

ВПЛИВ ДВОЕТАПНОЇ ВІТРИФІКАЦІЇ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КОРОВ'ЯЧИХ ЕМБРІОНІВ, ОТРИМАНИХ РІЗНИМИ СПОСОБАМИ

Люта І. М., асистент,
Миколаївський національний аграрний університет,
e-mail: liutaim@mnaeu.edu.ua

Анотація. У тезах викладено результати досліджень впливу двоетапної вітрифікації на виживаність ембріонів великої рогатої худоби української червоно-рябої молочної породи, отриманих методами *in vitro* та *in vivo*. В ході досліджень встановлено, що розвиток ембріонів великої рогатої худоби, отриманих шляхом *in vivo*, після двоетапної вітрифікації був кращим, ніж розвиток ембріонів корів, отриманих поза організмом (32,6% - 28/86 проти 6,9% - 5/72, $p < 0,001$). Встановлено, що стадії експандованої бластоцисти, що вийшла із зони пелюциду, досягли 20,9% (33/158) усіх розморожених ембріонів після їх двоетапної вітрифікації, отриманих обома методами, стадії бластоцисти, що виходить із зони пелюциду – 32,3% (51/158).

Ключові слова: кріоконсервація, вітрифікація, розморожування, ембріони великої рогатої худоби, якість ембріонів, виживаність.

Кріоконсервування ембріонів відкриває значні можливості для використання методу трансплантації ембріонів і його широкого впровадження у племінному тваринництві. Довготривале зберігання ембріонів дозволяє вирішити ряд теоретичних і практичних питань, зокрема, перевірку корів-донорів за якістю нащадків; збереження рідкісних порід і тих, що зникають; різних гібридних ліній, мутацій і особливо комбінацій, які можуть служити цінним матеріалом для генетичних досліджень, а також здійснити імпорт та експорт ембріонів [2,6].

Хоча в кріоконсервуванні ембріонів досягнуто великого прогресу, залишається проблема виживаності ембріонів, підданих заморожуванню. Актуальними залишаються й питання, пов'язані з забезпеченням стабільності результатів заморожування, пошук нових, менш токсичних і ефективніших кріоконсервантів, спрощення методів кріо- і деконсервування [1, 4].

Велике значення для успіху вітрифікації має вибір складу вітрифікаційного розчину, методів еквілібрації клітин, швидкість їх заморожування і розморожування, процедури відмивання ембріонів від вітрифікаційного розчину [9]. Зокрема, для здійснення вітрифікації розчину в рідкому азоті і запобігання його кристалізації при заморожуванні необхідна наявність високих концентрацій кріопротекторів, досить високою повинна бути швидкість заморожування і розморожування вітрифікаційного розчину [5, 7]. Проте, головною проблемою вітрифікації є те, що високі концентрації кріопротекторів можуть викликати осмотичний шок та здійснити токсичний вплив на біоб'єкт [3].

За останні десятиліття було запропоновано кілька методів кріоконсервації ембріонів великої рогатої худоби, проте жодна стандартизована процедура не дала значного успіху. Відсоток виживання кріоконсервованих ембріонів корів, отриманих *in vitro*, наразі залишається недостатньо високим [8].

Метою даної роботи було дослідити вплив методу вітрифікації на рівень виживання та здатності до розвитку ембріонів, отриманих в умовах *in vitro* та *in vivo* від корів української червоно-рябої молочної породи великої рогатої худоби.

Дослідження базувалося на гіпотезі виживаності ембріонів за рахунок ефективності кріоконсервації, покращеної за рахунок методу двоетапної вітрифікації.

Ембріони для цього дослідження були отримані двома способами (*in vitro* та *in vivo*) від корів української червоно-рябої молочної породи.

Для отримання ембріонів *in vitro* ооцити вилучали з яєчників корів, забитих на бійнях. Для запліднення *in vitro* (день 0) використовувалися лише перевірені дози сперми. Інкубація тривала 20-22 години.

Для отримання ембріонів *in vivo* були використанні корови, синхронізовані за статевим циклом. Ембріони, придатні для кріоконсервації, заморожували двоетапним методом.

Для вітрифікації використовували комбінацію двох кріопротекторів: диметилсульфоксиду (ДМСО) та етиленгліколю (EG) у розчині MOPS (модифікований насичений буфер, фосфат калію) для двоетапної кріоконсервації.

Ембріони, отримані в умовах *in vitro*, вітрифіковані на стадії ранньої бластоцисти, були гіршими порівняно з ембріонами, отриманими в умовах *in vivo*, за показниками виживання та розвитку ембріонів до стадії експандованої бластоцисти: 35,7% (5/14) проти 87,5% (14/16) та 14,3% (2/14) проти 50,0% (8/16) відповідно.

Результати аналізу стадії розвитку ембріонів, отриманих різними методами (*in vitro* та *in vivo*) свідчать про те, що розвиток ембріонів великої рогатої худоби, отриманих *in vivo*, після двоетапної вітрифікації був кращим, ніж розвиток ембріонів корів, отриманих поза організмом (32,6% – 28/86 проти 6,9% – 5/72, $p < 0,001$).

Порівнюючи рівень якості досліджуваних ембріонів великої рогатої худоби, які було отримано різними методами, було встановлено, що ембріони, які отримали *in vivo* після їх вітрифікації мали вищий показник розвинених ембріонів до стадії експандованої бластоцисти, що вийшла із зони пелюциду (32,6% – 28/86 проти 6,9% – 5/72). Також кількість розвинених ембріонів до стадії бластоцисти, що виходить із зони пелюциду, отриманих цим методом, перевищувала даний показник у ембріонів, отриманих поза організмом (50,0% – 43/86 проти 11,1% – 8/72).

Загалом під час проведення дослідження встановлено, що стадії експандованої бластоцисти, що вийшла із зони пелюциду, досягли 20,9% (33/158) усіх розморожених ембріонів після їх двоетапної вітрифікації, отриманих обома методами, стадії бластоцисти, що виходить із зони пелюциду – 32,3% (51/158).

Зупинка розвитку ембріонів на різних етапах дроблення могла бути зумовлена наявністю дегенерованих бластомерів, порушеним зв'язком між ними, їх ущільненням та зморщенням.

Важливу роль під час заморожування відіграє розмір групи біологічного об'єкту. Чим менша вибірка, тим вищий шанс ембріонів вижити в процесі кріоконсервації. Загалом ооцити, зиготи та ранні стадії ембріонів набагато чутливіші до дії низьких температур, ніж бластоцисти та розширені бластоцисти. У розширених бластоцист по мірі збільшення їх розміру зменшуються шанси на виживання після кріоконсервації.

Список використаних джерел:

1. Дешко А. С. Кріоконсервация эмбрионов крупного рогатого скота, полученных в культуре in vitro. Зоотехния, Гродно. 2013. С. 51-58.
2. Люта І. М. Ембріологічна характеристика результатів трансплантації ембріонів великої рогатої худоби. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2016. Вип. 2 (90). Ч. 2. С. 16-22.
3. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія: навчальний посібник : за ред. М. І. Гиль. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.
4. Arav, A., et al., A new, simple, automatic vitrification device: preliminary results with murine and bovine oocytes and embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2018. 35 (7): p. 1161-1168.
5. Best, B.P., Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation research*, 2015. 18 (5): p. 422-436.
6. Lyuta, I., Kovtun, S., Cherbak, O., Peredrii, N., & Lyzohub, O. (2021). Results of research on group formation donor cows and embryos transplantation. *Zhivotnov'dni Nauki/Bulgarian Journal of Animal Husbandry*, 58(1), 49-55.
7. Mandawala, A., et al., Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*, 2016. 86 (7): p. 1637-1644.
8. Masashige Kuwayama. Evidence-based Embryo Cryopreservation. *Journal of Mammalian Ova Research*. 2005. 22 (1). P. 28-32.
9. Pereira RM, Marques CC 2008: Animal oocytes and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank* 9: P. 267-277.

Annotation. The theses present the results of studies of the effect of two-stage vitrification on the survival of embryos of cattle of the Ukrainian red-speckled dairy breed obtained by in vitro and in vivo methods.

In the course of research, it was established that the development of cattle embryos obtained in vivo after two-stage vitrification was better than the development of cow embryos obtained outside the body (32.6% - 28/86 versus 6.9% - 5/72, $p < 0.001$).

It was established that the expanded blastocyst stage, emerging from the zona pellucida, reached 20.9% (33/158) of all thawed embryos after their two-stage vitrification obtained by both methods, the blastocyst stage emerging from the zona pellucida reached 32.3% (51 /158).

Key words: cryopreservation, vitrification, thawing, bovine embryos, embryo quality, survival.