспортували до лабораторії упродовж 2–3 год у п'яти середовищах, а саме NS, PBS, KSOM, CZB та CR1 (табл. 1) і трьох температурних режимах (+4, +25, +38°C). Після доставки яєчників до лабораторії їх розрізали та промивали середовищем для дозрівання за температури +38°C для отримання ОКК. Для IVМ були

відібрані ОКК, або ооцити без клітин кумулюсу з дрібнозернистою гомогенною оплазмою.

1. Склад середовищ для транспортування яєчників

Component (mM)	NS	PBS	KSOM	CZB	CR1
NaCl	150	130	125	100	135
KCl	–	2,70	2,50	4,86	10
Na ₂ HPO ₄	–	10	–	–	–
KH ₂ PO ₄	–	1,8	0,35	1,17	–
MgSO ₄	–	–	10,2	1,18	–
CaCl ₂ ·2H ₂ O	–	–	1,71	1,71	–
Na Lactate	–	–	10	30,10	–
Na Pyruvate	–	–	0,20	0,26	–
HEPES	–	–	10	10	10
Glucose	–	–	0,20	–	–
L-glutamine	–	–	1	1	–
EDTA	–	–	0,01	0,1	–
Gentamicin (µg/mL)	50	50	50	50	50

NS – normal saline; PBS – phosphate buffer saline; KSOM – K simplex optimization medium; CZB – Chatot-Ziomek-Bavister medium; CR1 – Charles Rosenkrans medium

Потім відібрані ОКК тричі промивали середовищем для дозрівання та культивували в групах по 20 клітин під мінеральною олією в 100 мкл середовища TCM-199, доповненого 0,4 мМ піруватом натрію, 1 мМ L-глутаміну, 100 мкМ цистеаміну, 10% (об./об.) FBS, 20 мкг/мл ФСГ, 2 мкг/мл естрадіолу і 50 мкг/мл гентаміцину. ОКК культивували за температури +38,5°C у зволоженій атмосфері з 5% CO₂, 5% O₂ і 90% N₂. Через 24 год після IVМ оцінювали кількість ооцитів в яких було розростання кумулюсу. Оцінені ооцити розподіляли на 3 категорії: категорія С – розростання кумулюсу не спостерігали; категорія В – кумулюсні клітини були нерівномірно розподілені та помітні гранульозні клітини; категорія А – кумулюсні клітини були рівномірно розподілені і відсутні клітини гранульози.

Після дозрівання 20 ОКК піддавали спільному культивуванню зі спермою, відібраною за допомогою методу градієнта щільності Перколла з концентрацією 1×10⁶ сперматозоїдів/мл у 200 мкл краплі середовища для запліднення та інкубували за температури +38,5°C з

5% CO₂, 5% O₂ і 90% N₂. Середовище для запліднення Fert-SOF доповнювали 100 МО/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2 мМ кофеїну та 10 мкг/мл гепарину. Після 18 годин спільного інкубування очікувані зиготи були видалені із середовища для запліднення, тричі промиті в синтетичній рідині яйцепроводу BE1 (SOF-BE1) і прокультивовані протягом 7 – 8 днів після IVF у зволоженої атмосфері 5% CO₂, 5% O₂. Половину культурального середовища для культивування ембріонів оновлювали кожні 48 год, а на 2-й день IVC додавали 10% FBS. Швидкість дроблення оцінювали на 3-й день після осіменіння. Кількість морул та бластоцист фіксували на 8-й день після IVF.

Здатність до послідуючого розвитку отриманих ОКК оцінювали за дозріванням, заплідненням, утворенням морули і бластоцисти та кількістю клітин ВКМ і ТЕ. Дозрівання ОКК залежало від середовища та температури транспортування яєчників. Встановлено, що транспортування за температури +4°C призвело до збільшення кількості дозрілих ОКК ($81,0 \pm 4,75$), ніж за інших температур транспортування. За використання середовищ CR1 ($80,5 \pm 6,66$) і KSOM ($80,2 \pm 6,15$) було отримано більшу кількість дозрілих ОКК, ніж за інших. Середовище для транспортування мало значний вплив на коефіцієнт запліднення. Крім того, за транспортування яєчників у середовищах CR1 ($43,6 \pm 4,60$), KSOM ($43,2 \pm 4,86$) і CZB ($41,1 \pm 4,86$) було отримано більшу кількість ембріонів. Не було суттєвої різниці у кількості отриманих морул та бластоцист або в кількості ВКМ та ТЕ клітин щодо умов транспортування.

Встановлено, що середовище та температура за яких транспортують яєчники, суттєво впливають на дозрівання ооцитів великої рогатої худоби. Встановлено, що температура транспортування +4°C є оптимальною для дозрівання ОКК. Транспортування яєчників у середовищі CR1 і KSOM також призводить до більшої кількості дозрілих клітин. Але на кількість отриманих ембріонів не впливала температура транспортування, а впливало лише середовище в якому транспортували яєчники CR1, CZB та KSOM. Тому додавання NEPES до середовища транспортування яєчників позитивно впливає на якість і компетентність подальшого розвитку ОКК. Використання таких середовищ, як CR1, CZB і KSOM, які містять NEPES за температури

+4°C, можна рекомендувати під час транспортування яєчників та подальшого IVM і IVP [3].

Özdas O.B. із співавторами (2006) вивчали вплив різних температур транспортування (+4°C, +32°C) яєчників овець і корів на дозрівання ооцитів *in vitro*. Було сформовано дві експериментальні групи. Дослідження повторювали шість разів. Яєчники переносили в термосі зі стерильним фізіологічним розчином і доставляли в лабораторію упродовж 2 – 4 год. По одному яєчнику корів та овець переносили в термосі, що містив 0,9% NaCl за температури +32°C, інший яєчник тієї ж тварини спочатку поміщали в 0,9% NaCl за температури +32°C на 10 хв. за кімнатної температури, після чого переносили в термос з 0,9% NaCl за температури +4°C і негайно транспортували в лабораторію. Яєчники кожної групи тричі промивали стерильним фізіологічним розчином.

ОКК отримували шляхом розсічення фолікулів яєчників корів та овець. Ооцити відбирали залежно від будови ооплазми, форми зони пелюциду та наявності оточуючих їх шарів клітин кумулюсу. Було отримано 333 ооцити овець, з них використано 277 (83,1%). У корів із 255 отриманих ооцитів 205 (80,39%) були відібрані для дозрівання. Відібрані ооцити тричі опускали в середовище для промивання (TCM-199 з додаванням 50 мкг/мл гентаміцину сульфату та 1 мМ L-глутаміну) і один раз у середовище для дозрівання (з буфером Neres TCM-199 з додаванням 1 мМ-L-глутаміну, 0,2 мМ Na-пірувату, 50 мкг/мл гентаміцину сульфату, 24 МО/мл ЛГ, 10% FCS). Потім групи по 20 – 30 ОКК поміщали в 700 мкл середовища для дозрівання *in vitro* в 4-лункових планшетах та культивували 23 год з 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ в повітрі за температури +38,8°C. Після дозрівання ооцити очищали від кумулюсних клітин хіміко-механічним методом з використанням гіалуронідази. Потім ооцити поміщали в 0,7% KCl на 5 хв. для приготування препаратів. Препарати фіксували в суміші оцтова кислота-етиловий спирт (1:3) упродовж 48 годин. Ооцити, пофарбовані ацетоорсеїном, на стадії розвитку М II досліджували під фазово-контрастним мікроскопом. Для статистичного аналізу використовувався критерій χ -квадрат.

У групі де яєчники овець транспортували за температури +4°C ооцити досягали 30,6% М I мейозу і 15,3% М II, а ооцити великої рогатої худоби досягли 17,3% М I і 46,8% М II мейозу. У групі за

+32°C кількість дозрілих клітин становили відповідно у овець – 33,1% і 38,3%, у корів – 19,3% і 55,4%. Із ооцитів овець, яєчники яких транспортували за температури +32°C було отримано більшу кількість гамет на стадії М II, ніж із тих, що були транспортовані за температури +4°C ($P < 0,001$), але не спостерігалось статистично значущої різниці між дозріванням до стадії М II ооцитів, отриманих з яєчників корів, транспортованих за температури +4°C і +32°C. Встановлено, що немає статистично вірогідної різниці в кількості дозрілих ооцитів корів, яєчники яких транспортували як за температури +4°C так і за температури +32°C [4].

Matsukawa K. із співавторами (2007) досліджували вплив зберігання яєчників на розвиток яйцеклітин корів після інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда, партеногенетичної активації або SCNT. Яєчники поміщали в PBS без промивання та зберігали за температури +15°C упродовж 2 – 6 год (контрольна група) або 26 – 30 год (дослідна група) після відокремлення від тварини. ОКК отримували з фолікулів яєчників діаметром 2 – 6 мм, а потім IVM за температури +38,5°C у 5% CO₂ в повітрі. Середовище IVM було TCM-199 з 10% FBS, 100 МО/мл пеніциліну і 100 мкг/л стрептоміцину. Через 18 – 20 год після початку дозрівання ОКК звільняли від клітини кумулюсу у середовищі, що містило 300 МО/мл гіалуронідази шляхом піпетування в тонкостінній скляній піпетці. Для оцінки ядерного дозрівання ооцити фіксували у суміші оцтова кислота : етанол (1:3, об./об.) упродовж 24 годин і фарбували 1%-м орсеїном. Після фарбування ооцити досліджували під фазово-контрастним мікроскопом ($\times 200$). Ооцити, що виділили перше полярне тільце (ооцити стадії М II) були відібрані для ICSI, партеногенетичної активації та SCNT.

Після ICSI ембріони переносили в середовище CR1aa, а потім культивували в середовищі CR1aa за температури +38,5°C у 5% CO₂, 5% O₂ і 90% N₂ упродовж перших двох днів. Упродовж наступних п'яти днів їх культивували в середовищі CR1aa з 5% FBS. Партеногенетичні та NT ембріони культивували в безсироватковому середовищі (IVD 101, Дослідницький інститут функціональних пептидів, Ямагата, Японія) за температури +38,5°C у 5% CO₂, 5% O₂ і 90% N₂ протягом 7 днів.

На 7 добу після NT проведено трансплантацію ембріонів. Тваринами-реципієнтами були корови голштинської та помісей японської чорної. Кожна синхронізована корова-реципієнт отримала одну NT бластоцисту в ріг матки іпсилатерально до жовтого тіла. Діагностику вагітності проводили за допомогою УЗД на 30, 60 та 90 днях вагітності.

Кількість дозрілих ооцитів була значно нижчою в дослідній групі (67%), ніж у контрольній групі (78%). Кількість дегенерованих ооцитів була значно вищою в дослідній групі (24%), ніж у контрольній групі (2%). Ембріони, отримані після ICSI та партеногенетичної активації із дозрілих ооцитів дослідної групи мали значно меншу кількість ембріонів на стадії бластоцисти, порівняно з контролем (ICSI 8% проти 24%, партеногенетична активація 15% проти 31%). Проте розвиток ембріонів до стадії бластоцисти після SCNT, отриманих із ОКК, не відрізнявся між двома групами (38% проти 38%). Також термін зберігання яєчників не впливав на кількість тільних тварин після SCNT, а клоновані телята були отримані в обох групах з однаковою ефективністю (21%). Отже, зберігання яєчників за температури +15°C упродовж 26–30 год призводить до зменшення кількості ембріонів, отриманих із дозрілих ооцитів корів *in vitro* після ICSI або партеногенетичної активації, але не впливає на кількість отриманих бластоцист або приживлення ембріонів після SCNT [5].

Дослідження останніх років показали, що на подальший розвиток ооцитів після запліднення *in vitro* значною мірою впливає інтервал між отриманням яєчників одразу після смерті/забою та отриманням ооцитів із фолікулів. Для визначення оптимальних умов тривалого зберігання яєчників Abbas Goodarzi із співавторами (2018) був проведений експеримент з додаванням різних доз мелатоніну (0 (С), 500 (М1), 600 (М2), 700 (М3) і 800 (М4) мкМ) як антиоксиданту для середовища зберігання яєчників овець (PBS), які витримували при +4°C і +20°C упродовж 24 год. Після зберігання яєчників оцінювали вплив даних параметрів на IVEP, включаючи дозрівання, запліднення, дроблення та кількість бластоцист, а також загальну кількість бластомерів. Мелатонін не зменшував рівень запліднення ($P \leq 0,05$). Крім того, час зберігання яєчників мав істотний негативний вплив ($P \leq 0,05$) на параметри IVEP. Додавання

мелатоніну збільшило загальну кількість бластоцист (тобто середнє число бластомерних клітин у 4 групах: $86,00 \pm 3,00$, $98,50 \pm 3,5$, $111,5 \pm 1,5$, $125,5 \pm 2,00$ і $126,50 \pm 5,5$ для С, М1, М2, М3 і М4 відповідно). За результатами проведених досліджень встановлено, що використання антиоксиданту мелатоніну в середовищі зберігання яєчників позитивно впливає на розвиток ооцитів овець і якість отриманих ембріонів [6].

Вітрифікація ооцитів як метод кріоконсервації є досить успішним, хоча він все ще нестандартизований через структурну та молекулярну чутливість ооцитів до процесу охолодження та заморожування. Khursheed Ahmad S. із співавторами (2022) досліджували вплив температури та часу зберігання яєчників на життєздатність після розморожування та швидкість дозрівання вітрифікованих незрілих ооцитів у овець. Робота полягала в отриманні ооцитів з яєчників овець забитих на бійні, які зберігали за різних температурних (0°C , $+4^{\circ}\text{C}$ і $+25^{\circ}\text{C}$) і часових (0 год, 6 год, 12 год і 24 год) комбінацій з послідуною оцінкою життєздатності та дозрівання *in vitro*. Вітрифікацію проводили в 30%-му вітрифікаційному розчині, використовуючи етиленгліколь і ДМСО з оцінкою після вітрифікації через один тиждень зберігання.

Значно вищу життєздатність після деконсервації спостерігали після зберігання за температури 0°C упродовж 6 год (95,3%), а потім 12 год (85%), а найнижча була через 24 год (66,7%). Проте за температури $+4^{\circ}\text{C}$ і $+25^{\circ}\text{C}$ життєздатність була несуттєво вища через 6 год (96,5 і 100% відповідно), а потім через 12 год (93 і 100%) та знижувалась через 24 год (85,7% і 90,7%).

За температури зберігання $+25^{\circ}\text{C}$ і $+4^{\circ}\text{C}$ значно вищий відсоток дозрілих ооцитів спостерігали після 6 год (40% і 39,1%), 12 год (37,3% і 38,1%) і 24 год (34,6% і 36,4%) зберігання, порівняно з такими за температури 0°C (20,3% через 6 год, 14,2% через 12 год і лише 13,8% через 24 год). Утім за всіх температур зберігання спостерігали тенденцію до зниження рівня дозрілих ооцитів із часом зберігання і показники були значно нижчими, ніж у контролі.

Таким чином, життєздатність після деконсервування та культивування ооцитів *in vitro* зберігається до 24 год в яєчниках, які перебували за температури $+4$ і $+25^{\circ}\text{C}$, порівняно з 0°C і ці умови

можна рекомендувати для зберігання яєчників та отримання із них ооцитів для кріоконсервації [7].

Упродовж останніх десятиліть зростає інтерес до отримання ембріонів *in vitro* у овець і кіз. Для підвищення ефективності проведених досліджень необхідно використовувати велику кількість яєчників, а великі відстані до лабораторії зазвичай неминучі, коли використовують яєчники статевозрілих тварини. Тому довготривале транспортування яєчників овець може негативно вплинути на здатність до подальшого розвитку ооцитів. Martín-Maestro A. із співавторами (2020) оцінювали вплив часу зберігання яєчників (3, 5, 7, 9, 11 і 13 год) і середовища, в якому їх транспортували (ТСМ-199 і фізіологічний розчин) на якість ооцитів.

Яєчники статевозрілих овець ($n = 1420$) транспортували за температури $+30^{\circ}\text{C}$ у фізіологічному розчині (8,9 г/л NaCl) з додаванням пеніциліну (0,1 г/л) або за $+38,5^{\circ}\text{C}$ у середовищі ТСМ-199 з додаванням полівінілпіролідону (1 г/л), 4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинетансульфонова кислота (HEPES) (6,51 г/л), стрептоміцин (0,1 г/л), пеніцилін (0,1 г/л) і бікарбонат натрію (0,4) г/л) і витримували упродовж 13 годин у тому ж середовищі та при тій же температурі. Середній вік тварин, яєчники яких були використані в дослідженнях становив 6 років. Незрілі ОКК були отримані шляхом розрізання яєчників скальпелем через 3, 5, 7, 9, 11 і 13 год після транспортування яєчників до ембріологічної лабораторії. Відібрано усього 4 258 ОКК з 8 повторів, які мали прозору та гомогенну або помірну зернисту оплазму та оточені щонайменше трьома шарами щільно кумулюсу, які поміщали в середовище ТСМ-199 з додаванням HEPES (2,38 мг/мл), гепарину (2 мкл/мл) і гентаміцину (4 мкл/мл). У кожному повторюванні ОКК отримані з яєчників і тих самих дослідних груп були змішані та рівномірно розподілені. ОКК промивали ТСМ-199 з гентаміцином (4 мкл/мл) і поміщали в чотирилункові планшети, що містили 500 мкл ТСМ-199 і 4 мкл/мл гентаміцину, 100 мкМ цистеаміну, 10 нг/мл FSH, 10 нг/мл LH та 10% FCS в мінеральній олії та 5% CO_2 в атмосфері за температури $+38,5^{\circ}\text{C}$ з максимальною вологістю.

Через 22 години ОКК були частково оголені шляхом обережного піпетування, розділені на групи по 40–45 ооцитів і поміщені в чотирилункові планшети, що містили 450 мкл SOF, з 10% ESS.

Розморожені сперматозоїди від двох баранів відокремлювали за допомогою градієнта щільності Перколл (45%/90%) і капацитували упродовж 15 хв. за температури +38,5°C у 5% CO₂ з SOF і 10% ESS. Потім сперматозоїди інкубували спільно з ооцитами в кінцевій концентрації 10⁶ сперматозоїдів/мл упродовж 18 год за температури +38,5°C у 5% CO₂.

Через 18 год після осіменіння імовірні зиготи переносили в краплі IVC об'ємом 25 мкл (приблизно один ембріон на мкл), що містили SOF, доповнений 3 мг/мл BSA, і культивували у зволоженій атмосфері з 5% CO₂, 5% O₂ і 90% N₂ у повітрі до 8 дня після осіменіння.

Після дозрівання ооцити були звільнені від навколишніх кумулюсних клітин обережним піпетуванням. Щоб перевірити дозрівання ооцитів і проникнення сперматозоїдів, клітини фарбували Hoechst 33342 (1 мкг/мл) упродовж 10 хв. за кімнатної температури, промивали PBS-PVA, а потім аналізували під мікроскопом за ×20 збільшення. Швидкість дозрівання визначали як кількість ооцитів з очевидним полярним тільцем і пластиною МП відносно загальної кількості проаналізованих ооцитів. Ооцити, що містять пронуклеуси (незалежно від стадії деконденсації) вважали заплідненими та класифікували як нормальні. Після IVМ також оцінювали життєздатність і якість кумулюсних клітин, мейотичне дозрівання та здатність до запліднення, кількість і якість бластоцист.

За результатами досліджень встановлено, що після 7 год зберігання якість ооцитів і потенціал розвитку були значно погіршені, оскільки спостерігали більшу кількість нежиттєздатних ооцитів, фрагментації ДНК і нижчі показники життєздатних, дозрілих і запліднених ооцитів. Рівень дроблення ембріонів і параметри кумулюсних клітин також були знижені. Зберігання яєчників у середовищі TCM-199 є шкідливим для кумулюсних клітин та дозрівання ооцитів. Встановлено, що транспортування яєчників до 5 год у фізіологічному розчині є найбільш оптимальними умовами зберігання для підтримки життєздатності ооцитів, а також здатності до розвитку ембріонів овець [1].

Febretrisiana A. із співавторами (2015) вивчали вплив тривалості та температури зберігання яєчників овець на ядерне дозрівання *in vitro* ооцитів, отриманих із збережених яєчників. Отримані яєчники

зберігали у фізіологічному розчині упродовж 2 – 4 год, 5 – 7 год і 8 – 10 год за різних температур (+27-28°C, +36-37°C і +4°C). ОКК отримували методом розрізання фолікулів з кожної групи та культивували *in vitro* упродовж 26 год. Яєчники випадковим чином розподіляли на 3 групи (за температури +27-28°C, +36-37°C і +4°C), а потім транспортували до лабораторії у фізіологічному розчині (0,9% NaCl) з додаванням 100 МО/мл пеніциліну та стрептоміцину. Потім кожен яєчник кожної групи кілька разів розрізали лезом скальпеля, щоб отримати ОКК у PBS, доповненому 0,3% BSA через 2 – 4 год 5 – 7 год і 8 – 10 год після оваріоектомії. Використовували лише ооцити із однорідною темнопігментованою оплазмою та інтактними кумулюсними клітинами. Отримані ооцити двічі промивали в середовищі для дозрівання, а потім культивували в середовищі для дозрівання TCM-199 з додаванням 0,5% FBS, 10 МО/мл сироваткового гонадотропіну жеребої кобили, 10 МО/мл хоріонічного гонадотропіну людини і 10 мкг/мл гентаміцину. Ооцити культивували окремо в 100 мкл середовища дозрівання (10–15 ооцитів в краплі) під мінеральною олією в інкубаторі з 5% CO₂, +38,5°C упродовж 26 год

Після IVM ооцити були механічно звільнені від кумулюсних клітин у PBS, доповненому 1 мг/мл ферменту гіалуронідази, шляхом багаторазового піпетування. Потім ооцити фіксували розчином етанол оцтова кислота (1:3, об./об.) упродовж 48–72 год. Зафіксовані ооцити фарбували розчином оцтової кислоти (1% орсеїну в 45% оцтової кислоти) і досліджували під фазово-контрастним мікроскопом. Визначали ядерне дозрівання яйцеклітини за змінами її хромосомної конфігурації та ядерної мембрани.

За результатами проведених досліджень не встановлено різниці між кількістю дозрілих ооцитів до метафази II в разі отримання з яєчників, які зберігали за +27-28°C і +36-37°C упродовж 5–7 год після забою. Проте відсоток ооцитів, отриманих із яєчників, які зберігали за температури +4°C, був значно нижчим ($P < 0,05$), ніж ооцити, які зберігалися за вищої температури (69,23%, 70,83% і 45,65%, для +27-28°C, +36-37°C і +4°C упродовж 2 – 4 год, відповідно. Кількість ооцитів дозрілих до МII була значно менша ($P < 0,05$), коли яєчники зберігали за температури +27-28°C і +36-37°C упродовж 8 – 10 год, але не в ооцитах, які зберігали за температури +4°C (24,37%, 7,84% і

45,23% відповідно). Кількість дозрілих ооцитів, отриманих з яєчників, що зберігали за температури +4°C, була більшою, ніж у тих, які були отримані з яєчників, які зберігали за вищої температури ($P < 0,05$). Встановлено, що зберігання яєчників за температури +4°C упродовж 8 – 10 год є ефективнішим для підтримки розвитку ооцитів овець, ніж зберігання за вищої температури [8].

Tellado M. із співавторами (2014) вивчали вплив різних умов зберігання яєчників свиней (час, температура) на характеристики фолікулярної рідини, якість незрілих ооцитів, мейотичне дозрівання та *in vitro* запліднення ооцитів. Яєчники від свинок у віці 5 – 6 місяців (приблизно 100 кг) отримували на місцевій бійні та транспортовані в 0,9% (мас./об.) NaCl, що містило 100 000 МО/л пеніциліну та 100 мг/л стрептоміцину.

Яєчники були випадковим чином розподілені до однієї з дев'яти груп (приблизно 15 яєчників у групі): зберігалися за температури +15°C упродовж 2 год, 4 год і 6 год; зберігали за температури +25°C упродовж 2 год, 4 год і 6 год і зберігали за температури +35°C упродовж 2 год, 4 год і 6 год ОКК аспірували з антральних фолікулів розміром 3 – 8 мм за допомогою шприца на 10 мл і голки 18-го калібру та відбирали ооцити, оточені багатошаровим і щільним кумулюсом. В середньому отримано 20 ооцитів на один яєчник.

ОКК культивували в середовищі TCM-199 (солі Ерла, L-глутамін, 2,2 мг/л бікарбонату натрію) з додаванням 10% (об./об.) FBS, 0,57 мМ цистеїну, 50 мг/л гентаміцину сульфату та 0,5 мг/л свинячого FSH (Folltropin-V) плюс 0,5 мг/л свинячого LH (Lutropin-V) в мінеральній олії за температури +39°C упродовж 48 год 5% CO₂ в повітрі. Групи приблизно з 50 ОКК дозрівали в 500 мкл культурального середовища.

Після культивування ооцити звільняли від клітин кумулюсу, поміщали в гіпотонічне середовище, що містило 10 г/л цитрату натрію, за температури +37°C на 15 хв, фіксували на предметному склі за допомогою фіксуючого розчину Карнуа (3:1 етанол : оцтова кислота) і фарбували 5%-м (об./об.) розчином Giemsa упродовж 15 хв. Потім гамети оцінювали під світловим мікроскопом при 100× і 400× збільшеннях. Ооцити, які мали ниткоподібний хроматин, розташований по всій ділянці зародкового пухирця, або двовалентні

хромосоми (М I) вважали незрілими, тоді як ті, які демонстрували конфігурацію хромосоми М II, вважали мейотично зрілими.

IVF було проведено з використанням свіжої сперми кнура йоркширської породи. Зразки сперми двічі промивали PBS з додаванням 3 г/л BSA та центрифугували при $400\times g$ упродовж 5 хв. Осад повторно суспендували в середовищі для запліднення (модифіковане трис-буферне середовище, що складається з 113,1 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 10 мМ CaCl₂, 20 мМ Трис, 11 мМ глюкози, 5 мМ пірувату натрію, 4 г/л BSA, 2,5 мМ кофеїну та 50 мг/л гентаміцину сульфату).

Дозрілі ОКК звільняли від клітин кумулюсу та запліднювали, кінцева концентрація 5×10^8 сперматозоїдів/л. Гамети спільно інкубували в модифікованому Трис-буферному середовищі під мінеральною олією за температури $+39^\circ\text{C}$ упродовж 18 год 5% CO₂ в повітрі. Передбачувані зиготи звільняли від прикріплених сперматозоїдів повторним піпетуванням, фіксували на предметному склі за допомогою фіксуючого розчину Карнуа упродовж щонайменше 24 год, інкубували у водному розчині 10 мг/л Hoechst 33,342 упродовж 15 хв. за кімнатної температури та спостерігали під епіфлуоресцентним мікроскопом за збільшення $250\times$ та $400\times$. Ооцити запліднені, коли була ідентифікована принаймні одна деконденсована головка сперматозоїда та/або повністю сформований пронуклеус.

У міру збільшення часу зберігання, відсоток живих незрілих ооцитів на стадії зародкових пухирців, окислювальна активність і швидкість дозрівання зменшувалися. За більш високих температур рН і концентрація глюкози знижувалися, але окислювальна активність і швидкість дозрівання ооцитів зростали. Концентрація лактату та рівень АФК незрілих ооцитів збільшувались із збільшенням часу зберігання та температури. Зберігання яєчників більше 2 год за температури $+25$ і $+35^\circ\text{C}$ призвело до низького рН фолікулярної рідини та високого рівня АФК у незрілих ооцитах. Такі умови пошкоджують ооцити та порушують їх мейотичне дозрівання. Зменшення окисної активності, спричинене тривалим часом та/або низькою температурою зберігання, може означати зниження життєздатності ооцитів. Отже, у свиней транспортування яєчників за температури $+25$ і $+35^\circ\text{C}$ упродовж 2 год є найкращими умовами для

підтримки відповідної якості ооцитів, мейотичного дозрівання та рівня запліднення *in vitro* [9].

Wongsrikeao P. із співавторами (2005) було проведено дослідження з вивчення впливу температури та часу зберігання яєчників свиней на життєздатність і ядерне дозрівання *in vitro* ооцитів, отриманих із збережених яєчників свиней та їх подальший розвиток після запліднення *in vitro*. Яєчники зберігали у фізіологічному розчині упродовж 0, 3, 6, 9 і 12 год за різних температур (+4, +15, +25 і +35°C). Досліджували рН фолікулярної рідини, отриманої з яєчників, фрагментацію ДНК ядра ооцита та мейотичне дозрівання ооцитів. Деякі ооцити з яєчників, які зберігалися за температури +15, +25 і +35°C упродовж 6 год, були запліднені *in vitro*, а потім прокультивовані упродовж 7 днів, щоб перевірити здатність ембріонів розвиватися до стадії бластоцисти.

Яєчники були вилучені з препубертатних кросбредних свинок та транспортовані до лабораторії у фізіологічному розчині (0,85% (мас./об.) NaCl). ОКК з фолікулів (діаметром від 3 до 6 мм) аспірували за допомогою голки 18 калібру, приєднаної до шприца на 5 мл. Потім двічі промивали модифікованим PBS використовували лише ооцити з однорідною ооплазмою та компактним кумулюсом. Відібрані ОКК були перенесені в середовище для дозрівання, модифікований розчин NCSU-37 з додаванням 0,6 мМ цистеїну, 1 мМ dbcAMP, 10 МО/мл хоріонічного гонадотропіну коней, 10 МО/мл хоріонічного гонадотропіну людини, 50 мкг/мл гентаміцину і 10% (об./об.) свинячої фолікулярної рідини. 50 ОКК розміщали у 500 мкл середовища для дозрівання під шаром мінеральної олії та культивували упродовж 22 год. Потім їх культивували в середовищі для дозрівання без гормонів і dbcAMP упродовж додаткових 22 год. Культивування IVM, IVF ооцитів і IVC ембріонів проводили у зволоженій атмосфері інкубатора за температури +38,5°C, що містить 5% CO₂ у повітрі.

Розморожені сперматозоїди кнура розводили в культуральному середовищі TCM-199 з солями Ерла, доводячи до рН 7,8, а потім центрифугували за 200×g упродовж 2 хв. Після центрифугування супернатант видаляли, а осад сперми попередньо інкубували упродовж 15 хв. за температури +38,5°C перед заплідненням. Порцію (10 мкл) попередньо інкубованих сперматозоїдів вносили в 90-мкл

краплю середовища для запліднення, що містило 10 – 20 дозрілих ОКК, щоб отримати концентрацію 1×10^6 сперміїв/мл. Середовище для запліднення складалося з 90 мМ NaCl, 12 мМ KCl, 25 мМ NaHCO₃, 0,5 мМ NaH₂PO₄, 0,5 мМ MgSO₄, 10 мМ лактату натрію, 3 мг/мл BSA, 5 мМ кофеїну і 50 мкг/мл гентаміцину. Після спільної інкубації ооцитів зі сперматозоїдами упродовж 5 год запліднені ооцити звільняли від кумулюсних клітин і прилиплих сперматозоїдів механічним піпетуванням, а потім переносили в культуральне середовище. Імовірні зиготи культивували в NCSU-37 з додаванням 4 мг/мл BSA, 0,17 мМ пірувату натрію, 2,73 мМ лактату натрію та 50 мкг/мл гентаміцину. Через 72 години після осіменіння всі ембріони переносили у свіже культуральне середовище: NCSU-37 з додаванням 4 мг/мл BSA, 5,55 мМ D-глюкози та 50 мкг/мл гентаміцину. Отримані ембріони культивували упродовж додаткових 4 днів, щоб оцінити їхню здатність розвиватися до стадій морули та бластоцисти.

Через 16 годин після IVF імовірні зиготи поміщали на предметне скло та фіксували сумішшю оцтова кислота:етанол (1:3 об./об.) упродовж 48–72 год. Зафіксовані зиготи фарбували оцтовим орсеїном (1% орсеїну в 45% оцтовій кислоті) і досліджували під фазово-контрастним мікроскопом. Ооцити, що містили пронуклеуси вважали заплідненими і класифікували як нормальне або поліспермне запліднення відповідно до кількості набряклих голівок сперматозоїдів і пронуклеусів у цитоплазмі. Для дослідження розвитку ембріонів на 7 день усі ембріони переносили в невелику краплю, що містила PBS з додаванням 90% гліцерину (об./об.) і 1 мкг/мл бісбензimidу (Hoechst 33342) фіксували та фарбували на предметному склі.

Коли яєчники зберігали за температури +35°C, рН фолікулярної рідини знижувався, а пропорції ооцитів з фрагментованими ядрами ДНК збільшувались, оскільки час зберігання подовжувався, то зберігання яєчників упродовж 6, 9 та 12 год призводило до зниження швидкості дозрівання ооцитів. Жоден з ооцитів отриманих з яєчників, що зберігали за температури +4°C, не дозрів до М II. Зберігання яєчників за температури +15°C знижувало кількість запліднених *in vitro* ооцитів і подальший розвиток ембріонів, але не було суттєвих відмінностей у кількості запліднених та отриманих бластоцист між ооцитами з яєчників, які зберігалися за температури +25°C і +35°C.

Встановлено, що зберігання яєчників за температури +25—+35°C упродовж 6 год є ефективним для підтримки розвитку ооцитів свиней, навіть якщо життєздатність була нижчою, ніж у яєчників, які зберігалися за температури +35°C упродовж 3 год [10].

У кобили лише обмежену кількість ооцитів можна отримати *in vivo*. Коли для експерименту потрібна велика кількість ооцитів необхідно використовувати яєчники забитих кобил. Зміни температури та часового інтервалу, необхідного для обробки та транспортування яєчників до лабораторії негативно впливають на швидкість відновлення ооцитів та їх якість після IVF та послідуєчого культивування.

Guignot F. із співавторами (1999) вивчали вплив температури та часу транспортування яєчників шляхом оцінки швидкості відновлення ооцитів, стадії ядерного дозрівання і швидкості дроблення після IVF за короткого (1,5–4 год) і тривалого (6–8 год) зберігання. Температуру в контейнері для зберігання знижували з +37°C до +32°C і +27,5°C протягом короткого і тривалого інтервалу відповідно. Отримані ОКК були класифіковані як такі, що мають компактний кумулюс, повністю або частково оточуючий ооцит (компактний); ті, що мають, чітку межу яйценосного горбка, що оточує ооцит (розпушений); ті, що мають повністю або частково розширений кумулюс, утворюючи комірчасту або драглисту хмару навколо ооцита (розширений); і ті, які були повністю оголені без кумулюсу (оголені). Усі ОКК, за винятком оголених, які не використовували в дослідженнях, дозрівали *in vitro* протягом 30 год за температури +38,5°C у 5% CO₂. Швидкість відновлення ооцитів була значно вищою після тривалого зберігання, порівняно з коротким (48 проти 35%; P < 0,01), але час зберігання не впливав на розподіл отриманих ОКК із 4 груп. Після *in vitro* культивування час зберігання не вплинув на ядерне дозрівання, але ооцити з інтактними цитоплазматичними мембранами частіше виявляли після короткого, ніж після тривалого зберігання (54 проти 34%; P = 0,07), а повністю дозрілі ооцити частіше спостерігали з інтактною мембраною (P < 0,01). Крім того, ооцити з неушкодженими мембранами на М II спостерігали за короткого інтервалу зберігання та розпушеним кумулюсом ОКК, тоді як пошкоджені мембрани та неповне

дозрівання спостерігали за тривалого зберігання та компактного кумулюсу ОКК. [11].

Evesen M. із співавторами (2010) вивчали вплив стадії естрального циклу та температури транспортування яєчників на дозрівання *in vitro* ооцитів собак. Суки-донори були розділені на три групи залежно від стадії статевого циклу: фолікулярна (проєструс або еструс), лютеїнова (дієструс) і анєструс. Один яєчник кожної пари, отриманий від 39 статевозрілих сук, транспортували у PBS за температури +4°C, а інший транспортували за температури +37°C. Загалом отримано 1138 ОКК, з усіх яєчників, згрупували та дозрівали в модифікованій mSOF, доповненій FSH, LH, замінними та незамінними амінокислотами за температури +38,5°C у зволоженій атмосфері 5% CO₂, 5% O₂ і 90% N₂ упродовж 72 год. Ооцити, отримані з яєчників на фолікулярній і лютеїновій стадії статевого циклу, мали значно кращі показники дозрівання (M I + M II), ніж ооцити отримані з анєструальних яєчників транспортованих за температури +37°C ($p < 0,05$). Однак ооцити, отримані з анєструальних яєчників, транспортовані за температури +4°C, мали найбільшу кількість дозрілих клітин (M I + M II), і різниця між анєструальними та лютеїновими групами яєчників була значною ($p < 0,05$). Ооцити з анєструальних яєчників, транспортовані за температури +4°C, мали значно більшу кількість дозрілих клітин, ніж ті, що транспортували за температури +37°C ($p < 0,0001$). Однак температура транспортування (+37°C або +4°C) суттєво не вплинула на кількість дозрілих (M I + M II) ооцитів, отриманих з яєчників на лютеїновій ($p = 0,61$) і фолікулярній ($p = 0,48$) стадіях статевого циклу. Автори зробили висновок, що як температура транспортування, так і взаємодія температури транспортування × стадія статевого циклу вплинули на кількість дозрілих ооцитів, тоді як стадія циклу тічки сама по собі не вплинула. Транспортування яєчників сук за температури +4°C може покращити *in vitro* дозрівання ооцитів, отриманих з яєчників на стадії анєструсу [12].

Тимчасове зберігання яєчників може забезпечити можливість продовжити життєдіяльність ооцитів з яєчників котів, що знаходяться під загрозою зникнення. Evesen M. із співавторами (2009) вивчали вплив різних періодів зберігання (2, 24 і 48 год) яєчників за температури +4°C для дозрівання *in vitro* ооцитів котів. Яєчники були

отримані від 25 домашніх кішок на різних стадіях естрального циклу шляхом звичайної овариогістеректомії після анестезії в різних місцевих ветеринарних клініках і зберігали у фізіологічному розчині за температури $+4^{\circ}\text{C}$ упродовж 2, 24 або 48 год до початку активації ооцитів. Відібрані ОКК дозрівали за температури $+38^{\circ}\text{C}$ упродовж 48 год у чотириланкових планшетах, у 500 мкл середовища mSOF під мінеральною олією, у зволоженому повітрі з 5% CO_2 , 5% O_2 та 90% N_2 . Після дозрівання *in vitro* не було відмінностей між кількістю ооцитів, дозрілих до стадії М II, у групах, що зберігали упродовж 2 та 24 год (50,7% та 48,2% відповідно, $p > 0,05$). Однак в групі де яєчники зберігали 48 год отримано значно меншу кількість ооцитів, дозрілих до стадії М II (28,0%, $p < 0,001$) порівняно з 2 та 24 год зберігання. Таким чином встановлено, що 2 або 24 год зберігання яєчників за температури $+4^{\circ}\text{C}$ не впливає на мейотичне дозрівання ооцитів *in vitro*, а 48 год зберігання яєчників призводить до різкого зниження дозрілих до М II ооцитів [13].

Yoshida T. із співавторами (2022) перевіряли ефективність фізіологічного розчину, розчину Euro-Collins (EC) і розчину ET-Kyoto (ET-K) як середовищ для зберігання яєчників котів. Яєчники зберігалися у фізіологічному розчині, EC або ET-K упродовж 24, 48 або 72 год за температури $+4^{\circ}\text{C}$ до вилучення ооцитів. Потім ОКК отримували зі свіжих яєчників, що зберігалися окремо, і дозрівали *in vitro*. Отримані ОКК тричі промивали середовищем IVM, яке містило середовище TCM-199 з додаванням 0,4% (мас./об.) BSA, 10 МО/мл 17β -естрадіол, 100 мкг/мл гентаміцину, 137 мкг/мл пірувату натрію, 0,02 МО/мл Follistim (людський рекомбінантний фолікулостимулюючий гормон), і 25 нг/мл епідермального фактора росту. Отримані ОКК інкубували в краплях середовища IVM, покритих мінеральною олією за температури $+38,5^{\circ}\text{C}$ у зволоженому повітрі (5% CO_2) упродовж 28 год.

Дозрівання ооцитів класифікували як GV, GVBD, М I, анафазу I, телофазу I або М II. Ооцити на стадії М II з першим полярним тільцем характеризували як зрілі ооцити. Ооцити звільняли від клітин кумулюсу обережним піпетуванням. Ооцити двічі промивали PBS(-) (PBS без Ca^{2+} і Mg^{2+}), та фіксували 3,7% (мас./об.) параформальдегідом та 1% (об./об.) Triton X-100 у PBS (-) при кімнатній температурі ($+22^{\circ}\text{C}$ – $+25^{\circ}\text{C}$) упродовж 15хв. Потім ооцити

поміщали в PBS(-), що містить 0,3% (мас./об.) полівінілпіролідону за кімнатної температури (+22°C – +25°C) на 15 хв. Щоб визначити мейотичні стадії, фіксовані ооцити переносили в невелику краплю, що містила PBS(-), доповнену 90% (об./об.) гліцерину і 10 мкг/мл Hoechst 33342 (бісбензимід), на 5 хв, поміщали на предметне скло, накривали покривним скельцем і інкубували за температури +4°C до оцінки під флуоресцентним мікроскопом.

Соломини, що містили кріоконсервовану сперму, розморожували в теплій воді (+37°C) 30 с. Потім сперму випустили в m-НТФ і центрифугували упродовж 5 хв. за 500×g. Після центрифугування сперму ресуспендували в НТФ, центрифугували упродовж 5 хв за 500×g, і концентрацію спермій доводили до $1,5 \times 10^6$ клітин/мл у середовищі IVF (НТФ з 0,3 % BSA). Після 28 год IVM 5–10 ОКК двічі промивали в середовищі IVF і культивували в 100 мкл середовища IVF, покритих мінеральною олією, за температури +38,5°C у зволоженому повітрі (5% CO₂) упродовж 18 год

Після IVF ооцити звільняли від клітин кумулюсу обережним піпетуванням, а отримані оголені ооцити використовували для IVC. Приблизно 10 ооцитів інкубували в 100 мкл середовища IVC – I упродовж 2 днів, а потім у середовищі IVC – II упродовж 5 днів у зволоженому повітрі (5% O₂, 5% CO₂ і 90% N₂). Середовища IVC I та II склалися тільки з одного середовища, доповненого 0,3% (мас./об.) BSA та 5% (мас./об.) FBS, відповідно. Класифікували ембріони з більш ніж 16 клітинами як морули, а ембріони з бластоцелом – як бластоцисти.

В групі ET-K отримано більшу кількість дозрілих ооцитів, ніж у групі з фізіологічним розчином після 72 год зберігання. Крім того, у розчині ET-K було отримано дроблення ембріонів через 48 год зберігання, а швидкість утворення морули в групі ET-K була вищою, ніж у інших групах через 24 і 48 год. Також в групі ET-K було отримано більшу кількість бластоцист, ніж у інших групах після зберігання упродовж 24 год, і тільки в ET-K зберігається здатність до подальшого розвитку бластоцист після 48 годин зберігання. Встановлено, що ET-K є придатним середовищем для збереження котячих яєчників [14].

Evesen M. із співавторами (2018) вивчали вплив двох різних температур транспортування (+37°C та +4°C) і холодного зберігання

яєчників упродовж 24 год на апоптоз кумулюсних клітин і кількість дозрілих *in vitro* ооцитів котів. Яєчники були відібрані у 15 домашніх кішок на різних стадіях статевого циклу шляхом звичайної оваріогістеректомії і зберігалися у фізіологічному розчині за температури +37°C або +4°C до отримання ооцитів упродовж двох години. Деякі яєчники, транспортовані за температури +4°C, зберігалися при тій же температурі упродовж 24 год. Яєчники розрізали та промивали промивним середовищем (з доповненням гепарину, HEPES, модифікованим ТСМ-199) за кімнатної температури, щоб отримати ОКК. Великі ооцити з темно пігментованою оплазмою і повністю оточені принаймні одним шаром кумулюсних клітин були відібрані для IVМ.

ОКК дозрівали упродовж 48 год за температури +38°C у чотирилункових планшетах, що містили 500 мкл mSOF під мінеральною олією в інкубаторі з 5% CO₂ майже 100% вологості повітря. Морфологічні особливості апоптозу аналізували в кумулюсних клітинах на початку дозрівання *in vitro* в обох групах транспортування після 24 год. Ступінь апоптозу в кумулюсних клітинах вимірювали кінцевою дезоксинуклеотидилтрансферазою. Показники IVМ ооцитів визначали за допомогою фарбування Hoechst (33342). Хоча морфологічні ознаки апоптозу спостерігали рідко та з однаковою частотою в групах за температури транспортування +37°C і +4°C (19,40 і 21,55%, P > 0,001), більш частіше їх спостерігали в групі 24-годинного холодного зберігання (34,80%, P < 0,001). Результати IVМ були подібними (49,77, 44,55%) у групах за температури +37°C і +4°C (P > 0,05) і, що важливо, нижчими в групах за транспортування +4°C і 24-годинному холодному зберіганні (18,90%, P < 0,05). Результати цього дослідження свідчать про те, що кумулюсні клітини котячих ооцитів частково піддаються апоптозу під час транспортування за теплої або холодної температурах; зберігання яєчників упродовж 24 год за температури +4°C викликає апоптоз кумулюсних клітин при значно вищих нормах; зберігання яєчників упродовж 24 годин за температури +4°C негативно впливає на кількість IVМ ооцитів [15].

2. МОРФОЛОГІЧНИЙ ТА ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РОЗВИТКУ ООЦИТІВ КОРІВ *IN VITRO* ЗА РІЗНИХ ЧАСОВИХ ПАРАМЕТРІВ ПОЧАТКУ ЇХ АКТИВАЦІЇ

Розуміння репродуктивних процесів, пов'язаних із фолікулогенезом яєчників і застосування цих знань до різних видів є важливим для збереження біорізноманіття. Дослідження низькотемпературного зберігання тканин дозволили вченим створити банк тканин для наукових досліджень і біомедичних застосувань. Збереження тканини яєчників і фолікулів значною мірою залежить від методів збору, транспортування та зберігання. Тому дослідження оптимального середовища, часу та температури транспортування необхідні для успішного збереження життєздатності тканин. Розробка таких методів особливо важлива в тих випадках, коли біологічний матеріал отримують в районах де тварин мало або вони знаходяться на великій відстані від лабораторій, що є реальністю для більшості випадків в разі відбору біологічного матеріалу від диких тварин [16].

Короткочасне зберігання яєчників під час їх транспортування з місць збору до спеціалізованих лабораторій забезпечує компетентність ооциту до подальшого розвитку поза організмом. Такі підходи рекомендується застосовувати до репродуктивного матеріалу самок генетично цінних тварин та/або видів, що знаходяться під загрозою зникнення, а також до клонованих або трансгенних тварин, які несподівано загинули чи під час оварієктомії за показаннями. Наразі науковці спрямовують свої дослідження на підбір оптимальних умов для збереження життєздатності ооцитів під час транспортування яєчників, з метою отримання позитивного кінцевого результату після різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів на ефективність одержання ембріонів.

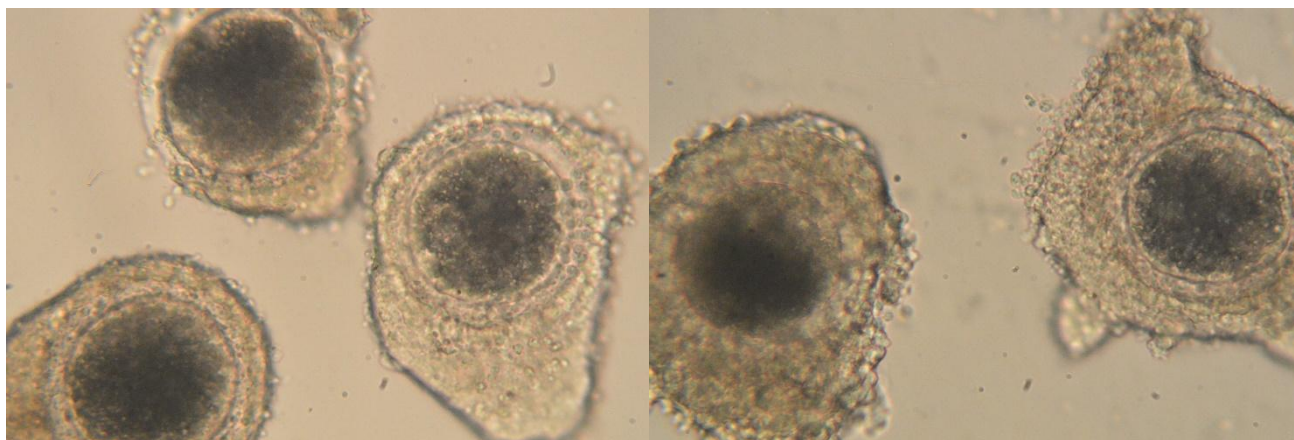
Для досягнення цієї мети деякі фактори є важливими для підтримки біологічного потенціалу ооцитів, наприклад середовище, температура та час зберігання. В даний час методики короткочасного зберігання яєчників розроблені лише для кількох видів тварин [17].

Важливе значення для ефективного одержання ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* та їх подальшого розвитку має не тільки вибір складу культурального середовища, якість та стадія розвитку ооцитів, але й термін початку активації *in vitro* дозрівання

ооцитів, що розширює доступ і строки використання базового біологічного матеріалу для подальших біотехнологічних маніпуляцій з клітинами.

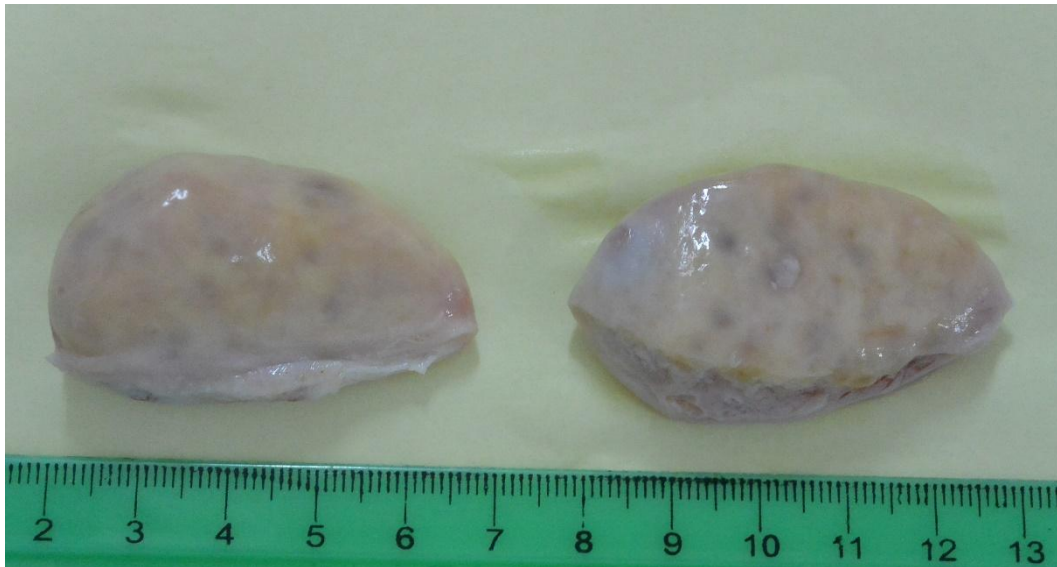
Проведено морфологічний та цитогенетичний аналіз ооцитів корів за різних часових параметрів початку їх активації та визначено їх біологічну повноцінність після мейотичного дозрівання поза організмом. Дослідження були спрямовані на аналіз ефективності одержання ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* та їх подальший розвиток з урахуванням впливу різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів.

Об'єктом експериментальних досліджень були ОКК корів (рис. 1). Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали PBS, виловлювали пастерівською піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками під мікроскопом. В дослідженнях використовували ооцити корів з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом [18]. Яєчники самиць (рис. 2) транспортували в лабораторію упродовж 2 – 8 год у термосі з фізіологічним розчином за температури +38°C.



1. ОКК корів, придатні для культивування *in vitro*. Збільшення 56x (об. 4x, ок. 14x)

ОКК корів культивували в чотирьохлункових планшетах упродовж 24 год за температури 38,5°C, 5% CO₂ у повітрі, в краплях середовища TCM-199 з 10% попередньо інактивованою сироваткою корів, 2,5 мкг/мл FSH, 1,0 мкг/мл 17β-естрадіолу, 2,5 МОд/мл LH, 2,0 мМ натрію пірувату, 2,92 мМ кальцію лактату, 40 мкг/мл гентаміцину.



2. Яєчники корови на стадії фолікулярного росту

Частина прокультивованих гамет підлягала цитогенетичному аналізу, які готували за методом Tarkowski A.K. [19], забарвлювали 2%-м розчином Giemsa та аналізували під мікроскопом. Решта частини яйцеклітин підлягала заплідненню *in vitro*. Для запліднення *in vitro* яйцеклітин корів використовували заморожену сперму бугая. Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) в середовищі Sperm-TALP за методикою Parrish J.J. et al. [20]. Спільне інкубування яйцеклітин і сперматозоїдів проводили в термостаті за температури +38,5°C, 5% CO₂ в повітрі в краплях середовища Fert.-TALP упродовж 12-18 год. Далі яйцеклітини та зиготи відмивали від прилиплої сперми і переносили в краплі середовища CDM для подальшого культивування поза організмом. Цитогенетичні препарати гамет після запліднення *in vitro* та отриманих зародків готували за методом Ushijima M. et al. [21], забарвлювали 2%-м розчином Giemsa та досліджували під мікроскопом.

В дослідженнях яєчники доставляли в лабораторію упродовж 2 год – група А, 4 год – група Б, 6 год – група В, 8 год – група Г. Встановлено (табл. 2) залежність терміну початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів на подальший розвиток гамет самиць в умовах *in vitro*.

2. Аналіз розвитку ооцитів корів *in vitro* за різних часових параметрів початку їх активації

Варианти дослідів	Термін зберігання, год	Кількість прокультивованих клітин	Кількість клітин:					
			на МІ мейозу		на інших стадіях мейозу		з дегенерованим хроматином	
			n	%	n	%	n	%
А	2	81	67	82,7 ^a ±4,2	4	4,9 ±2,4	10	12,4 ^e ±3,7
Б	4	89	67	75,3 ^{ad} ±4,6	9	10,1 ±3,2	13	14,6 ^{eh} ±3,7
В	6	96	59	61,5 ^b ±5,0	10	10,4 ±3,1	27	28,1 ^f ±4,6
Г	8	84	41	48,8 ^c ±5,5	6	7,1 ±2,8	37	44,0 ^g ±5,4

Примітка 1. * - термін культивування становив 24 годин

Примітка 2. b : d; f : h; f : g – P < 0,05; a : b; e : f – P < 0,01; a : c; e : g – P < 0,001

Збільшення терміну початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів з 2 до 8 год призводить до значного зменшення (з 82,7 до 48,8%) показника дозрівання поза організмом ооцитів корів до МІ мейозу. Показник кількості гамет з дегенерованим хроматином у цих експериментальних групах збільшувався відповідно з 12,4 до 44,0%.

3. ЕФЕКТИВНІСТЬ ОДЕРЖАННЯ ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ *IN VITRO* ЗА ЗАСТОСУВАННЯ РІЗНИХ ЧАСОВИХ ПАРАМЕТРІВ ПОЧАТКУ АКТИВАЦІЇ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ *IN VITRO*

ОКК з малих і великих антральних фолікулів можна вилучити безпосередньо з тканини яєчника та активувати *in vitro* для отримання зрілих гамет. Збір ооцитів для ДРТ від живих тварин є дороговартісним та потребує застосування спеціального обладнання. Використання яєчників від забитих тварин забезпечило доступне джерело ооцитів для наукових та виробничих лабораторій, які спеціалізуються на ДРТ тварин. Однак транспортування яєчників в ембріологічні лабораторії для ІVP є однією із ключових проблем країн з великою територіальною площею та/або в умовах з обмеженими ресурсами де місце забою тварин розташовано віддалено від лабораторії. Транспортування яєчників на великі відстані має негативний вплив на біологічний потенціал ооцитів з точки зору ядерного дозрівання та розвитку після ІVM та ІVF.

Яєчники необхідно відібрати та транспортувати до лабораторії відразу після забою, щоб ефективно використовувати ооцити, що містяться в них. Склад середовища для транспортування, час транспортування, а також температура є одними з факторів, що впливають на життєздатність фолікулів і ооцитів, а також на біологічну повноцінність ооцитів. Отже, були проведені численні дослідження щодо покращення та збереження біологічної повноцінності ооцитів шляхом модифікації умов під час транспортування. Ці дослідження показали, що транспортування яєчників можливе без значної шкоди для ооцитів і фолікулів. Проте, залишаються відмінності між видами тварин щодо чутливості ооцитів до умов транспортування.

Ми вивчали вплив різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів на ефективність одержання ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* та їх подальший розвиток (табл. 3).

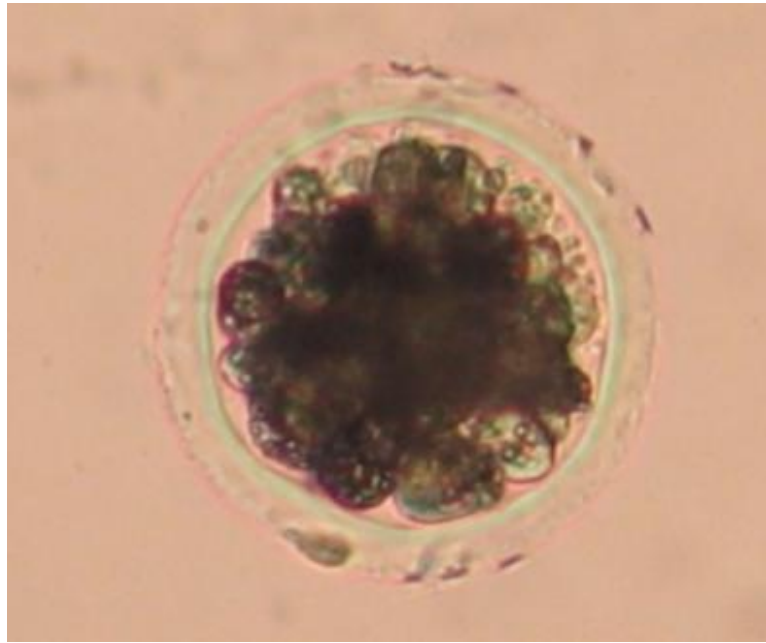
3. Ефективність одержання ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* за застосування різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів

Варианти дослідів	Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадіях:									
		2 клітинних		3-4 клітинних		5-8 клітинних		9-16 клітинних		морула + бластоциста	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
А	81	34	42,0 ^a ±5,5	29	35,8 ^c ±5,3	24	29,6 ^f ±5,1	19	23,5 ⁱ ±4,7	9	11,1 ^l ±3,5
Б	89	38	42,7 ^a ±5,2	32	36,0 ^c ±5,1	25	28,1 ^f ±4,8	17	19,1 ^{ij} ±4,2	8	9,0 ^{lmo} ±3,0
В	70	22	31,4 ^{ab} ±5,5	18	25,7 ^{ce} ±5,2	12	17,1 ^{fn} ±4,5	7	10,0 ^j ±3,6	2	2,9 ^{mn} ±1,9
Г	80	15	18,6 ^b ±4,4	7	8,6 ^d ±3,2	4	5,0 ^g ±2,4	1	1,3 ^k ±1,2	0	0,0 ⁿ ±0,0

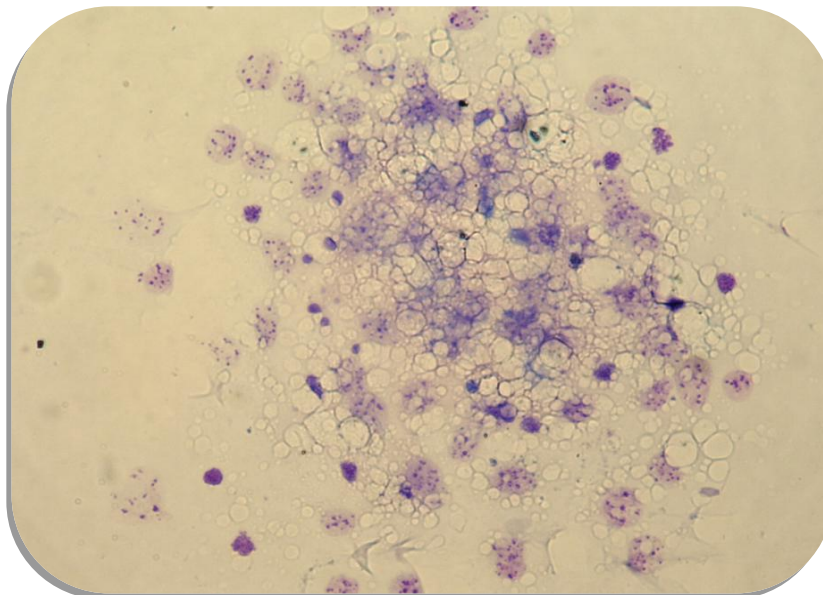
Примітка 1. * - термін зберігання, год: А-2, Б-4, В-6, Г-8

Примітка 2. d : e; g : h; i : j; j : k; l : m – P < 0,05; n : o – P < 0,01; a : b; c : d; f : g; i : k; l : n – P < 0,001

За результатами морфологічного та цитогенетичного аналізів попередньо прокультивованих поза організмом упродовж 24 год ооцит-кумулюсних комплексів корів за різних часових параметрів початку їх активації встановлено різний рівень формування *in vitro* ембріонів (рис. 3, 4).



**3. Сформований *in vitro* ембріон ВРХ на стадії морули.
Збільшення 56х (об. 4х, ок. 14х).**



**4. Цитогенетичний препарат отриманої *in vitro* бластоцисти
(n=65). Збільшення 1000х (об. 100х, ок. 10х).**

Біологічну повноцінність дозрівання поза організмом ооцитів корів, що були отримані з яєчників за різних часових параметрів початку їх активації, перевіряли шляхом їх запліднення *in vitro*. В разі початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів через 2 години (варіант – А) та послідуєчого запліднення дозрілих поза організмом яйцеклітин корів кількість отриманих *in vitro* зародків становить 42,0%.

За результатами запліднення дозрілих поза організмом ооцитів великої рогатої худоби в разі початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів через 4 години (варіант – Б) показник кількості *in vitro* отриманих зародків становив 42,7%.

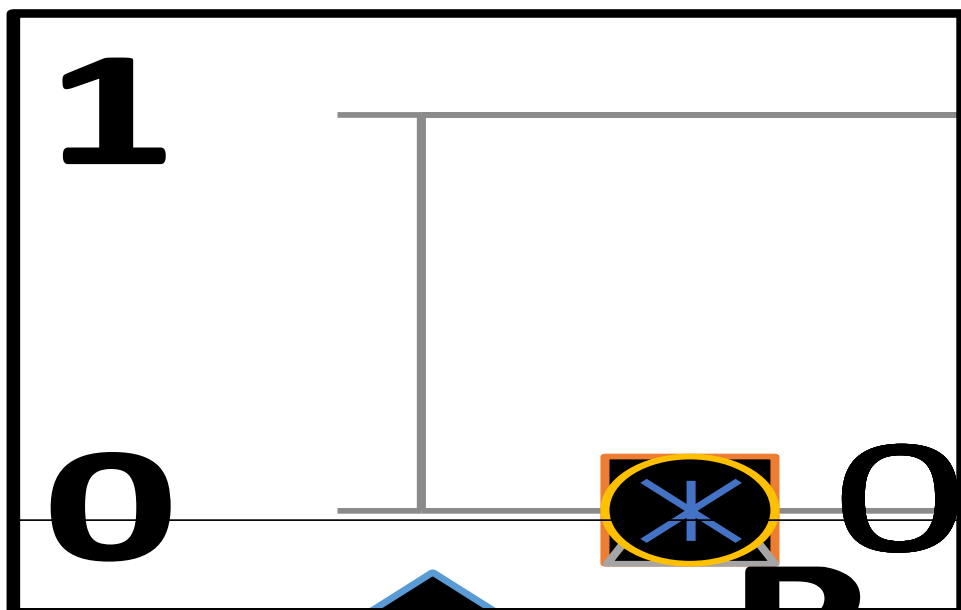
Встановлено, що після культивування ооцит-кумулюсних комплексів та наступного запліднення поза організмом яйцеклітин в разі початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів 6 годин отримано 31,4% (варіант В) зародків в умовах *in vitro*.

Культивування ооцитів корів у разі активації їх дозрівання 8 годин (варіант Г) показало, що після запліднення та наступного культивування зигот поза організмом отримано 18,6% зародків.

Під час дослідження коефіцієнта дроблення (рис. 5) (кількість ембріонів на відповідній стадії розвитку від загальної кількості ембріонів) встановлено, що коефіцієнт дроблення 2-клітинних ембріонів збільшувався від 29,6 до 36,1% у дослідних групах А-В та був найбільший у групі Г – 55,6%.

Через 48 годин культивування коефіцієнт дроблення ембріонів у дослідних групах був майже однаковий (А – 25,2%, Б – 26,7%, В – 29,5%, Г – 25,9%).

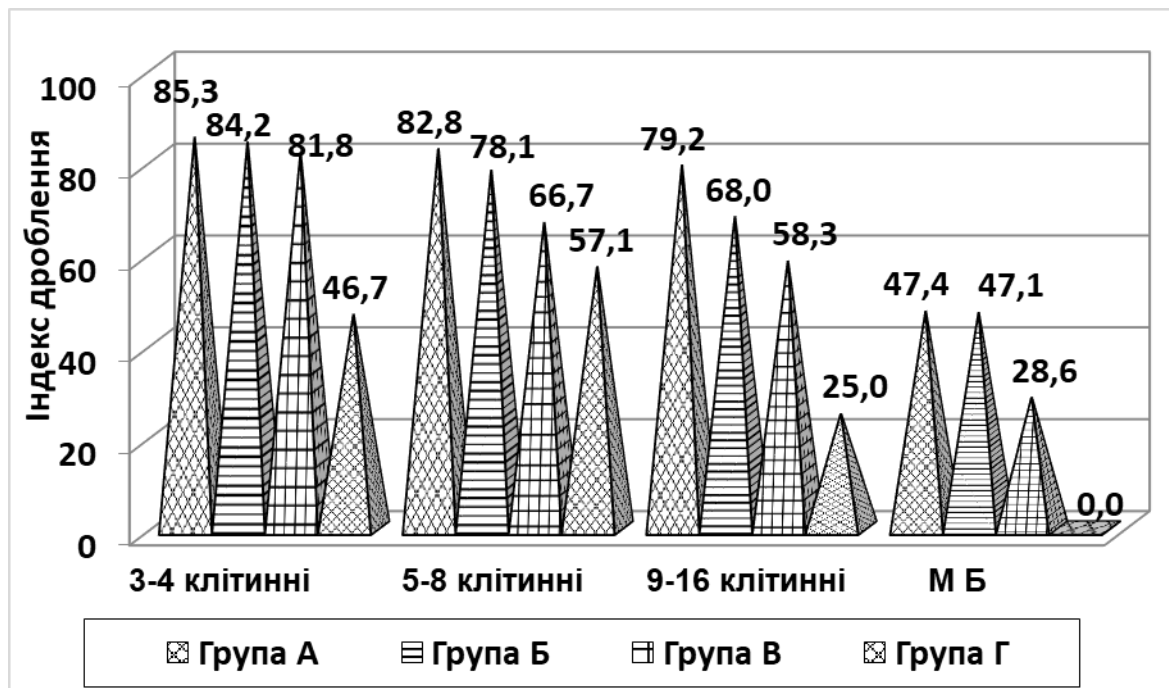
Подальше культивування ембріонів до 72 год призводить до зменшення коефіцієнта дроблення в дослідній групі Г (14,8%) та був майже однаковий в групах А-В (відповідно 20,9; 20,8; 19,7%). На четверту добу культивування ембріонів, отриманих за різних часових параметрів початку активізації *in vitro* дозрівання ооцитів та запліднених поза організмом яйцеклітин корів спостерігали зменшення коефіцієнту дроблення з 16,5 до 3,7%, відповідно у дослідних групах А-Г. Через 120 годин культивування ембріонів у дослідних групах А-Г спостерігали різні коефіцієнти дроблення від 7,8 до 0,0%, відповідно.



5. Коефіцієнт дроблення *in vitro* ембріонів за різних часових параметрів початку активізації *in vitro* дозрівання ооцитів корів

Крім коефіцієнта дроблення зародків після запліднення *in vitro* не меншу інформативність має й індекс дроблення ембріонів (співвідношення кількості ембріонів певної стадії до наступної стадії їх розвитку). Аналізуючи подальше дроблення ембріонів, що були отримані з дозрілих та запліднених яйцеклітин за різних часових параметрів початку активізації *in vitro* дозрівання ооцитів (рис. 6) встановлено значні коливання індексу дроблення.

Індекс дроблення 3-4 клітинних ембріонів був найменший у групі Г, і становив 46,7%, порівняно з групами А-В (відповідно 85,3; 84,2; 81,8%), що пов'язано з впливом різних часових параметрів початку активізації *in vitro* дозрівання ооцитів. Подальше культивування до 5-8-клітинних ембріонів призводило до значного зменшення індексу дроблення в групах А, Б, В (відповідно 82,8; 78,1 та 66,7%) і збільшення його в групі Г до 57,1%. Найбільше зменшення індексу дроблення 9-16-клітинних ембріонів спостерігали в групі Г (25,0%). Через 120 годин культивування ембріонів спостерігали зменшення індексу дроблення у групі В до 28,6% та 0,0% у дослідній групі Г.



6. Індекс дроблення *in vitro* ембріонів за різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів корів

Таким чином, аналіз результатів експериментальних досліджень показав різну ефективність одержання ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* за застосування різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів. Порівняльний аналіз різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів показав вірогідну різницю між групами за таких показників як дозрівання до МІІ мейозу та кількістю клітин з дегенерованим хроматином. Отже, в разі збільшення терміну початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів корів з 2 до 8 год необхідно врахувати, що лише 48,8% гамет відновлять мейотичне дозрівання до стадії МІІ мейозу. Слід відмітити, що досліджені терміни початку активізації *in vitro* дозрівання ооцитів корів можна застосовувати в системі збереження та відтворення генофонду великої рогатої худоби *in vitro*.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено біотехнологічну модель ефективного одержання ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* за застосування різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів.
2. За умов коли неможливо забезпечити транспортування репродуктивного матеріалу самиць до біотехнологічної лабораторії,

подовження терміну початку активації дозрівання *in vitro* ооцитів корів є одним із варіантів для отримання цінного генетичного матеріалу самиць для подальших біотехнологічних маніпуляцій.

3. Показано, що за збільшення терміну початку активації дозрівання *in vitro* ооцитів корів з 2 до 8 год та послідуєчого культивування зменшується кількість гамет отриманих на МІІ мейозу на 33,9% і збільшується кількість клітин з дегенерованим хроматином на 31,6%.

4. Встановлено, що за збільшення терміну початку активації дозрівання *in vitro* ооцитів корів з 2 год до 8 год відбувається зменшення кількості сформованих *in vitro* ембріонів на пізніх стадіях розвитку (11,1% та 0%, відповідно).

5. Встановлено, що за термінів початку активації дозрівання 6 і 8 год рівень дроблення *in vitro* ембріонів зменшується на 10,6% та 23,4%, порівняно із 2 годинами, а за терміну початку активації дозрівання ооцитів 4 год становив 42,7%.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Martín-Maestro A., Sánchez-Ajofrín I., Maside C., Peris-Frau P., Medina-Chávez D-A., Cardoso B., Navarro J. C., Fernández-Santos M. R., Garde J. J., Soler A. J. Cellular and Molecular Events that Occur in the Oocyte during Prolonged Ovarian Storage in Sheep. *Animals*. 2020. Vol. 10 (12). P. 2414. <https://doi.org/10.3390/ani10122414>

2. Wang Y. S., Zhao X., Su J. M., An Z. X., Xiong X. R., Wang L. J., Liu J., Quan F. S., Hua S., Zhang Y. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Science*. Vol. 2011. 124 (1-2). P. 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.01.015>

3. Bohlooli Sh., Bozoğlu Ş., Cedden F. HEPES buffer in ovary-transportation medium influences developmental competence of cattle oocytes. *South African Journal of Animal Science*. 2015. Vol. 45, no. 5. P. 538-546. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v45i5.11>

4. Özdas O. B., Tas M., Umut C., Mithat E., Bacinoglu S., Kamber D., Ak K., Ileri I. K. Effect of different transport temperatures of cattle and sheep ovaries on *in vitro* maturation of oocytes. *Medycyna Wet.* 2006. Vol. 62, iss. 2. P. 162-164. <https://hdl.handle.net/11468/20743>

5. Matsukawa K., Akagi S., Adachi N., Kubo M., Hirako M., Watanabe S., Takahashi S. Effect of Ovary Storage on Development of Bovine Oocytes after Intracytoplasmic Sperm Injection, Parthenogenetic Activation, or Somatic Cell Nuclear Transfer. *Journal of Mammalian Ova Research*. 2007. Vol. 24, no 3. P. 114-119. <https://doi.org/10.1274/jmor.24.114>
6. Goodarzi A., Shahneh A. Z., Kohram H., Sadeghi M., Moazenizadeh M. H., Fouladi-Nashta A., Davachi N. D. Effect of melatonin supplementation in the long-term preservation of the sheep ovaries at different temperatures and subsequent in vitro embryo production. *Theriogenology*. 2018. Vol. 106, iss. 15. P. 265-270. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.009>
7. Khursheed Ahmad S., Beenish Q. Effect of Ovarian Storage Temperature and Time on Post Thaw Viability and Maturation Rate of Vitrified Immature Oocytes in Sheep. *Cryoletters*. 2022. Vol. 43, n. 5. P. 289-294(6). DOI: <https://doi.org/10.54680/fr22510110412>
8. Febretrisiana A., Setiadi M. A., Karja N. W. K. Nuclear maturation rate of sheep oocytes in vitro: effect of storage duration and ovary temperature. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 2015. Vol. 40, n. 2. P. 93-99. <https://doi.org/10.14710/jitaa.40.2.93-99>
9. Tellado M., Alvarez G., Dalvit G., Cetica P. The Conditions of Ovary Storage Affect the Quality of Porcine Oocytes. *Advances in Reproductive Sciences*. 2014. Vol. 2. P. 56-67. doi:10.4236/arsci.2014.23007.
10. Wongsrikeao P., Otoi T., Karja N. W. K., Agung B., Nii M., Nagai T. Effects of Ovary Storage Time and Temperature on DNA Fragmentation and Development of Porcine Oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 2005. Vol. 51 (1). P. 87-97. DOI:10.1262/jrd.51.87
11. Guignot F., Bezard J., Palmer E. Effect of Time during Transport of Excised Mare Ovaries on Oocyte Recovery Rate and Quality after in Vitro Maturation. *Theriogenology*. 1999. Vol. 52. P. 757-766. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00169-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00169-7)
12. Evecen M., Cirit U., Demir K., Ozdas O. B., Tas M., Birler S., Pabuccuoglu S. Effects of Estrous Cycle Stage and Transport Temperature of Ovaries on in Vitro Maturation of Canine Oocytes. *Animal Reproduction Science*. 2010. Vol. 117. P. 160-165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.03.00>

13. Evecen M., Cirit U., Demir K., Karaman E., Hamzaoglu A. I., Bakirer G. Developmental Competence of Domestic Cat Oocytes from Ovaries Stored at Various Durations at 4°C Temperature. *Animal Reproduction Science*. 2009. Vol. 116. P. 169-172. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.01.00>
14. Yoshida T., Alam M. E., Hanafusa K., Tsujimoto Y., Tsukamoto M., Kanegi R., Inaba T., Sugiura K., Hatoya S. Effects of the preservation medium and storage duration of domestic cat ovaries on the maturational and developmental competence of oocytes *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*. 2022. Vol. 68, n. 2. P. 160-164. <https://doi.org/10.1262/jrd.2021-084>
15. Evecen M., Demir K., Arıcı R., Yağcıoğlu S., Ersoy N., Coşkun N., Armutak E., Üvez A., Gürel Gürevin E., Eser A., Atalla H., Ak K., Pabuccuoğlu S., Birlir S. Effects of ovary transport and storage temperature on *in vitro* maturation and cumulus cell apoptosis rates in cat oocytes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2018. Vol. 24 (2). P. 301-306. DOI: 10.9775/kvfd.2017.18880
16. Franko Y., Ferraz M. A. M. M. Effects of bovine ovarian storage conditions and vitrification on isolated preantral follicle viability. *Reproduction and Fertility*. 2024. Vol. 5, iss. 1. e230071. DOI: <https://doi.org/10.1530/>
17. Barberino R. S., Silva J. R. V., Figueiredo J. R., Matos M. H. T. Transport of Domestic and Wild Animal Ovaries: A Review of the Effects of Medium, Temperature, and Periods of Storage on Follicular Viability. *Biopreservation and Biobanking*. 2019. Vol. 17 (1). P. 84-90. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0057>
18. Гузеватий О. Є., Троцький П. А., Собко Ю. М. Методики оцінки якості ооцит-кумулюсних комплексів корів для кріоконсервування. *Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві*. Київ : Аграрна наука, 2005. С. 180-187.
19. Tarkowski A. K. An air drying method for chromosoma preparation from mouse eggs. *Cytogenetics*. 1966. Vol. 5. P. 394-400.
20. Parrish J. J., Susko-Parrish J., Winer M. A, First N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*. 1988. Vol. 38 (5). P. 1171-1180. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>
21. Ushijima M., Okuda M., Nakajama T. et al. Relationship between the cell number and Quality of Day-8 bovine blastocysts. *Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans*. 1988. № 9. P. 37-38.

НАУКОВО-ПРАКТИЧНЕ ВИДАННЯ

**Петро Анатолійович Троцький
Оксана Василівна Щербак
Оксана Юріївна Лизогуб
Світлана Іванівна Ковтун**

**ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ТРАНСПОРТУВАННЯ
ЖИТТЄЗДАТНИХ ЯЄЧНИКІВ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН**

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Підписано до друку 14.11.25 р.
Формат 60 x 84 ¹/₁₆. Папір офсетний.
Гарнітура Times New Roman.
Ум. друк. 2,4 арк. Наклад 100 прим.

Видання та друк – Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН,
08321, Київська обл., Бориспільський район, с. Чубинське, вул. Погребняка, 1.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 7292 від 25.03.2021 р.