

## **ВИКОРИСТАННЯ РІЗНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ КОРІВ**

**П. А. Троцький**  
trotskiy\_pa@ukr.net

Інститут розведення і генетики тварин імені М. В.Зубця  
Національної академії аграрних наук України,  
вул. Погребняка, 1, с.Чубинське, Бориспільський р-н.,  
Київська обл., 08321, Україна

*Для подальшого забезпечення інтенсифікації і підвищення економічної ефективності збереження генофонду порід у вигляді спермобанку, ембріобанку та кріобанку ооцитів необхідно шукати нові шляхи для використання генетичного потенціалу тварин після їх вибракування. Однією з умов функціонування виживання заморожених гамет є здатність плазматичних мембран протистояти змінам у клітині в процесі заморожування-розморожування. В свою чергу зміни, що відбуваються в клітині під час заморожування, спричиняють суттєві фізіолого-біохімічні зміни, які призводять до загибелі. Ця обставина особливо актуальна при удосконаленні біотехноло-гічних методів кріоконсервування гамет тварин. Метою роботи було вивчити вплив різних біологічно активних речовин у еквілібраційному розчині при кріоконсервуванні ооцит-кумулюсних комплексів на життєздатність деконсервованих ооцитів корів. Наведено результати експериментальних досліджень з вивчення впливу різних біологічно активних речовин у еквілібраційному розчині при кріоконсервуванні ооцит-кумулюсних комплексів на життєздатність деконсервованих ооцитів корів. При проведенні досліджень були використані біотехнологічні, кріобіологічні, морфологічні та цитогенетичні методи, а також методи статистичної обробки даних. Встановлено, що застосування сироватки крові корів у еквілібраційному розчині при кріоконсервуванні ооцит-кумулюсних комплексів корів дозволяє отримувати 63,2% гамет на метафазі-2 мейозу. Вивчення життєздатності деконсервованих гамет поза організмом показало, що використання фетальної сироватки корів,*

унітіолу, ацетилхоліну у еквілібраційному розчині для заморожування ооцит-кумуляусних комплексів корів по різному впливає на кріорезистентні властивості гамет. Введення в еквілібраційний розчин фетальної сироватки корів підвищує кріорезистентність ооцитів корів до дії низьких температур, що призводить до збільшення на 23,0% показника дозрілих поза організмом деконсервованих гамет до метафази-2 мейозу.

**Ключові слова:** кріоконсервування, ооцит-кумуляусні комплекси, кріопротектори, вітрифікаційний розчин, дозрівання *in vitro*.

## **THE USE of DIFFERENT BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES in the CRYOPRESERVATION of OOCYT-CUMULUS COMPLEXES of COWS**

**P. A. Ttrotskiy**  
trotskiy\_pa@ukr.net

Institute of animal breeding and genetics named after M. V. Zubets  
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine  
Pogrebnyak Street, 1, Chubinske, Boryspil district, Kyiv region,  
08321, Ukraine

*To further ensure intensify and improve the economic efficiency of the preservation of the gene pool of a species in spermobanku, embriobanku and cryobank oocytes must seek new ways to use the genetic potential of animals after culling. One of the conditions functional survivals of the frozen gametes is the ability to resist changes in the plasma membranes of the cell in the process of frozen and thawed. In turn, changes in the cell during freezing are the cause significant physiological and biochemical changes that lead to death. This is particularly relevant for the improvement of the biotechnological methods of cryopreservation of gametes animals. The aim was to study the effect of various bioactive substances in solution at equilibration cryopreservation of oocyte-cumulus complexes in viability of frozen-thawed oocyte of cows. The results of experimental studies on the impact of various biologically active substances in solution at equilibration cryopreservation of oocyte-cumulus complexes in oocyte viability frozen-thawed cows. In conducting the research were used biotechnology, cryo biological, morphological and cytogenetic techniques and methods of statistical data. It was established that the use of serum of cows in equilibrationsolution cryo-*

*preservation at oocyte-cumulus complexes cows can receive 63.2% of gametes in metaphase-2 meiosis. Study frozen-thawed gamete viability outside the body showed that the use of fetal serum cows' unitiola, acetylcholine in equilibration solution for freezing oocyte-cumulus complexes cows differently affects the properties krio resistant gametes. Introduction to equilibration solution fetal cow serum increases cryo resistant cow oocytes to low temperatures, which leads to an increase of 23,0% rate outside the body frozen-thawed mature gametes to metaphase-2 of meiosis.*

**Keywords:** cryopreservation, oocyte-cumulus complex, cryoprotectant, vitrification solution, maturation In Vitro.

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ КОРОВ**

**П. А. Троцкий**  
trotskiy\_pa@ukr.net

Институт разведения и генетики животных имени М. В.Зубця  
Национальной академии аграрных наук Украины  
ул. Погребняка, 1, с. Чубинское, Бориспольский р-н, Киевская обл.,  
08321, Украина

*Для дальнейшего обеспечения интенсификации и повышения экономической эффективности сохранения генофонда пород в виде спермобанка, эмбриобанка и криобанка ооцитов необходимо искать новые пути для использования генетического потенциала животных после их выбраковки. Одним из условий функционального выживания замороженных гамет является способность плазматических мембран противостоять изменениям в клетке в процессе замораживания-размораживания. В свою очередь изменения, происходящие в клетке во время замораживания, вызывают существенные физиолого-биохимические изменения, которые приводят к гибели. Это обстоятельство особенно актуально при совершенствовании биотехнологических методов криоконсервирования гамет животных. Целью работы было изучить влияние различных биологически активных веществ в эквilibрационном растворе при криоконсервировании ооцит-кумулюсных*

комплексов на жизнеспособность деконсервированных ооцитов коров. Приведены результаты экспериментальных исследований по изучению влияния различных биологически активных веществ в эквilibрационном растворе при криоконсервировании ооцит-кумулюсных комплексов на жизнеспособность деконсервированных ооцитов коров. При проведении исследований были использованы биотехнологические, криобиологические, морфологические и цитогенетические методы, а также методы статистической обработки данных. Установлено, что применение сыворотки крови коров в эквilibрационном растворе при криоконсервировании ооцит-кумулюсных комплексов коров позволяет получать 63,2% гамет на метафазе-2 мейоза. Изучение жизнеспособности деконсервированных гамет вне организма показало, что использование фетальной сыворотки коров, унитиола, ацетилхолина в эквilibрационном растворе для замораживания ооцит-кумулюсных комплексов коров по-разному влияет на криорезистентные свойства гамет. Введение в эквilibрационный раствор фетальной сыворотки коров повышает криорезистентность ооцитов коров к действию низких температур, что приводит к увеличению на 23,0% показателя созревших вне организма деконсервированных гамет до метафазы-2 мейоза.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, ооцит-кумулюсные комплексы, криопротекторы, витрификационный раствор, созревание In Vitro.

Метод криоконсервирования яйцеклеток и эмбрионов широко используется в современных биотехнологиях воспроизводства сельскохозяйственных животных. Новым подходом в методике криоконсервирования гамет сельскохозяйственных животных является их надшвидке замораживание (витрификация) в жидком азоте в растворах с высокими концентрациями проникающих криопротекторов. Большое значение для успеха витрификации имеет выбор состава витрификационного раствора, методов эквilibрации клеток, их замораживания и оттаивания, процедуры размораживания клеток от витрификационного раствора и т.д. [1, 2]. Кроме того, на эмбрионах великой рогатой скотины доведено положительное влияние предварительной (перед витрификацией) обработки различными биологически активными веществами и цитоскелетными стабилизаторами на их жизнеспособность после размораживания. Оптимальные условия витрификации ооцитов и эмбрионов также зависят от стадии развития эмбрионов, стадии мейотического развития ооцитов и видов животных, потому что характеристики гамет и зародков (за размером, формой, свойствами

мембран і чутливістю до токсичності кріопротекторів) мають значні відмінності [3, 4, 5].

В пошуках способів зменшення кріопшкодження ооцит-кумулюсних комплексів корів використовуються різні методичні прийоми, які безпосередньо впливають на кріорезистентність гамет, зокрема враховуються швидкість заморожування, склад кріозахисного середовища, стадії мейотичного дозрівання ооцитів тощо. Дослідження проблеми кріопшкодження і кріозахисту репродуктивних клітин та ембріонів нині спрямовані на спрощення відповідної техніки, скорочення часу заморожування й розморожування біооб'єктів [6, 7, 8].

Метою роботи було вивчити вплив різних біологічно активних речовин у еквілібраційному розчині при кріоконсервуванні ооцит-кумулюсних комплексів на життєздатність деконсервованих ооцитів корів.

**Матеріал і методика досліджень.** Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулюсні комплекси корів чорно-рябї породи. Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко, вилувлювали пастерівською піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками. Для заморожування використовували ооцити з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом.

Перед заморожуванням гамети корів обробляли еквілібраційним розчином, а потім перенесли у вітрифікаційний розчин. Всі еквілібраційні (10% гліцерин + 20% пропандіол) та вітрифікаційні (25% гліцерин + 25% пропандіол) розчини для кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів корів були приготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20% фетальної сироватки корів,  $1 \times 10^{-4}$  Мунітіолу,  $1 \times 10^{-6}$  М ацетилхоліну та без додавання біологічно активних речовин.

Після розморожування гамет виведення кріопротекторів з них проводили шляхом перенесення їх на 10 хвилин у розчин 1,0 М сахарози. Ооцит-кумулюсні комплекси корів культивували протягом 27 годин при температурі 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub> у повітрі, в краплях середовища 199 з 10% попередньо інактивованою сироваткою корів, 2,5 мкг/мл ФСГ, 1,0 мкг/мл естрадіолу, 2,5 МОд/мл лютеїнізуючого гормону, 2,0 мМ натріяпірувату, 2,92 мМ кальція лактату, 40 мкг/мл гентаміцину.

Гамети корів після культивування поза організмом підлягали цитогенетичному аналізу. Цитогенетичні препарати готували за методом Tarkowski A.K. [8].

**Результати досліджень.** Проведено дослідження з додавання деяких біологічно активних речовин (фетальної сироватки корів – варіант А, унітіолу – варіант Б, ацетилхоліну – варіант В, без додавання біологічно активної речовини – варіант Г, в контрольній групі (К) клітини не заморожували) у еквілібраційний розчин при заморожуванні ооцит-кумулюсних комплексів корів.

За результатами експериментальних досліджень, дані наведені в таблиці 1, встановлено, що введення до еквілібраційного розчину вищенаведених компонентів для заморожування ооцит-кумулюсних комплексів корів підвищує їх кріорезистентність, про що свідчить збільшення на 7,5–23,0% показника дозрівання поза організмом де-консервованих гамет до метафази-2 мейозу після 27 годинного культивування та зменшення на 3,5–15,3% показника кількості ооцитів з хромосомними порушеннями.

**Таблиця 1. Застосування біологічно активних речовин у еквілібраційному розчині при заморожуванні ооцит-кумулюсних комплексів корів**

Варіанти дослідів	Кількість заморожених клітин	Кількість клітин придатних для культивування після розморожування		Кількість клітин:					
				на метафази-2		на інших стадіях мейозу		з хромосомними порушеннями	
				п	%	п	%	п	%
А	121	114	94,2 ±2,1	72	63,2 <sup>c</sup> ±4,5	16	14,0 ±3,3	26	22,8 <sup>e</sup> ±3,9
Б	115	109	94,8 ±2,1	63	57,8 <sup>bc</sup> ±4,7	18	16,5 ±3,6	28	25,7 <sup>eh</sup> ±4,2
В	136	130	95,6 ±1,8	62	47,7 <sup>ab</sup> ±4,4	23	17,7 ±3,3	45	34,6 <sup>hf</sup> ±4,2
Г	107	97	90,7 ±2,8	39	40,2 <sup>a</sup> ±4,9	21	21,7 ±4,2	37	38,1 <sup>hg</sup> ±4,9
К	95	--	--	75	79,0 <sup>d</sup> ±4,2	9	9,5 ±3,0	11	11,5 <sup>i</sup> ±3,3

(різні суперскрипти вказують на вірогідну різницю між показниками)  
 b : c ; e : f ; e : i – P < 0,05; a : b ; e : g ; h : i – P < 0, 01; a : c ; a : d ; c : d ;  
 b : d ; f : i ; g : i – P < 0,001

Таким чином, аналіз результатів експериментальних досліджень свідчить про різну ефективність використання фетальної сироватки корів, унітіолу, ацетилхоліну у еквілібраційному розчині для заморожування ооцит-кумулюсних комплексів корів виявив різну ефективність їх використання. Не встановлена перевага використання цих біологічно активних речовин у вітрифікаційному розчині для кріоконсервування гамет корів за таких показників, як дозрівання поза організмом деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів до метафази-2 мейозу.

**Висновки.** Введення до еквілібраційного розчину фетальної сироватки корів підвищує кріорезистентність ооцитів корів до дії низьких температур, що призводить до збільшення на 23,0% показника дозрілих поза організмом деконсервованих гамет до метафази-2 мейозу.

### Список використаної літератури

1. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue / E.J. Woods, J.D. Benson, Y. Agca, J.K. Crister // *Cryobiology*. - 2004.- Vol.48.- P.146-156.
2. Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos / A. Arav // *The rtiogenology*. – 2014. – Vol.81. – І.1. – P.96–102.
3. Галицька Т. В. Особливості вивчення кріорезистентних властивостей ооцит-кумулюсних комплексів свинок різних порід / Т. В. Галицька, П. А. Троцький // *Науково-технічний бюлетень*. – Львів, 2011. – Вип. 12. – №. 1, 2. – С. 228-332.
4. Implications of storage and handling conditions on glass transition and potential devitrification of oocytes and embryos / M. Sansinena, M.V. Santos, G. Taminelli, N. Zaritky // *Theriogenology*. – 2014. –Vol.82. – І.3. – P. 373–378.
5. First pregnancy and live birth from vitrified rabbit oocytes after intra-oviductal transfer and in vivo fertilization / E. Jiménez-Trigos, J.S. Vicente, F. Marco-Jiménez // *Theriogenology*. – 2014. –Vol.82. – І.4. – P. 599–604.
6. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures/ Gardner D.K., Sheehan C.B., Rienzi L. [et al.]// *Theriogenology*.- 2007.- Vol.67, І.1.- P.64-72.
7. Survival of vitrified in vitro–produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotect and ilution procedure / J.N. Caamaño, E. Gómez, B. Trigal, [et al.]// *Theriogenology*. – 2015. –Vol.83. – І.5. – P. 881–890.
8. Tarkowski A.K. An air drying method for chromosoma preparation from mouse eggs // *Cytogenetics*.- 1966.- V.5.- P. 394-400.