

УДК 636.92:57.089.3:620.3

БІОТЕХНОЛОГІЧНА МОДЕЛЬ ОДЕРЖАННЯ ЗАРОДКІВ КРОЛІВ IN VITRO З ВИКОРИСТАННЯМ НАНОМАТЕРІАЛУ

О. В. Щербак, С. І. Ковтун, А. Б. Зюзюн, О. С. Осипчук
osipchuksasha@gmail.com

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

Розроблено та застосовано біотехнологічну модель одержання ембріонів кролів in vitro з використанням наноматеріалу для удосконалення технології репродукції сільськогосподарських тварин. Показано позитивний вплив наноматеріалу на основі високодисперсного кремнезему (ВДК) та іммобілізованого на його поверхні D-галактозаміну на мейотичне дозрівання ооцитів кролів в умовах in vitro. Встановлено, що рівень дозрівання ооцитів in vitro за таких умов становить 87,1 %. Для дослідження повноцінності дозрівання in vitro ооцитів проведено їх осіменіння епідидимальними сперматозоїдами кроля (вилучені із хвостової частини придатка сім'яника). Рівень дроблення ембріонів сягав 52,1 %. Встановлено, що через 120 годин культивування до стадії ранньої морули розвинулось 17,0 % ембріонів. Для додаткової оцінки in vitro біологічної активності 0,001 % концентрації ВДК/D-галактозаміну було застосовано епідидимальні сперматозоїди кроля. Показано, що після перебування сперматозоїдів у середовищі з додаванням 0,001 % концентрації ВДК/D-галактозаміну упродовж 15 хвилин відбулося зниження рухливості гамет на 5,0 % з збереженням такого рівня упродовж трьох годин. Загальний час виживаності сперматозоїдів без додавання наноматеріалу сягав дев'яти годин, а з ним — не перевищував восьми годин. Додавання ВДК/D-галактозаміну до середовища до концентрації 0,001 % спричиняло швидке насичення рецепторів клітинної поверхні сперматозоїдів цим наноматеріалом, що в свою чергу призвело до зниження їх рухливості до 35 %. Але на такому рівні рухливість сперматозоїдів зберігалась довше, порівняно з контролем, що особливо важливо для підвищення рівня запліднення яйцеклітин in vitro. Встановлено перспективність проведення подальших біотехнологічних досліджень з використанням наноматеріалів на основі ВДК та біомолекул у системі збереження та раціонального використання генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин.

Ключові слова: КРОЛІ, ООЦИТ-КУМУЛЮСНІ КОМПЛЕКСИ, НАНОМАТЕРІАЛ, ВИСОКОДИСПЕРСНИЙ КРЕМНЕЗЕМ, D-ГАЛАКТОЗАМІН, МОРФОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ, ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ, ЕПІДИДИМАЛЬНІ СПЕРМАТОЗОЇДИ, ЕМБРІОНИ, ЗАПЛІДНЕННЯ IN VITRO

BIOTECHNOLOGY MODEL RECEIVING RABBITS EMBRYOS IN VITRO WITH USING NANOMATERIALS

O. Shcherbak, S. Kovtun, A. Zyuzyun, A. Osypchuk
osipchuksasha@gmail.com

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M. V. Zubets of NAAS, Pogrebnjaka str.,
1, v. Chubinsky, Boryspil District, Kyiv Region, 08321, Ukraine

Developed and applied biotechmodel receiving rabbit's embryos in vitro with using nanobiomaterials for improvement of reproduction system in farm animals. Showed positive impact using nanomaterial on the basis of ultrafine silica (UFS, aero-sil) on the surface immobilized D- galactosamine on meiotic maturation of oocytes rabbits in vitro. Level of maturation oocytes in vitro under these conditions is 87.1 %. To investigate the usefulness in vitro maturation of oocytes insemination their rabbit epididymal spermatozoa (removed from the tail (epididymis) appendage of the testis). The level fragmentation embryos reached 52.1 %. After 120 hours cultivation to early morula stage evolved 17.0 % embryos. For further evaluation of in vitro biological activity of 0.001 % ing concentration UFS/D-galactosamin we used freshly

rabbit epididymal spermatozoa. It is shown that after exposure of spermatozoa in the medium with the addition of 0.001 % concentration UFS/D-galactosamine over 15 minutes decreased activity gametes by 5.0 % while preserving that level for three hours. The overall survival time of spermatozoa without adding nanomaterial reached nine hours, and with it — does not exceed eight hours. Addition UFS/D-galactosamine in medium to a concentration of 0.001 % caused a rapid saturation of cell receptors spermatozoa these nanomaterial, which in turn led to a decrease in their activity to 35 %. But this level of activity of sperm preserved longer compared to the control, which is important for improving fertilization in vitro. Established prospects for further biotechnological research with using nanomaterials based UFS and biomolecules in the system preservation and rational use genetic resources farm animals.

Keywords: RABBITS, OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES, NANOMATERIALS, ULTRAFINE SILICA, D-GALACTOSAMINE, MORPHOLOGICAL ANALYSIS, CYTOGENETIC ANALYSIS, EPIDIDYMAL SPERMATOZOA, EMBRYOS, *IN VITRO* FERTILIZATION

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ПОЛУЧЕНИЯ ЗАРОДЫШЕЙ КРОЛИКОВ *IN VITRO* С ПРИМЕНЕНИЕМ НАНОМАТЕРИАЛА

О. В. Щербак, С. І. Ковтун, А. Б. Зюзюн, О. С. Осипчук
osipchuksasha@gmail.com

Институт разведения и генетики животных имени М. В. Зубца НААН, ул. Погребняка, 1, с. Чубинское, 08321, Бориспольский р-н, Киевская обл., Украина

Разработана и применена биотехнологическая модель получения эмбрионов кроликов in vitro с использованием наноматериала для усовершенствования технологии репродукции сельскохозяйственных животных. Показано позитивное воздействие наноматериала на основе высокодисперсного кремнезёма (ВДК) и иммобилизованного на его поверхности D-галактозамина на мейотическое созревание ооцитов кроликов in vitro. Установлено, что уровень созревания ооцитов in vitro при таких условиях составляет 87,1 %. Для исследования полноценности созревания in vitro ооцитов осеменили их эпидидимальными сперматозоидами кроля (полученные из хвостовой части придатка семенника). Уровень дробления эмбрионов достиг 52,1 %. Установлено, что через 120 часов культивирования до стадии ранней морулы сформировалось 17 % эмбрионов. Для дополнительной оценки биологической активности 0,001 % концентрации ВДК/D-галактозамин in vitro мы использовали эпидидимальные сперматозоиды кроля. Показано, что после пребывания сперматозоидов в среде дополненной 0,001 % концентрацией ВДК/D-галактозамин в течении 15 минут произошло снижение активности гамет на 5 % с сохранением такого уровня на протяжении трёх часов. Общее время выживаемости сперматозоидов без добавления наноматериала достигало девяти часов, а с ним — не превысил восьми часов. Добавление ВДК/D-галактозамина к среде в концентрации 0,001 % инициировало быстрое насыщение рецепторов клеточной поверхности сперматозоидов этим наноматериалом. Такое взаимодействие в свою очередь привело к снижению подвижности сперматозоидов до 35 %. На таком уровне подвижность сперматозоидов сохранялась более длительное время, по сравнению с контролем, что особенно важно для увеличения уровня оплодотворения яйцеклеток in vitro. Определены перспективы проведения дальнейших биотехнологических исследований с использованием наноматериалов на основе ВДК и биомолекул в системе сохранения и рационального использования генетических ресурсов сельскохозяйственных животных.

Ключевые слова: КРОЛИКИ, ООЦИТ-КУМУЛУСНЫЕ КОМПЛЕКСЫ, НАНОМАТЕРИАЛ, ВИСОКОДИСПЕРСНЫЙ КРЕМНЕЗЁМ, D-ГАЛАКТОЗАМИН, МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, ЭПИДИДИМАЛЬНЫЕ СПЕРМАТОЗОИДЫ, ЭМБРИОНЫ, ОПЛОДОТВОРЕНИЕ *IN VITRO*

Сьогодні в Україні та світі селекційно-племінна робота спрямована на удосконалення вітчизняних порід сільськогосподарських тварин шляхом схрещування та отримання гібридного потомства [1]. Такий незворотній процес загрожує зникненням вихідних порід, які найчастіше є автохтонними. Збереження таких порід у вигляді невеликих популяцій *in situ* та *ex situ* призводить до наростання в них інбридингу та виникнення явища дрейфу генів [2].

У сучасних умовах пріоритетним завданням збереження біологічного різноманіття є підвищення ролі сільського господарства в підтримці біорізноманітності. Для реалізації головних завдань Програми наукових досліджень НААН №30 «Збереження генофонду сільськогосподарських тварин», Постанови №9 Бюро Президії НААН від 23.10.2013 р. щодо ефективного застосування генетичного тестування племінних тварин у дослідних господарствах мережі НААН як складової системи подальшого відбору та тиражування кращого матеріалу за використання біотехнологічних методів, продовжується удосконалення ембріотехнологічної системи репродукції сільськогосподарських тварин із використанням наноматеріалів [2, 3].

Незважаючи на розвиток сучасних біотехнологічних методів відтворення тварин існує необхідність удосконалення методичних підходів одержання ембріонів з високим біопотенціалом поза організмом. Розробка та застосування сучасних ембріотехнологічних підходів ефективної репродукції сільськогосподарських тварин із використанням нанобіоматеріалів є складовою системи реалізації зазначених завдань. Модернізація технології формування ембріонів поза організмом потребує стабілізації середовищ для культивування гамет та ембріонів сільськогосподарських тварин з метою забезпечення їх високої життєздатності [3, 4].

Потенціальними структурними одиницями культуральних середовищ є наноматеріали на основі високодисперсного кремнезему (ВДК). За умови збереження індивідуальних властивостей ВДК за консолідації з

біомолекулами можна створювати наноматеріали унікальної якості. Створені наноматеріали володіють високою біоактивністю є перспективними складовими середовищ для культивування *in vitro* гамет і ембріонів, тому здатні забезпечити підвищення ядерного дозрівання ооцитів та повноцінний ембріогенез [5, 6]. Прогрес у цьому напрямі потребує накопичення даних експериментальних досліджень процесів дозрівання, запліднення ооцитів і культивування ембріонів на різних стадіях розвитку *in vitro*, а також інформації про вплив різних факторів на їх розвиток [7].

У наших дослідженнях був застосований наноматеріал, основою якого є ВДК — сорбент широкого спектру дії. Поверхня ВДК організована таким чином, що може заміщати свої гідроксильні групи на різні похідні та біомолекули. Сам кремнезем входить до складу шкіри, хрящів, зв'язок (до 0,01 %), а також мукополісахаридів (дерматан- і гепарансульфатів, ~ 0,04 %), утворюючи ефірні зв'язки, які відіграють роль містків між ланцюгами. Оскільки вміст перехідних металів в організмах незначний, можна зробити припущення, що їх функція повинна бути зв'язана з каталізом. Окрім цього, перехідні метали можуть виконувати разом з біомолекулами іншу функцію — переносити електрони, групи атомів і цілі молекули, закріплювати молекули у певній орієнтації, повертати їх, поляризувати, тощо. Поверхня ВДК була модифікована аміновуглеводом D-галактозаміном (Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України). Спираючись на функціональні особливості аміновуглеводу (кінцевий агрегат, що з'єднується з рецепторами клітин) можна сподіватись на одержання наноматеріалу для удосконалення технології отримання ембріонів поза організмом [8].

На сучасному етапі розвитку біотехнологічні методи у тваринництві, дослідження з підходів до клонування, трансгенезу та одержання ембріональних стовбурових клітин проводяться переважно з використанням гамет модельних тварин. Для розробки та опрацювання

біотехнологічної моделі одержання ембріонів в умовах *in vitro* зручним біологічним об'єктом є репродуктивний матеріал кролів. Тварини цього виду мають короткий репродуктивний цикл і є багатоплідними [9, 10, 11].

Метою наших досліджень було розробити та застосувати ембріотехнологічну модель одержання ембріонів кролів *in vitro* з використанням наноматеріалу ВДК/D-галактозамін.

Матеріали і методи.

Для проведення досліджень яєчники одержували від забитих клінічно здорових статевозрілих кролиць віком 5–5,5 міс. Ооцит-кумулюсні комплекси (ОКК) отримували розсіченням стінок антральних фолікулів. Відібрані ооцити (n=208) дозрівали *in vitro* упродовж 24 годин в середовищі TCM 199 (Sigma, M-5017) з додаванням 20 % еструсною сироваткою крові корів. У дослідній групі середовище для культивування *in vitro* ооцитів кролів доповнювали 0,001 % ВДК/D-галактозаміну. Культивування проводили за температури $\pm 38,8$ °C і 4 % CO₂ у повітрі. Ембріони отримували шляхом запліднення яйцеклітини сперматозоїдами, які отримували з хвостової частини придатка сім'яника кроля. Капацитовані поза організмом епідидимальні сперматозоїди (концентрація — $1,5 \times 10^6$ в 1 мл) та ооцити спільно інкубували в середовищі TALP-IVF упродовж 22 годин [1]. Культивування ембріонів проводили у

середовищі TCM 199 (Sigma, M-5017) з додаванням 10 % фетальної сироватки теляти (Sigma, F-9665).

Для визначення стану хромосом ооцитів кролів та хроматину ядер ембріонів готували цитогенетичні препарати за модифікованим методом А. Тарковського [6]. Препарати фарбували 2 % барвником Гімза і аналізували під світловим мікроскопом Jenaval, Carl Zeiss. $\text{ок} \times 10$, $\text{об} \times 100$. Статистичну обробку одержаних даних проводили з використанням критерію Ст'юдента.

Результати й обговорення.

Враховуючи встановлений нами позитивний вплив використання 0,001 % моноцукру асоційованого з ВДК на кріоконсервовані сперматозоїди бугаїв [4, 12], наступні дослідження були спрямовані на вивчення ефективності додавання тієї ж концентрації ВДК/D-галактозаміну до середовища для культивування *in vitro* ооцитів кролів.

Вилучені ОКК кролів (рис. 1) були розділені на дві групи: дослідну, в якій культивування проводили в середовищі із 0,001 % ВДК/D-галактозаміном і контрольну, в якій культивування ОКК проводили без додавання наноматеріалу. Після культивування *in vitro* впродовж 24 годин встановлено вірогідну різницю між групами ($p < 0,05$) та відмічено позитивний вплив ВДК/D-галактозаміну в 0,001 % концентрації на мейотичне дозрівання ооцитів кролів *in vitro* (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив 0,001 % концентрації ВДК/D-галактозаміну на ефективність мейотичного дозрівання ооцитів кролів *in vitro*

Група	Всього ооцитів	Стадії розвитку ОКК <i>in vitro</i>				Кількість ооцитів з хромосомними порушеннями, n (%)
		диплотена, n (%)	діакінез, n (%)	метафаза I, n (%)	метафаза II, n (%)	
Контрольна	107	10 ^a (9,3±2,8)	3 ^b (2,8±1,6)	5 ^c (4,7±2,0)	81 ^d (75,7±4,1)	8 ^t (7,5±2,5)
Дослідна	101	3 ^a (2,9±1,6)	2 ^b (1,9±1,4)	1 ^c (1,0±0,9)	88 ^c (87,1±3,3)	7 ^t (6,9±2,5)

Примітка: d:e — $p < 0,05$ критерій Ст'юдента. Різні суперскрипти у межах однієї колонки вказують на вірогідну різницю між показниками

За даними морфологічного та цитогенетичного аналізу рівень дозрівання ооцитів *in vitro* у дослідній групі на 11,4 % вищий, порівняно з контрольною.

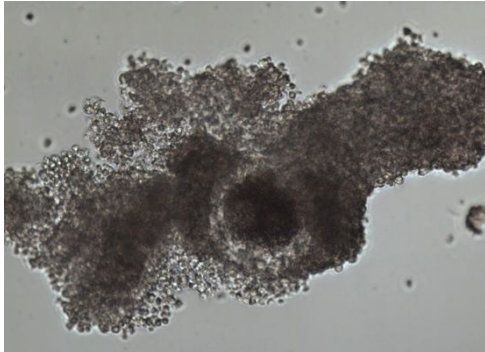


Рис. 1. Зажиттєве фото придатного до культивування *in vitro* ОКК кроля. Об.10х, ок.10х

Критерієм морфологічного визначення дозрівання ооцитів була візуалізація полярного тільца (рис. 2).



Рис. 2. Ооцит кроля після культивування *in vitro*. Ідентифіковано перше полярне тіло (стрілка). Об.10х, ок.10х

Отже, для стабільного та результативного рівня одержання та розвитку *in vitro* ембріонів кролів можна успішно застосовувати ВДК, який асоційовано з біомолекулою D-галактозаміну, як складову середовища для культивування ооцитів поза організмом, оскільки кремнезем, контактуючи з біологічними системами на різних етапах природних процесів, бере пряму участь у життєвих процесах.

З метою дослідження повноцінності дозрівання *in vitro* ооцитів кролів проводили їх запліднення епідидимальними сперматозоїдами. За результатами експериментів вірогідної різниці між рівнем формування поза організмом зигот і кількістю ембріонів не встановлено, рівень дроблення в обох групах у середньому становив 52,1 %, що вказує на повноцінність дозрівання ооцитів

in vitro (табл. 2). Хоча рівень дроблення суттєво не відрізнявся між порівнюваними групами, але вищий відсоток спостерігався в дослідній групі, яка містила 0,001 % концентрацію ВДК/D-галактозаміну, що свідчить про його позитивний вплив на мейотичне та цитоплазматичне дозрівання ооцитів кролів *in vitro*.

За результатами аналізу подальшого розвитку *in vitro* ембріонів на п'яту добу культивування до стадії ранньої морули (рис. 3) розвинулось у дослідній групі на 2,2 % більше ембріонів, порівняно з контрольною (табл. 2).

Результати морфологічної оцінки одержаних ембріонів *in vitro* доповнювали цитогенетичним аналізом. Показано, що між морфологічними характеристиками стану ембріону, за результатами візуальної оцінки та станом ядер, вираженого після аналізу цитогенетичних препаратів, існує взаємозв'язок [13].

Таблиця 2

Вплив 0,001 % концентрації ВДК/D-галактозаміну на ефективність формування ембріонів кролів *in vitro*

Група	Запліднено ооцитів, n	Кількість, n (%)		
		зигот	2–4-клітинних ембріонів	ранніх морул
Контрольна	81	52 ^a (64,2 ± 5,3)	42 ^b (51,9 ± 5,3)	12 ^c (14,8 ± 3,9)
Дослідна	88	56 ^a (63,6 ± 5,1)	46 ^b (52,3 ± 5,3)	15 ^c (17,0 ± 4,0)

Аналіз цитогенетичних препаратів ембріонів кролів на різних стадіях розвитку підтвердив, що ембріони, які за морфологічною оцінкою були нормальними, містили повноцінні ядра з



Рис. 3. Зажиттєве фото отриманого *in vitro* ембріона кролів. Збільшення в 100 разів.

ядерцями (рис. 4). Кількість ядер відповідала кількості бластомерів ембріонів, хроматин цих ядер відповідав стадії розвитку ембріонів.

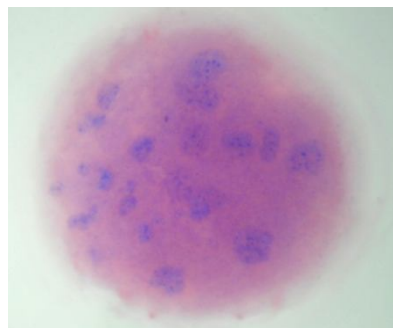


Рис. 4. Цитогенетичний препарат ранньої морули кролів, сформованої *in vitro* з морфологічно нормальними ядрами (n клітин = 19). Збільшення в 400 разів.

Для додаткової оцінки біологічної активності 0,001 % концентрації ВДК/D-галактозаміну ми застосували свіжоотримані епідідимальні сперматозоїди кроля. Встановлено, що такі сперматозоїди проявляли рухливість на рівні 40,0 % (контроль). Цей показник рухливості у контролі зберігався упродовж однієї години за температури 20 °С. Після перебування сперматозоїдів у середовищі з додаванням 0,001% концентрації ВДК/D-галактозаміну (дослід) упродовж 15 хвилин відбулося зниження рухливості гамет на 5,0 % з збереженням такого рівня упродовж трьох годин (рис. 5).

У контролі через три години рухливість сперматозоїдів знизилась до

25 %. Загальний час виживаності сперматозоїдів у контролі сягав дев'яти годин, а в дослідній групі — не перевищував восьми годин. Додавання ВДК/D-галактозаміну до середовища до концентрації 0,001 % спричинило швидке насичення рецепторів клітинної поверхні сперматозоїдів цим наноматеріалом, що в свою чергу призвело до зниження їх рухливості до 35 %. Але на такому рівні рухливості сперматозоїдів зберігалась довше, порівняно з контролем, що особливо важливо для підвищення рівня запліднення яйцеклітин *in vitro*.

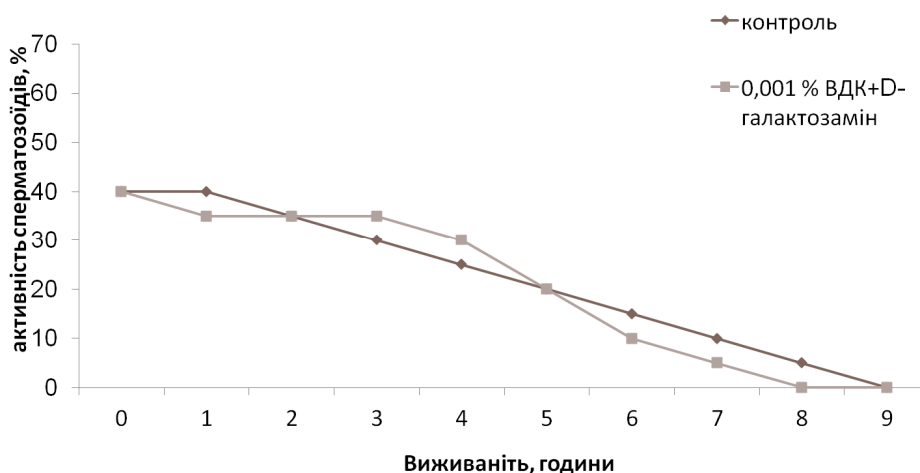


Рис. 5. Вплив 0,001 % концентрації ВДК/D-галактозаміну на виживаність свіжоотриманих епідідимальних сперматозоїдів кролів

Висновки

Проведеною оцінкою *in vitro* біологічної активності наноматеріалу ВДК/D-галактозамину, доведена перспективність застосування його для оптимізації біотехнологічних методів у тваринництві. Встановлено, що цілеспрямована стимуляція біологічних процесів в ооцитах шляхом додавання ВДК/D-галактозамину в концентрації 0,001 % позитивно впливає на ефективність дозрівання ооцитів кролів ($p < 0,05$). Додавання 0,001 % концентрації зазначеного наноматеріалу до середовища культивування *in vitro* ОКК кролів забезпечує формування зигот на рівні $63,6 \pm 5,1$ %. Показана перспективність проведення подальших біотехнологічних досліджень з використанням наноматеріалів на основі ВДК та біомолекул у системі збереження та раціонального використання генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин.

Перспективи подальших досліджень. На основі проведених досліджень, встановлено, що наноматеріал на основі ВДК, який асоційовано із аміновуглеводом підвищує ефективність технології формування *in vitro* ембріонів, що в свою чергу забезпечує результативність маніпуляції з гаметами тварин. Це є підґрунтям для ефективної реалізації завдань «Програми збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року», що передбачають широке впровадження при збереженні генофонду сільськогосподарських тварин біотехнологічних методів із застосуванням наноматеріалів.

1. Shcherbak O. V. Epididymal sperm of boars and efficiency of embryogenesis *in vitro*. *Scientific Technical Bulletin NAAS*, 2008, № 96, pp. 469–472 (in Ukrainian).

2. Guzjev I. V. Program preserve the gene pool of the main types of farm animals in Ukraine for the period till 2015. Kyiv, Aristej, 2009. 132 p. (In Ukrainian).

3. Burkat V. P., Kovtun S. I., Galagan N. P. Nanobiotechnology methods to preserve the gene

pool. *Materials of the international scientific-practical conference "Actual problems of reproductive biology of animals"*. Dubrovicy–Bikovo, 2007, pp. 450–452 (in Russian).

4. Galagan N. P. Nanomaterials based on highly dispersed silica and biomolecules in environments with reproductive cells. *Materials of the II All-Russian Scientific Conference with International Participation "Sorbents as a factor in the quality of life and health"*. Moscow–Belgorod, 2006, pp. 55–59 (in Russian).

5. Kovtun S. I. Effect of nanomaterials on efficiency of embryogenesis *in vitro*. *Agrarian Science Bulletin*, 2009, № 1, pp. 49–53 (in Ukrainian).

6. Kovtun S. I., Basovsciy D. M., Kunovskiy Y. V. Methods of obtaining preimplantation embryos in cattle and pigs outside the body. *Research techniques of breeding, genetics and biotechnology in animal*, 2005, pp. 192–200 (in Ukrainian).

7. Zabetian M., Tahmoorespur M., Hosseini Kh. The applications of transgenic rabbits in agriculture and biomedicine. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2011, vol. 10, no. 14–16, pp. 780–790.

8. Ostapchenko L. I., Babenjuk U. D., Andriychuk T. R. *Biochemistry*. Kyiv National University Taras Shevchenko, 2012, pp. 20–30 (in Ukrainian).

9. Kitajima S. E., Liu J. Rabbit Biotechnology rabbit genomics, transgenesis, cloning and models. *World Rabbit Science*, 2009, vol. 5, no. 6–8, pp. 37–48.

10. Shiomi M. Rabbit as a model for the study of human diseases. *World Rabbit Science*, 2009, vol. 7, no. 1–2, pp. 49–53.

11. Zhao S., Wei K., Yu Q. Y., Cheng Li, F., Wang Y, Yang P., J., General topic: applications of transgenic rabbits in biomedical research based on literature search. *World rabbit science*, 2010, vol. 18, no. 9–10, pp. 118–125.

12. Kovtun S. I., Galagan N. P., Klymenko N. Y. Use of nanomaterials in cryopreservation technology of animal genetic resources. *Collection of works of scientific symposium with international participation dedicated to 55 anniversary of the founding of the Institute «Achievements and perspectives in animal husbandry, biotechnology and veterinary medicine»*. Moldova, 2011, pp. 282–293 (in Russian).

13. Zuyzuyun A. B., Kovtun S. I., Shcherbak O. V. Formation of embryos *in vitro* as a way to assess the ability of sperm bulls. *Factors Experimental evolution of organisms*, 2009, vol. 10, pp. 218–222 (in Ukrainian).