

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця

П. А. ТРОЦЬКИЙ, О. В. ЩЕРБАК, С. І. КОВТУН

ОПТИМІЗАЦІЯ
умов транспортування
життєздатних яєчників
сільськогосподарських
ТВАРИН

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Київ
Аграрна наука
2026

УДК 591.3:57.089.3:636
DOI: 10.31073/978-966-540-683-9
О 60

Рекомендовано до друку
вченою радою Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН
14 листопада 2025 р. (протокол № 11)

Рецензенти:

С. Л. Войтенко – доктор сільськогосподарських наук, професор, провідний науковий співробітник лабораторії наукових досліджень з питань інтелектуальної власності та маркетингу інновацій (Інститут свиначства і агропромислового виробництва НААН);

О. Д. Бірюкова – доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, завідувачка лабораторії селекції великої рогатої худоби (Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН)

Авторський колектив:

П. А. Троцький – кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник;

О. В. Щербак – кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник;

С. І. Ковтун – доктор сільськогосподарських наук, професор, академік НААН
(Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН)

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

О 60 Оптимізація умов транспортування життєздатних яєчників сільськогосподарських тварин : методичні рекомендації. Київ : Аграрна наука, 2026. 44 с. [Trotskyi P., Shcherbak O., Kovtun S. Optimization of transportation conditions for viable ovaries of farm animals : methodological recommendations. Kyiv : Agrarna nauka, 2026. 44 p.].

ISBN 978-966-540-683-9

У рекомендаціях узагальнено методичні підходи до 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 активації *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 вдосконалювати біотехнологічні методи відтворення з метою подальшого їх упровадження в практику.

Розраховані на спеціалістів з біотехнології відтворення людини та сільськогосподарських тварин, викладачів, здобувачів наукового ступеня доктора філософії та докторантів ЗВО та ін.

The recommendations summarize methodological approaches to the beginning of *in vitro* activation of oocyte maturation of farm animals, which extends the terms of use of biological material for further biotechnological manipulations with gametes. The results of the influence of different time parameters of the beginning of *in vitro* activation of oocyte maturation on the efficiency of obtaining embryos outside the body and their further development are presented. It is shown that for the rational use of breeding (genetic) resources in animal husbandry, it is necessary to develop and improve biotechnological methods of reproduction with the aim of their further implementation in practice.

The recommendations are intended for specialists in the biotechnology of human and farm animal reproduction, scientists, teachers, students and candidates for the scientific degree of Doctor of Philosophy and doctoral students of higher education institutions of biological and agricultural profiles.

УДК 591.3:57.089.3:636

DOI: 10.31073/978-966-540-683-9

© П. А. Троцький, О. В. Щербак, С. І. Ковтун, 2026

© Інститут розведення і генетики
тварин імені М.В. Зубця НААН, 2026

© Державне видавництво
«Аграрна наука» НААН, 2026

ISBN 978-966-540-683-9

Зміст

Перелік умовних скорочень	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.....	30
3. Ефективність одержання ембріонів великої рогатої худоби <i>in vitro</i> за застосування різних часових параметрів початку активації дозрівання ооцитів <i>in vitro</i>	34
ВИСНОВКИ	40
Список рекомендованої літератури	41

Перелік умовних скорочень

АТФ –	аденозинтрифосфат
АФА –	активні форми азоту
АФК –	активна форма кисню
ВКМ –	внутрішньоклітинна маса
ДРТ –	допоміжні репродуктивні технології
ДМСО –	диметилсульфоксид
М I –	метафаза 1
М II –	метафаза 2
мас./об. –	маса/об'єм
мкмоль –	мікромоль
ммоль –	мілімоль
МО –	міжнародні одиниці
нг –	нанограм
об./об. –	об'єм/об'єм
ОКК –	ооцит-кумулюсний комплекс
ТЕ –	трофктодерма
УЗД –	ультразвукова діагностика
ФСГ –	фолікулостимулюючий гормон
BAX –	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 –	dibutyl cyclic AMP – дибутирил циклічний AMP
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

Перелік умовних скорочень

HEPES –	(4-(2-гідроксиетил)-1-піперазингетансульфонова кислота) – органічний буферний агент, який підтримує стабільний рівень рН у діапазоні 6,7–8,6 під час роботи з клітинними культурами
hpi –	hours post-insemination – кількість 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
LH –	luteinizing hormone – лютеонізуючий гормон
m-HTF –	modified human tubal fluid – модифікована трубна рідина людини
mSOF –	modified synthetic oviduct fluid – модифікована синтетична рідина яйцепроводу
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 –	Tyrodé'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 для зберігання і практичного використання репродуктивних клітин та 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 і розв'язання проблеми короткострокового зберігання яєчників самиць сільськогосподарських тварин, що розширює доступ до базового біологічного матеріалу і збільшує строки його використання для подальших біотехнологічних маніпуляцій з клітинами. Короткострокове зберігання яєчників самиць тварин є одним із прогресивних напрямів розвитку сучасної біотехнології.

Нормальний клітинний метаболізм виробляє АФК і АФА, які регулюють різноманітні функції клітин. Такі форми активно реагують на ліпіди, білки та нуклеїнові кислоти, що призводить до втрати цілісності мембрани, структурних або функціональних змін у білках і пошкодження нуклеїнових кислот. Це називається окислювальним стресом. Під час транспортування яєчника до лабораторії зупин-

ка кровотоку зменшує надходження кисню та енергії до яєчників, що спричиняє їх ішемічний стан. 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 факторами, що впливають на відновлення дозрівання ооцитів поза організмом. Клітинний автоліз може відбуватися в яєчниках під час тривалого транспортування за температури $+35-38^{\circ}\text{C}$. 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 в живих тварин шляхом відбору яйцеклітин. Відмінності в якості ооцитів можуть бути пов'язані зі стресом, що виникає під час IVP, яке починається з відокремлення яєчника. Практичні проблеми, з якими часто стикаються ембріологи, – це вплив часу транспортування, середовища та температури під час транспортування на ефективність маніпуляцій з біологічним матеріалом.

1. Ефективність різних часових параметрів початку активації дозрівання ооцитів *in vitro*

Допоміжні репродуктивні технології (ДРТ) у тваринництві широко застосовуються в програмах з генетичного вдосконалення та тиражування тварин з бажаним генотипом, оскільки вони є потужним інструментом прискорення генетичного прогресу. Упродовж останніх десятиліть було досягнуто певних успіхів, пов'язаних з ефективним одержанням 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 тварин, проявляють знижений потенціал розвитку поза організмом. Крім того, місця забою тварин зазвичай розташовані на певній відстані від ембріологічних лабораторій. Тому 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 (оперативно чи після забою) припиняється кровоток, що перешкоджає надходженню в нього кисню та енергії і, як наслідок, виникає ішемічний стан яєчників. Основним механізмом негативного впливу під час ішемії є гіпоксія, і в клітинах з високою швидкістю метаболізму, включаючи тих, що утворюють тканину яєчника, дуже швидко з'являється тенденція до ушкодження. Гостра гіпоксія призводить до виснаження АТФ, що викликає перехід до гліколізу – основного

анаеробного шляху виробництва АТФ. Він розщеплюється без повторного синтезу і, зрештою, енергоефективність знижується та відбувається накопичення молочної кислоти, яка утворюється в результаті гліколізу, що, у свою чергу, знижує внутрішньоклітинний рН та спричиняє додаткову клітинну дисфункцію.

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, ще й досі залишаються не повністю з'ясованими. Тому необхідно встановити, які механізми відбуваються в ооциті на клітинному та молекулярному рівнях, щоб вжити відповідних заходів щодо зменшення цього пошкодження [1].

Y. S. Wang et al. (2011) [2] вивчали вплив температури зберігання яєчників під час транспортування на здатність до розвитку яйце-клітин великої рогатої худоби для використання в технології SCNT. Яєчники, отримані на бойні, зберігали у фізіологічному розчині упродовж 3–4 год за трьох температурних режимів: +15 °C, +25 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 BAX 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 t +25 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 або +35 °C. Відносна кількість BAX і Hsp70.1 у бластоцистах на 7-й день, отриманих з ооцитів, що зберігали в яєчниках за температури +15 °C, була меншою, ніж у тих, що зберігали за температури +25 або +35 °C ($P < 0,05$). Встановлено, що температура зберігання +15 °C упродовж 3–4 год справляла значний позитивний вплив на якість і здатність до розвитку ооци-

тів, які використовували для SCNT, завдяки зменшенню стресостійкості ооцитів порівняно з тими, які зберігали за температури +25 або +35 °C [2].

Sh.Bohlooli et al. (2015) [3] 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. 1.1) і трьох температурних режимах (+4, +25, +38 °C). Після доставки до лабораторії яєчники розрізали та промивали середовищем для дозрівання за температури +38 °C для отримання ОКК. Для IVM були відібрані ОКК, або ооцити без клітин кумулюсу з дрібнозернистою гомогенною оплазмою.

Таблиця 1.1. Склад середовищ для транспортування яєчників

Component (mmol) (компонент, ммоль)	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

Примітка. NS – normal saline (нормальний фізіологічний розчин); PBS – phosphate buffer saline (фосфатно-буферний розчин); KSOM – K simplex optimization medium (середовище для оптимізації симплексу K); CZB – Chatot–Ziomek–Bavister medium (середовище Шато–Цюмека–Бавістера); CR1 – Charles Rosenkrans medium (середовище Чарльза Розенкранса).

Потім відібрані ОКК тричі промивали середовищем для дозрівання та культивували в групах по 20 клітин під шаром мінеральної олії в 100 мкл середовища TCM-199, доповненого 0,4 ммоль піруватом натрію, 1 L-глутаміну, 100 мкмоль цистеаміну, 10% (об./об.) FBS, 20 мкг/мл ФСГ, 2 естрадіолу і 50 мкг/мл гентаміцину. ОКК культивували за температури $+38,5^{\circ}\text{C}$ у зволоженій атмосфері з 5% CO_2 , 5 – O_2 і 90% N_2 . Через 24 год після IVM оцінювали кількість ооцитів, у 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.

20 ОКК, які дозрівали поза організмом, піддавали спільному культивуванню зі спермою, відібраною за допомогою методу градієнта щільності Перколла з концентрацією 1×10^6 сперматозоїдів/мл у 200 мкл краплі середовища для запліднення та інкубували за температури $+38,5^{\circ}\text{C}$ з 5% CO_2 , 5 – O_2 і 90% N_2 . Середовище для запліднення Fert-SOF доповнювали 100 МО/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2 ммоль кофеїну та 10 мкг/мл гепарину. Через 18 год 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 зволоженій атмосфері з вмістом 5% CO_2 та 5% O_2 . 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 подальшого 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. Установлено, що транспортування за температури $+4^{\circ}\text{C}$ привело 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 справляло 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. Суттєвої різниці у кількості отриманих морул та бластоцист або в кількості ВКМ та ТЕ клітин щодо умов транспортування не виявлено.

Установлено, що середовище та температура, за яких транспортують яєчники, значно впливають на дозрівання ооцитів великої рогатої худоби. З'ясовано, що температура транспортування $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ є оптимальною для дозрівання ОКК. Транспортування яєчників у середовищі CR1 і KSOM також сприяє збільшенню кількості дозрілих клітин. Але на кількість отриманих ембріонів впливала не температура транспортування, а лише середовище, в якому транспортували яєчники CR1, CZB та KSOM. Тому додавання HEPES до середовища транспортування яєчників позитивно впливає на якість і компетентність подальшого розвитку ОКК. Використання таких середовищ, як CR1, CZB і KSOM, які містять HEPES за температури $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, можна рекомендувати під час транспортування яєчників та подальшого IVM і IVP [3].

О.В. Özdas et al. (2006) [4] вивчали вплив різних температур транспортування ($+4$, $+32\text{ }^{\circ}\text{C}$) яєчників овець і корів на дозрівання ооцитів *in vitro*. Було сформовано дві експериментальні групи. Дослідження повторювали 6 разів. Яєчники переносили в термосі зі стерильним фізіологічним розчином і доставляли в лабораторію впродовж 2–4 год. По одному яєчнику корів та овець переносили в термосі, що містив $0,9\%$ NaCl за температури $+32\text{ }^{\circ}\text{C}$, інший яєчник тієї самої тварини спочатку поміщали в $0,9\%$ NaCl за температури $+32\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 10 хв, потім переносили в термос з $0,9\%$ NaCl за температури $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 шарів клітин кумулюсу, що оточували їх.

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 ммоль L-глутаміну) і один раз – у середовище для дозрівання (з буфером HEPES TCM-199 з додаванням 1 ммоль L-глутаміну, 0,2 ммоль 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 вмістом в повітрі 5% CO₂, 5 – O₂, 90% N₂ за температури +38,8 °С. Дозрілі ооцити очищали від кумулюсних клітин хіміко-механічним методом з використанням гіалуронідази. Після цього їх поміщали в 0,7% KCl на 5 хв для приготування препаратів. Препарати фіксували в суміші оцтова кислота – етиловий спирт (1:3) упродовж 48 год. 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 °С, ооцити досягали 30,6% М I і 15,3% М II мейозу, а ооцити великої рогатої худоби – 17,3% М I і 46,8% М II мейозу. У групі за t +32 °С кількість дозрілих клітин становила, відповідно, в овець 33,1 і 38,3%, у корів – 19,3 і 55,4%. Із ооцитів овець, яєчники яких транспортували за температури +32 °С, було отримано більшу кількість гамет на стадії М II, ніж із тих, що були транспортовані за температури +4 °С ($P < 0,001$), але статистично значущої різниці між дозріванням до стадії М II ооцитів, отриманих з яєчників корів, транспортованих за температури +4 і +32 °С, не спостерігалось. Встановлено, що немає статистично вірогідної різниці в кількості дозрілих ооцитів корів, яєчники яких транспортували за температури як +4 °С, так і +32 °С [4].

К. Matsukawa et al. (2007) [5] досліджували вплив зберігання яєчників на розвиток яйцеклітин корів після інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда, партеногенетичної активації або SCNT.

Відокремлені від тварини яєчники поміщали в PBS без промивання та зберігали за температури $+15^{\circ}\text{C}$ упродовж 2–6 год (контрольна група) або 26–30 год (дослідна група). ОКК отримували з фолікулів яєчників діаметром 2–6 мм, а потім IVM за температури $+38,5^{\circ}\text{C}$ у повітрі з вмістом 5% CO_2 . 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 оцінювання ядерного дозрівання ооцити фіксували в суміші оцтова кислота : етанол (1:3, об./об.) упродовж 24 год і фарбували 1%-м орсеїном, потім їх 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 ньому за температури $+38,5^{\circ}\text{C}$ у 5% CO_2 , 5 – O_2 і 90% N_2 упродовж перших двох днів. Протягом 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 $+38,5^{\circ}\text{C}$ у 5% CO_2 , 5 – O_2 і 90% N_2 протягом семи днів.

На 7-му добу після NT проведено трансплантацію ембріонів. Тваринами-реципієнтами були корови голштинської породи 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-й дні вагітності.

Кількість дозрілих ооцитів була значно нижчою в дослідній групі (67%), ніж у контрольній (78%), а кількість дегенерованих ооцитів – значно вищою в дослідній групі (24%), ніж у контрольній (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 про-

ти 24%, партеногенетична активація – 15 проти 31%). Проте розвиток ембріонів до стадії бластоцисти методом 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, запліднених *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 A. Goodarzi et al. (2018) [6] був проведений експеримент з додаванням різних доз мелатоніну (0 (C), 500 (M1), 600 (M2), 700 (M3) і 800 (M4) мкмоль) як антиоксиданту для середовища зберігання яєчників овець (PBS), які витримували за $t +4$ і $+20$ °C упродовж 24 год. Через цей проміжок часу оцінювали вплив цих параметрів на IVER, включаючи дозрівання, запліднення, дроблення та кількість бластоцист, а також загальну кількість бластомерів. Мелатонін не знижував рівень запліднення ($P \leq 0,05$). Крім того, час зберігання яєчників справляв істотний негативний вплив ($P \leq 0,05$) на параметри IVER. Додавання мелатоніну збільшило загальну кількість бластоцист (тобто середню кількість бластомерних клітин у чотирьох 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 C, M1, M2, M3 і M4 відповідно). За результатами 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. S. Khursheed Ahmad et al. (2022) [7] вивчали вплив

температури і часу зберігання яєчників на життєздатність після розморожування та швидкість дозрівання вітрифікованих незрілих ооцитів у овець. Дослідження полягало в отриманні ооцитів з яєчників овець, забитих на бійні, які зберігали за різних температурних (0, +4 і +25 °C) і часових (0, 6, 12 і 24 год) комбінацій з наступним оцінюванням життєздатності та дозрівання *in vitro*. Вітрифікацію проводили в 30%-му вітрифікаційному розчині, використовуючи етиленгліколь і ДМСО з оцінюванням після вітрифікації через тиждень зберігання.

Значно вищу життєздатність ооцитів після деконсервації спостерігали під час зберігання за температури 0 °C упродовж 6 год (95,3%), а потім 12 год (85%), а найнижчою вона була через 24 год (66,7%). Проте за температур +4 і +25 °C їхня 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 і +4 °C значно вищий відсоток дозрілих ооцитів спостерігали через 6 год (40 і 39,1%), 12 год (37,3 і 38,1%) і 24 год (34,6 і 36,4%) порівняно з такими за температури 0 °C (20,3% через 6 год, 14,2% – через 12 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 у яєчниках, які перебували за температури +4 і +25 °C, порівняно з t 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* в овець і кіз. Для підвищення ефективності досліджень необхідно використовувати велику кількість яєчників, а значних відстаней до лабораторії зазвичай не можна уникнути, коли використовують яєчники статевозрілих тварини. Тому довготривале транспортування яєчників овець може негативно позначатися на здатності до подальшого розвитку ооцитів. A. Martín-Maestro et al.

(2020) [1] оцінювали вплив часу зберігання яєчників (3, 5, 7, 9, 11 та 13 год) і середовища, в якому їх транспортували (ТСМ-199 та фізіологічний розчин), на якість ооцитів.

Яєчники статевозрілих овець ($n = 1420$) транспортували за температури $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ у фізіологічному розчині (8,9 г/л NaCl) з додаванням пеніциліну (0,1 г/л) або за $+38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ у середовищі ТСМ-199 з додаванням полівінілпіролідону (1 г/л), 4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинетансульфонової кислоти (HEPES) (6,51 г/л), стрептоміцину (0,1 г/л), пеніциліну (0,1 г/л) і бікарбонату натрію (0,4) г/л) і витримували упродовж 13 год у тому самому середовищі та за тієї самої температури. 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 їх транспортування до ембріологічної лабораторії. Усього відібрано 4 258 ОКК з восьми повторень, які мали прозору та гомогенну або помірну зернисту оплазму та були щільно оточені щонайменше трьома шарами 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 повторенні ОКК, отримані з яєчників одних 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 мкмоль цистеаміну, 10 нг/мл FSH, 10 нг/мл LH та 10% FCS в мінеральній олії, а також 5% CO_2 в атмосфері за температури $+38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ з максимальною вологістю.

Через 22 год 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 $+38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ у 5% CO_2 з SOF і 10% ESS. Потім сперматозоїди інкубували спільно з ооцитами в кінцевій концентрації 10^6 сперматозоїдів/мл упродовж 18 год за температури $+38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ у 5% CO_2 .

Через 18 год після осіменіння ймовірні зиготи переносили в краплі IVC об'ємом 25 мкл (приблизно один ембріон/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-го дня після осіменіння.

Ооцити, які досягли дозрівання, були очищені 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 $\times 20$ збільшення. Швидкість дозрівання визначали як відношення кількості ооцитів з очевидним полярним тільцем і пластиною М II до загальної кількості проаналізованих ооцитів. Ооцити, що містять пронуклеуси (незалежно від стадії деконденсації), вважали заплідненими та класифікували як нормальні. Після IVM також оцінювали життєздатність і якість кумулюсних клітин, мейотичне дозрівання та здатність до запліднення, кількість і якість бластоцист.

За результатами досліджень встановлено, що через 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. Звідси випливає, що зберігання яєчників у середовищі TCM-199 є шкідливим для кумулюсних клітин та дозрівання ооцитів. З'ясовано, що транспортування яєчників до 5 год у фізіологічному розчині створює оптимальні умови зберігання для підтримки життєздатності ооцитів, а також здатності до розвитку ембріонів овець [1].

A. Febretrisiana et al. (2015) [8] вивчали вплив тривалості та температури зберігання яєчників овець на ядерне дозрівання *in vitro* ооцитів, отриманих із збережених яєчників. Такі яєчники зберігали у фізіологічному розчині упродовж 2–4, 5–7 і 8–10 год за різних температур (+27–28 °C, +36–37 і +4°C). ОКК отримували методом розрізання фолікулів з кожної групи та культивували *in vitro* упро-

довж 26 год. Яєчники довільно розподіляли на 3 групи (за температури +27–28 °С, +36–37 і +4 °С), 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 одержати ОКК у PBS, доповненому 0,3% BSA через 2–4, 5–7 і 8–10 год після оваріоектомії. Використовували лише ооцити із однорідною темно-пігментованою 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 шаром мінеральної олії в інкубаторі з 5% CO₂ за температури +38,5 °С 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. Ядерне дозрівання яйцеклітини визначали за змінами її хромосомної конфігурації та ядерної мембрани.

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

ооцитів, отриманих з яєчників, що зберігали за температури +4 °С, 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 °С упродовж 8–10 год є ефективнішим для підтримки розвитку ооцитів овець, ніж зберігання за вищої температури [8].

М. Tellado et al. (2014) [9] вивчали вплив різних умов зберігання яєчників свиней (час, температура) на характеристики фолікулярної рідини, якості незрілих ооцитів, мейотичне дозрівання та *in vitro* запліднення ооцитів. Яєчники від свинок у віці 5–6 міс. (масою приблизно 100 кг) отримували на місцевій бійні та транспортували в 0,9% (мас./об.) NaCl, що містило 100 000 МО/л пеніциліну та 100 мг/л стрептоміцину.

Яєчники були довільно розподілені до однієї з дев'яти груп (приблизно 15 яєчників у групі): зберігалися за температури +15 °С упродовж 2, 4 і 6 год; за температури +25 °С – упродовж 2, 4 і 6 год і за температури +35 °С – упродовж 2, 4 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. У 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 ммоль цистеїну, 50 мг/л гентаміцину сульфату та 0,5 мг/л свиного FSH (Folltropin-V) плюс 0,5 мг/л свиного LH (Lutropin-V) в мінеральній олії за температури +39 °С упродовж 48 год з вмістом CO₂ у повітрі 5%. Групи приблизно з 50 ОКК дозрівали в 500 мкл культурального середовища.

Після культивування ооцити звільняли від клітин кумулюсу, поміщали в гіпотонічне середовище з 10 г/л цитрату натрію за температури +37 °С 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 за 100× і 400× збіль-

шень. 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, – 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 за 400×g упродовж 5 хв. Осад повторно суспендували в середовищі для запліднення (модифіковане трис-буферне середовище, що складається з 113,1 ммоль NaCl, 3 – KCl, 10 – CaCl₂, 20 – Трис, 11 – глюкози, 5 ммоль пірувату натрію, 4 г/л BSA, 2,5 ммоль кофеїну та 50 мг/л гентаміцину сульфату).

Дозрілі ОКК звільняли від клітин кумулюсу та запліднювали, кінцева концентрація становила 5×10^8 сперматозоїдів/л. Гамети спільно інкубували в модифікованому трис-буферному середовищі під мінеральною олією за температури +39 °C упродовж 18 год з вмістом у повітрі 5% CO₂. 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× та 400×. Ооцити вважалися заплідненими, якщо 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 підвищувались із збільшенням часу зберігання та температури. Зберігання яєчників більше ніж 2 год за температури +25 і +35 °C призвело до низького рН фолікулярної рідини та високого рівня АФК у незрілих ооцитах. Такі умови пошкоджують ооцити та порушують їх мейотичне дозрівання.

Зниження 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 °C упродовж 2 год є найкращими умовами для підтримки відповідної якості ооцитів, мейотичного дозрівання та рівня запліднення *in vitro* [9].

P. Wongsrikeao et al. (2005) [10] було досліджено вплив 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 pH 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 семи 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-го калібру, приєднаної до шприца на 5 мл. Потім їх двічі промивали модифікованим PBS, використовуючи лише ооцити з однорідною ооплазмою та компактним кулулосом. Відібрані ОКК були перенесені в середовище для дозрівання – модифікований розчин NCSU-37 з додаванням 0,6 ммоль цистеїну, 1 ммоль 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 розміщували 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 із солями Ерла, доводячи до рН 7, 8, а потім центрифугували за $200\times g$ упродовж 2 хв, супернатант видаляли, а осад сперми попередньо інкубували упродовж 15 хв за температури $+38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 спермій/мл. Середовище для запліднення складалося з 90 ммоль NaCl, 12 – KCL, 25 – NaHCO_3 , 0,5 – NaH_2PO_4 , 0,5 – MgSO_4 , 10 ммоль лактату натрію, 3 мг/мл BSA, 5 ммоль 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 ммоль пірувату натрію, 2,73 ммоль лактату натрію та 50 мкг/мл гентаміцину. Через 72 год після осіменіння всі ембріони переносили у свіже культуральне середовище: NCSU-37 з додаванням 4 мг/мл BSA, 5,55 ммоль 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 год 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%-й 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 всіх ембріонів на 7-й день їх 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 $+35\text{ }^{\circ}\text{C}$, рН фолікулярної рідини знижувався, а пропорції ооцитів з фрагментованими ядра-

ми 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 °С, не дозрів до М ІІ. Зберігання яєчників за температури +15 °С знижувало кількість запліднених *in vitro* ооцитів та уповільнювало подальший розвиток ембріонів, але не було виявлено суттєвих відмінностей у кількості запліднених та отриманих бластоцист між ооцитами з яєчників, які зберігалися за температури +25 і +35 °С. Встановлено, що зберігання яєчників за температури +25–+35 °С упродовж 6 год є ефективним для підтримки розвитку ооцитів свиней, навіть якщо життєздатність була нижчою, ніж у яєчників, які зберігалися за температури +35 °С упродовж 3 год [10].

У кобили можна отримати *in vivo* лише обмежену кількість ооцитів. 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 впливає на швидкість відновлення ооцитів та їх якість після IVF та наступного культивування.

F. Guignot et al. (1999) [11] вивчали вплив температури та часу транспортування яєчників шляхом оцінювання 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 до +32 і +27,5 °С протягом короткого і тривалого інтервалу відповідно. Отримані ОКК були класифіковані на такі, що мають компактний кумулюс, який повністю або частково оточує ооцит (компактний); ті, що мають чітку межу яйценосного горбка, який 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 (оголений). Усі ОКК, за винятком оголених, які не використовували в дослідженнях, дозрівали *in vitro* протягом 30 год за температури +38,5 °С з вмістом у повітрі 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 чотирьох груп. Після *in vitro* культивування час зберігання не вплинув на ядерне дозрівання, але ооцити з інтактними цитоплазматичними мембранами частіше виявляли через короткий, ніж через тривалий період 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 були виявлені за короткого інтервалу зберігання та розпушеним кумулюсом ОКК, тоді як пошкоджені мембрани та неповне дозрівання – за тривалого зберігання та компактного кумулюсу ОКК [11].

М. Evecen et al. (2010) [12] 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: фолікулярну (проєструс або еструс), лютеїнову (дієструс) і анеструс. Один яєчник кожної пари, отриманий від 39 статевозрілих сук, транспортували у PBS за температури $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, а інший – за температури $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Загалом отримано 1138 ОКК з усіх яєчників. Вони були згруповані та дозрівали в модифікованій mSOF, доповненій FSH, LH, замінними та незамінними амінокислотами за температури $+38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ у зволоженій атмосфері з вмістом 5% CO_2 , 5 O_2 і 90% N_2 упродовж 72 год. Ооцити, отримані з яєчників на фолікулярній і лютеїновій стадії статевого циклу, мали значно кращі показники дозрівання (М I + М II), ніж ооцити, отримані з анеструальних яєчників, транспортованих за температури $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,05$). Однак ооцити, отримані з анеструальних яєчників, транспортовані за температури $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, мали найбільшу кількість дозрілих клітин (М I + М II), і різниця між анеструальними та лютеїновими групами яєчників була значною ($p < 0,05$). Ооцити з анеструальних яєчників, транспортовані за температури $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, мали значно більшу кількість дозрілих клітин, ніж ті, що транспортували за температури $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,0001$). Але температура транспортування ($+37$ або $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) суттєво не вплинула на кількість

дозрілих (М I + М 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 $\times$ стадії статевого циклу вплинули на кількість дозрілих ооцитів, тоді як стадія циклу тійки сама по собі не вплинула. Транспортування яєчників сук за температури $+4^\circ\text{C}$ може покращити *in vitro* дозрівання ооцитів, отриманих з яєчників на стадії анеструсу [12].

Тимчасове зберігання яєчників може забезпечити можливість подовжити життєдіяльність ооцитів з яєчників котів, що перебувають під загрозою зникнення. M. Evecen et al. (2009) [13] вивчали вплив різних періодів зберігання (2, 24 і 48 год) яєчників за температури $+4^\circ\text{C}$ для дозрівання *in vitro* ооцитів котів. Яєчники отримали 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 чотирилункових 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 вивлено 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 у 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, установлено, що 2 або 24 год зберігання яєчників за температури $+4^\circ\text{C}$ не впливає на мейотичне дозрівання ооцитів *in vitro*, а зберігання яєчників 48 год призводить до різкого зниження кількості дозрілих до М II ооцитів [13].

T. Yoshida et al. (2022) [14] 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

ли 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 фолікуло-стимулюючий 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, M I, анафазу I, телофазу I або M II. Ооцити на стадії M II з першим полярним тільцем характеризували як зрілі. Ооцити звільняли від клітин кумулюсу обережним піпетуванням, двічі промивали PBS(–) (PBS без Ca^{2+} і Mg^{2+}) і фіксували 3,7% (мас./об.) параформальдегідом та 1% (об./об.) Triton X-100 у PBS (–) за кімнатної температури ($+22$ – $+25^{\circ}\text{C}$) упродовж 15 хв. Потім ооцити поміщали в PBS(–), що містить 0,3% (мас./об.) полівінілпіролідону за кімнатної температури ($+22$ – $+25^{\circ}\text{C}$) 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 (бісбензimid), на 5 хв, поміщали на предметне скло, накривали покривним скельцем та інкубували за температури $+4^{\circ}\text{C}$ до оцінки під флуоресцентним мікроскопом.

Соломини, що містили кріоконсервовану сперму, розморожували в теплій воді ($+37^{\circ}\text{C}$) 30 с. Потім сперму випустили в m-HTF і центрифугували упродовж 5 хв за $500\times g$, після чого її ресуспендували в HTF, центрифугували упродовж 5 хв за $500\times g$, і концентрацію спермій доводили до $1,5\times 10^6$ клітин/мл у середовищі IVF (HTF з 0,3% BSA). Через 28 год IVM 5–10 ОКК двічі промивали в середовищі IVF і культивували в 100 мкл середовища IVF, покритих мінеральною олією, за температури $+38,5^{\circ}\text{C}$ у зволоженому повітрі (5% CO_2) 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 двох днів, а потім – у середовищі IVC–II упродовж п’яти днів у зволоженому повітрі (5% O₂, 5 – CO₂ і 90% N₂). Середовище IVC I доповнювали 0,3% (мас./об.) BSA, середовище IVC-II – 5% (мас./об.) FBS відповідно. Класифікували ембріони з більш ніж 16 клітинами як морули, а ембріони з бластоцелом – як бластоцисти.

У групі ET-K кількість дозрілих ооцитів була більшою, 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 в інших групах через 24 і 48 год. Також у групі ET-K було отримано більшу кількість бластоцист, ніж в інших групах після зберігання упродовж 24 год, і тільки в ET-K залишалася здатність до подальшого розвитку бластоцист після 48 год зберігання. Встановлено, що ET-K є придатним середовищем для збереження котячих яєчників [14].

М. Evecen et al. (2018) [15] вивчали вплив двох різних температур транспортування (+37 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 овариогістеректомії і зберігалися у фізіологічному розчині за температури +37 або +4 °C до отримання ооцитів упродовж 2 год. Деякі яєчники, транспортовані за температури +4 °C, зберігалися за тією самою температурою впродовж 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 IVM.

ОКК дозрівали упродовж 48 год за температури +38 °C у чотирилункових планшетах, що містили 500 мкл mSOF під шаром мінеральної олії в інкубаторі з 5% CO₂ за майже 100% вологості повітря. Морфологічні особливості апоптозу аналізували в кумулюсних клі-

тинах на початку дозрівання *in vitro* в обох групах транспортування через 24 год. Ступінь апоптозу в кумюлюсних клітинах вимірювали кінцевою дезоксинуклеотидилтрансферазою. Показники IVM ооцитів визначали за допомогою фарбування Hoechst (33342). Хоча морфологічні ознаки апоптозу спостерігали рідко та з однаковою частотою в групах за температури транспортування +37 і +4 °C (19,40 і 21,55%, $P > 0,001$), частіше їх спостерігали в групі 24-годинного холодного зберігання (34,80%, $P < 0,001$). Результати IVM були подібними (49,77, 44,55%) у групах за температури +37 і +4 °C ($P > 0,05$) і, що важливо, нижчими в групах за температури транспортування +4 °C і 24-годинному холодному зберіганні (18,90%, $P < 0,05$). Результати цього дослідження свідчать про те, що кумюлюсні клітини котячих ооцитів частково піддаються апоптозу під час транспортування за теплої або холодної температур; зберігання яєчників упродовж 24 год за температури +4 °C спричиняє апоптоз кумюлюсних клітин за значно вищих норм і негативно впливає на кількість IVM 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 дали змогу 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 у районах, де тварин мало або вони перебувають на великій відстані від лабораторій, що є реальністю для більшості випадків у разі відбору біологічного матеріалу від диких тварин [16].

Короткочасне зберігання яєчників під час 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 перебувають під загрозою зникнення, а також до клонованих або трансгенних тварин, які несподівано загинули чи під час оваріектомії за показаннями. Наразі дослідження спрямовуються на підбір оптимальних умов для збереження життєздатності ооцитів під час транспортування яєчників з метою отримання позитивного кінцевого результату за впливу різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів на ефективність одержання ембріонів.

Щоб досягти такого результату, слід враховувати важливість деяких факторів для підтримки біологічного потенціалу ооцитів, наприклад середовища, температури та часу зберігання. Наразі 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 мають не тільки вибір складу культурального середовища, якості та стадія розвитку ооцитів, а й термін початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів, що розширює доступ до базового біологічного матеріалу і збільшує строки його використання 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. Аналіз передбачав дослідження ефективності одержання ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* та їх подальшого розвитку з урахуванням впливу різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів.

Об'єктом експериментальних досліджень були ОКК корів (рис. 2.1). Ооцити отримували, надрізаючи лезом видимі антральні фолікули, вимивали PBS, виловлювали пастерівською піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками під мікроскопом. У дослідженнях використовували ооцити корів з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом [18]. Яєчники самиць (рис. 2.2) транспортували в лабораторію упродовж 2–8 год у термосі з фізіологічним розчином за температури +38 °С.

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

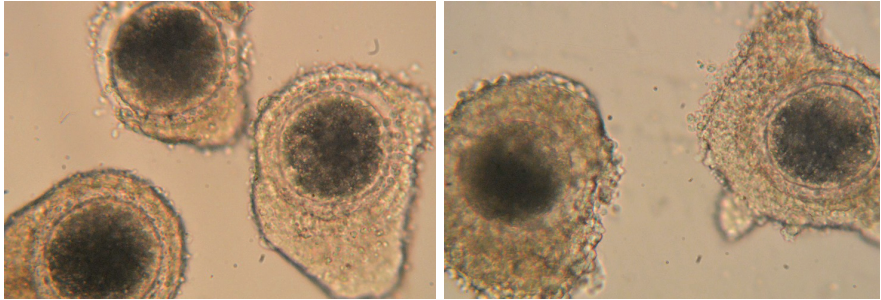


Рис. 2.1. ОКК корів, придатні для культивування *in vitro*.
Збільшення 56× (об. 4×, ок. 14×)

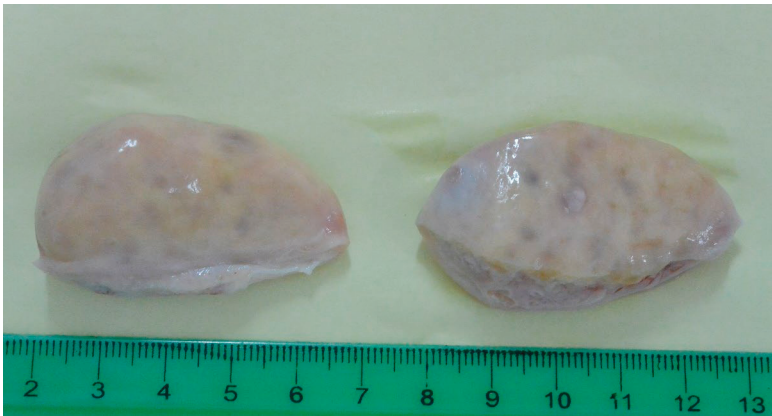


Рис. 2.2. Яєчники корови на стадії фолікулярного росту

Частина прокультивованих гамет, які готували за методом А. К. Tarkowski [19], підлягала цитогенетичному аналізу, їх забарвлювали 2%-м розчином Giemsa та досліджували під мікроскопом. Решту яйцеклітин корів мали запліднювати *in vitro*, для чого використовували заморожену сперму бугая. Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) у середовищі Sperm-TALP за методикою J. J. Parrish et al. [20]. Спільне інкубування яйцеклітин і сперматозоїдів проводили в термостаті за температури +38,5 °C, з вмістом 5% CO₂ в повітрі в краплях середовища Fert.-TALP упро-

довж 12–18 год. Далі яйцеклітини та зиготи відмивали від прилиплої сперми і переносили в краплі середовища CDM для подальшого культивування поза організмом. Запліднені *in vitro* цитогенетичні препарати гамет та отримані зародки готували за методом М. Ushijima et al. [21], забарвлювали 2%-м розчином Giemsa та досліджували під мікроскопом.

У дослідженнях яєчники доставляли в лабораторію: групу А – упродовж 2 год, групу Б – 4 год, групу В – 6 год, групу Г – 8 год. Встановлено вплив терміну початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів на подальший розвиток гамет самиць в умовах *in vitro* (табл. 2.1).

Таблиця 2.1. Аналіз розвитку ооцитів корів *in vitro* за різних часових параметрів початку їх активації

Варіант дослідження	Термін зберігання, год	Кількість прокультивованих клітин	Кількість клітин					
			на М II мейозу		на інших стадіях мейозу		з дегенерованим хроматином	
			п	%	п	%	п	%
А	2	81	67	82,7 ^a ± 4,2	4	4,9 ± 2,4	10	12,4 ^c ± 3,7
Б	4	89	67	75,3 ^{ad} ± 4,6	9	10,1 ± 3,2	13	14,6 ^{ch} ± 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

Примітки. 1. Термін культивування становив 24 год. 2. b : d; f : h; f : g – P < 0,05; a : b; e : f – P < 0,01; a : c; e : g – P < 0,001.

Установлено, що збільшення терміну початку активізації *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 М II мейозу. Показник кількості гамет з дегенерованим хроматином у цих експериментальних групах збільшувався, відповідно, від 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 IVP є однією із ключових проблем країн з великою територією та/або в умовах з обмеженими ресурсами, де місце забою тварин віддалене від лабораторії. Транспортування яєчників на великі відстані негативно впливає на біологічний потенціал ооцитів з погляду ядерного дозрівання та розвитку після IVM та IVF. 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 факторами, що впливають на життєздатність фолікулів і ооцитів, а також на їхню біологічну повноцінність. Отже, численні дослідження щодо покращення та збереження біологічної повноцінності ооцитів шляхом модифікації умов під час транспортування показали, що доставляння 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. 3.1).

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

Таблиця 3.1. Ефективність одержання ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* за застосування різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів

Варіант досліджу	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	
		п	%	п	%	п	%	п	%	п	%
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 ^{lm} ± ± 3,0
В	70	22	31,4 ^{ab} ± ± 5,5	18	25,7 ^{ce} ± ± 5,2	12	17,1 ^{fh} ± ± 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

Примітки. 1. Термін зберігання, год: А–2, Б–4, В–6, Г–8. 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 ООК корів за різних часових параметрів початку їх активації встановлено різний рівень формування *in vitro* ембріонів (рис. 3.1, 3.2).

Біологічну повноцінність дозрівання поза організмом ооцитів корів, що були отримані з яєчників за різних часових параметрів початку їх активації, перевіряли, запліднюючи їх *in vitro*. В разі початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів через 2 год (варіант А) та наступного 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* їх дозрівання через 4 год (варіант Б) встановлено, що показник кількості *in vitro* отриманих зародків дорівнює 42,7%.

З'ясовано, що після культивування ооцит-кумулюсних комплексів та наступного запліднення поза організмом яйцеклітин у разі

початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів 6 год отримано 31,4% (варіант В) зародків в умовах *in vitro*.

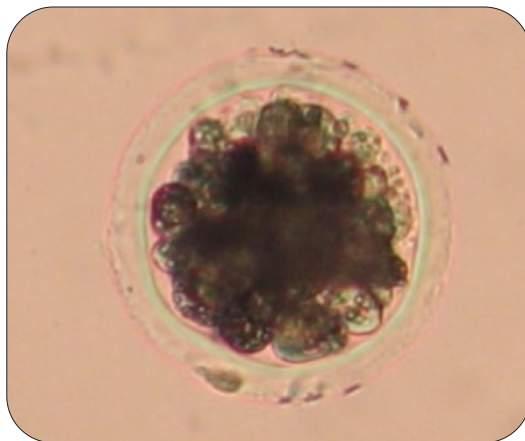


Рис. 3.1. Сформований *in vitro* ембріон ВРХ на стадії морули.
Збільшення 56× (об. 4×, ок. 14×)

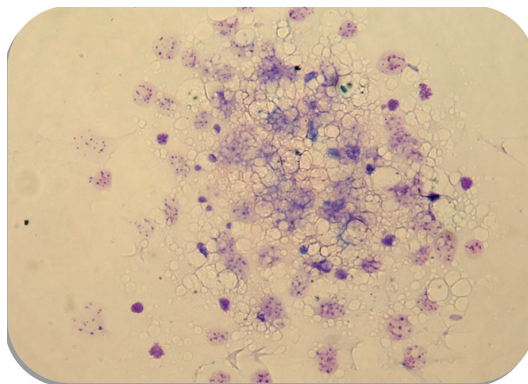


Рис. 3.2. Цитогенетичний препарат отриманої *in vitro* бластоцисти
(n = 65). Збільшення 1000× (об. 100×, ок. 10×)

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

Дослідження кількості ембріонів на відповідній стадії розвитку від загальної кількості ембріонів (коефіцієнт дроблення) (рис. 3.3) показало, 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%.

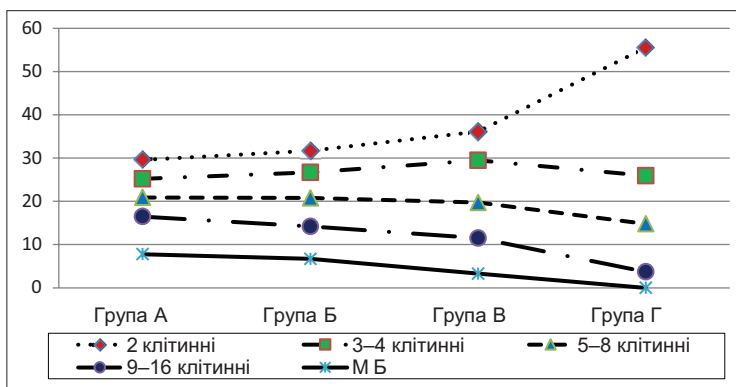


Рис. 3.3. Коефіцієнт дроблення *in vitro* ембріонів за різних часових параметрів початку активізації *in vitro* дозрівання ооцитів корів

Через 48 год 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 призвело до зменшення коефіцієнта дроблення в дослідній групі Г (14,8%), який був майже однаковий у 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 коефіцієнта дроблення від 16,5 до 3,7% відповідно у дослідних групах А–Г. Через 120 год культивування ембріонів у дослідних групах А–Г коефіцієнти дроблення були різними: від 7,8 до 0,0% відповідно.

Крім коефіцієнта дроблення зародків, після запліднення *in vitro* не меншу інформативність має й індекс дроблення ембріонів (спів-

відношення 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 активації *in vitro* дозрівання ооцитів (рис. 3.4), встановили значні коливання індексу дроблення.

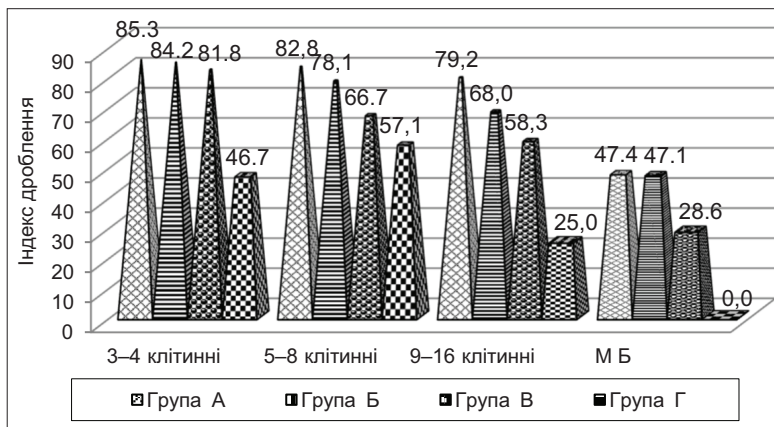


Рис. 3.4. Індекс дроблення *in vitro* ембріонів за різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів корів

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 активації *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 його збільшення в групі Г до 57,1%. Найбільше зменшення індексу дроблення 9-16-клітинних ембріонів зафіксовано в групі Г (25,0%). Через 120 год культивування ембріонів спостерігали зменшення індексу дроблення в групі В до 28,6% та 0,0% у дослідній групі Г.

Таким чином, за результатами експериментальних досліджень встановлено, що ефективність одержання ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* за застосування різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів є різною. Порівняльний ана-

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

ліз різних часових параметрів початку активації *in vitro* дозрівання ооцитів дав змогу встановити вірогідну різницю між групами за таких показників, як дозрівання до М II мейозу та кількість 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 М II мейозу. Слід зазначити, 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. Досліджено, що 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 від 2 до 8 год та подальшого культивування зменшується кількість гамет, отриманих на М II мейозу, на 33,9% і збільшується кількість клітин з дегенерованим хроматином на 31,6%.

4. У процесі дослідження з'ясовано, що в разі подовження терміну початку активації дозрівання *in vitro* ооцитів корів від 2 до 8 год відбувається зменшення кількості сформованих *in vitro* ембріонів на пізніх стадіях розвитку (11,1 та 0% відповідно).

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

Список рекомендованої літератури

1. *Martín-Maestro A., Sánchez-Ajofrín I., Maside C. et al.* 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. et al.* Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Science*. 2011. Vol. 124 (1–2). P. 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.01.015>
3. *Bohlooli Sh., Bozogļlu 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. et al.* 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. URL: <https://hdl.handle.net/11468/20743>
5. *Matsukawa K., Akagi S., Adachi N. et al.* 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. et al.* 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. No. 5. P. 289–294(6).
<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. No. 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. <https://doi.org/10.4236/arsci.2014.23007>

10. Wongsrikeao P., Otoi T., Karja N. W. K. et al. 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. <https://doi.org/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. et al. 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. et al. 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. et al. 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. No. 2. P. 160–164. <https://doi.org/10.1262/jrd.2021-084>

15. Evecen M., Demir K., Arıcı R. et al. 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. <https://doi.org/10.1530/10.9775/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. <https://doi.org/10.1530/RAF-23-0071>

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-кумулясних 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. No. 9. P. 37–38.

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

ТРОЦЬКИЙ Петро Анатолійович

TROTSKYI Petro

ЩЕРБАК Оксана Василівна

SHCHERBAK Oksana

КОВТУН Світлана Іванівна

KOVTUN Svitlana

ОПТИМІЗАЦІЯ умов транспортування життєздатних яєчників сільськогосподарських ТВАРИН

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Редактор і коректор *В. Г. Шевельова*

Комп'ютерна верстка *Л. А. Гордієнко*

Дизайн обкладинки *І. Г. Хорошого*

Підписано до друку 20.07.2026 р. Формат 60×84/16.

Папір офс. Гарнітура «Таймс».

Ум. друк. арк. 2,55.

Наклад 100 пр.

Державне видавництво «Аграрна наука» НААН

Свідоцтво про державну реєстрацію № 4116 від 21.07.2011 р.

вул. Васильківська, 37, м. Київ, 03022

Тел. +38 (044) 257-85-27

e-mail: agrarnanauka@ukr.net

Віддруковано у друкарні видавця ФОП Марченко Т.В.

*Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до Державного реєстру видавців, виготовлювачів
і розповсюджувачів видавничої продукції:*

серія ДК № 6784 від 30.05.2019 р.

вул. Перфецького, 11 А, м. Львів, 79053

Тел. +38 (050) 370-19-57

e-mail: magnol06@ukr.net, <https://magnolia.lviv.ua>