

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 315 (2016), 34 – 39

## SUPEROVULATION INDUCTION AND STUDY OF SHEEP'S EMBRYOS VIABILITY AFTER TREATMENT OF VARIOUS CRYOPROTECTANTS AND USING DIFFERENT COOLING RATES

M. M. Toishibekov, Y. M. Toishibekov, G. A. Valiyeva

LLP "Institute of Experimental Biology named after F. M. Muhamedgalieva", Kazakhstan.

E-mail: inst-exp-biology@mail.ru

**Keywords.** Sheep, superovulation, embryo, cryopreservation.

**Abstract.** In our studies we were applied the following different doses of hormones: Folligon - 1200IE, FFA - 1500IE and Plyuset - 20 mg. On 3 experimental groups of sheep it was studied the effect of various drugs on the level of gonadotropin superovulation. Also embryos were cryopreserved using three cryoprotectors of glycerol, ethylene glycol and dimethyl sulfoxide.

УДК 636.082.12:573.6.086.83

## ҚОЙДЫҢ СУПЕРОВУЛЯЦИЯСЫН ИНДУКЦИЯЛАУ ЖӘНЕ ЭМБРИОНДАРЫНЫҢ ӨМІРШЕҢДІГІНЕ ӘРТҮРЛІ КРИОПРОТЕКТАНТТАР МЕН МҰЗДАТУДЫҢ ӘРТҮРЛІ РЕЖИМДЕРІНІҢ ӘСЕРІН ЗЕРТТЕУ

M. M. Тойшибеков, E. M. Тойшибеков, Г. А. Валиева

«Ф. М. Мухамедгалиев атындағы эксперименттік биология институты» ЖШС, Қазақстан

**Түйін сөздер:** қойлар, суперовуляция, эмбриондар, криоконсервациялау.

**Аннотация.** Біздің зерттеуімізде келесі әртүрлі гормондық препараттың келесі мөлшері қолданылды: Folligon – 1200 ХБ, СЖК – 1500 ХБ и Плюсет – 20 мг. 3-тәжірибелік қойлардың топтарында суперовуляция деңгейіне әртүрлі гонадотропты препараттың әсері зерттелді. Сонымен қатар, үш түрлі глицерин, этиленгликоль, диметилсульфоксид криопротекторларын пайдалану арқылы эмбриондарды криоконсервацияладық.

*Зерттеудің өзектілігі.* Ауыл шаруашылық малдардың генетикалық қорын сақтау және оны пайдалану, адамзат үшін өзекті мәселе болып табылады, әрі күрделі ғылыми талқылауды қажет етеді. Дүние жүзіндегі дамыған мемлекеттерде үй жануарлары тұқымдарын сақтау мен рационалды пайдалану мақсатында жүргізіліп жүрген ғылыми ізденістер бұған дәлел болады. Малдардың генетикалық қорын қорғау және оларды рационалды пайдалану дүние жүзі деңгейінде өзекті мәселе болып табылатыны белгілі.

Соңғы кездерде ооциттер мен эмбриондардың ерте кезеңдерінде (стадия) криоконсервациялауға қызығушылық тану өсіп келеді және де тығыздалу мен бластуляция болатындықтан төмен температураға төзімділігі жоғары екендігі анықталды [1, 2]. Сиырдың эмбриондары мұздатудың жай әдістерінде онша төзімсіз және мұздатудың + 15<sup>0</sup>С дейін немесе төмен болғанда шыдам бере алмайды [3]; алайда оның орнына бластоциялар мұздатуға жақсы шыдам көрсетті [4].

Осындай дифференциалды сезімталдық қой эмбриондарының бірклеткалыдан хэтчирленген бластоцистасына дейін анықталды және өте кеш кезеңде криоконсервациялауға бағытталып үлкен мән берілді [5]. Даму кезеңдері жылқы эмбриондарының өміршеңдігінде шешуші рөл атқарады [6], 6 күні алынған эмбриондар 7 немесе 8 күні алынған эмбриондарға қарағанда жоғары өміршеңдік көрсететіні байқалған [7, 8].

Соңғы уақыттарда бұл үшін альтернативті жолдар қарастырылуда, мұнда криосақтаудың тиімділігін арттыруда клеткада нақты өзгерістер болады. Бұл жолдарды қолданғанда әртүрлі клеткалардың түрлері зерттеледі және бұлар жануарлар ғермоплазмасының клеткаларын модификациялайтын жаңаша зерттеулерді қосады. Соңғы зерттеулерде, холестерин сперманың мембранасындағы фосфолипидке қосқанда олардың криорезистенттік көрсеткіштері жақсаратыны көрсетілген [9]. Әртүрлі температура жағдайында холестеринді қосқанда мембрананың ағуы (мембрананың липидтік биқабатының жабысқақтығы) азаятындығы, былайша холестеринді қосқанда мембрананың ағуы төменгі температураларда ұлғаятындығы анықталды [10]. Холестеринді қолданғанда мынандай өзгерістерге ұшырайды, төменгі температурада мембраналық фосфолипидтер бір-біріне әсер еткенде ол мембраналар жылдам болады. Сондай-ақ холестеринді қосқанда мембрана фазасына өткенде температура түседі немесе фазаға ауысу кезінде кейбір жағдайларда жойылады [11]. Purdy және Graham бұқа сперматозоидтарына холестерин қосқанда бұл фактының тиімді әсерін анықтады [12]. Horvath және Seidel [13] холестеринді сиыр ооциттеріне витрификация кезінде өміршеңдігін өсіру тиімділігін арттыру үшін қосты. Олар холестеринді клетка мембранасына дұрыс жағдайда ауыстыру аса бағалы фактор екендігін анықтады. Соңғы уақыттарда ғалымдар бұл мәселеге өте жоғары назар салды [14-16].

Қазақстанда жануарлар тұқымдарын ғаметалары мен эмбриондарын криоконсервациялауда жаңа әдістерді әлі кең қолданыс таппай, ақсап келеді. Сондықтан да бұл зерттеулеріміздің ғылыми-техникалық деңгейі биік, қазіргі заманғы әлімдік ғылым деңгейіне сай деп толық айтуға болады.

### Зерттеу материалдары мен әдістері

*Аналық – донорлардың суперовуляциясын индукциялау.* Тәжірибеміздегі малдар үш топқа бөлінеді: 1-ші топ (Folligon), 2-ші топ (ББҚСС) және 3-ші топ (Плюсет).

1-ші тәжірибиелік топта суперовуляцияны индукциялау үшін ғормондармен өңдеуді келесі схема бойынша жүргіздік: эстральді циклдің 12-ші күні Folligon (Intervet International, Netherland) 1200 ХБ-те ектік; содан кейін 48 сағаттан соң 125 мғ эстрофан (Чехия) енгізілді және ұрықтандыру күні 1000 ХБ адам хориондық ғонадопропинін (аХГ Ресей) ектік.

2-ші тәжірибелік топта суперовуляцияны индукциялау үшін ғормондармен өңдеуді келесі схема бойынша жүргіздік: эстральді циклдің 12-ші күні 1500–1700 ХБ ББҚСС егілді, содан кейін 48 сағаттан соң 125 мғ эстрофан (Чехия) және де ұрықтандыру күні 1000 ХБ адам хориондық ғонадопропинін (аХГ Ресей) ектік.

3-ші тәжірибелік топта суперовуляцияны индукциялау үшін ғормондармен өңдеуді келесі схема бойынша жүргіздік: эстральді циклдің 10–12-ші күні күніне екі реттен тері астына 4 күн ішінде интервалы 12 сағат аралықта 2,5 мғ Плюсет (Pluset, Laboratorios Calier S.A., Barcelona) егілді. Донорларға Плюсетті еккеннен кейін 3-ші күні бұлшық етіне 125 мкғ эстрофан (Чехия) егілді. Аналық – донордың эструсына 1000 ХБ хориондық ғонадопропинін (аХГ Ресей) егілді.

*Эмбриондарды криоконсервациялау.* Суперовуляцияны индукциялағаннан кейін осы морфологиялық көрсеткіштері бойынша бағаланудан өтіп криоконсервациялануға және ары қарай реципиенттерге трансплантациялануға жарамды деп танылған эмбриондар аналогтар принциптері бойынша үш топқа бөлінді:

1-ші тәжірибелік топтың эмбриондары (ГЛ) криопротектор ретінде 1,5 М ғлицерин ерітіндісін қолдану арқылы криоконсервацияланды.

2-ші тәжірибелік топтың эмбриондары (ДМСО) криопротектор ретінде 1,5 М ДМСО ерітіндісін қолдану арқылы криоконсервацияланды.

3-ші тәжірибелік топтың эмбриондары (ЭГ) криопротектор ретінде 1,5 М этиленгликоль ерітіндісін пайдаланып криоконсервацияланды.

## Зерттеу нәтижелері

Суперовуляцияны индукциялау, эмбриондарды алу және морфологиялық бағалау. 3-тәжірибелік қойлардың топтарында суперовуляция деңгейіне әртүрлі гонадотропты препараттың әсері зерттелді. Біздің зерттеуімізде келесі әртүрлі гормональді препараттың келесі мөлшері қолданылды: Folligon – 1200 ХБ, СЖК – 1500 ХБ и Плюсет – 20 мг. Көрсетілген гормональді препараттармен өңделген донор-саулықтар жақсы суперовуляторлық реакцияны ББҚСС-на қарағанда Folligon және Плюсетпен өңделген жануарлар көрсеткені белгілі болды (1-кесте). Плюсетті енгізумен салыстырғанда –  $6,75 \pm 1,03$  және ББҚСС екенге қарағанда –  $3,5 \pm 0,92$ , Folligon- мен өңдегенде донорға шаққандағы орташа овуляция саны –  $7,25 \pm 1,38$  құрады. Осылайша Folligon мен Плюсет қазақтың биязы жүнді қойларының суперовуляциясын индукциялағанда ең тиімді гонадотропты препараттар болып табылды, алайда ББҚСС қолдану құны бойынша ең қолжетімді болуы мүмкін.

1-кесте – Пайдаланған гонадотропты препараттың типіне байланысты қойлардың суперовуляция деңгейі

Көрсеткіштер	Гонадотропты препарат			
	Folligon	ББҚСС	Плюсет	Барлығы
Өңделген жануарлар, n	8	8	8	24
Барлық овуляция саны, n	58	28	54	140
Донорға шаққандағы овуляция саны, n	$7,25 \pm 1,38$	$3,5 \pm 0,92$	$6,75 \pm 1,03$	$5,8 \pm 2,01$
Барлық алынған эмбриондар, n	47	19	43	109
Овуляция санынан эмбриондардың жуылып алынған пайызы, %	81	67,8	79,6	77,8
Донорға шаққандағы эмбрион саны, n	$5,87 \pm 1,72$	$3,4 \pm 0,91$	$5,37 \pm 0,91$	$4,54 \pm 1,97$

Хирургиялық жолмен алуда 109 (77,8%) эмбрион жуылып алынды, донорға шаққанда орташа эмбрион  $4,54 \pm 1,97$  құрады. Осылайша алынған ғылыми нәтижелер донор-саулықтардың аналық безінің ең тиімді суперовуляторлық реакциясын беретін Folligon және Плюсет гонадотропты препараттарын пайдалануының тиімді екенін анық көрсетіп отыр. Бұл жоғарғы көрсеткіштер суперовуляцияны индукциялауға қажет тікелей гормондардың әрекетін тежейтін бұл препараттар ББҚСС препаратында болатын тікелей нативті ақуыздар қоспаларынан ең жақсы тазартылуына байланысты. Алайда бұл препаратта нативті ақуыздардың болуына байланысты суперовуляторлық реакцияға ББҚСС әрекеті төмен екендігін жоққа шығаруға болмайтынын осы саладағы біздің бұрынғы зерттеулеріміз растайды. Буаз бие қан сарысуында болатын нативті ақуыздардан тазарту ең сапалы гонадотропты препараттарды өндірудегі ең маңызды міндеті. Суперовуляцияны гормондармен индукциялау және эмбриондарды хирургиялық жолмен алуда келесі нәтижелерге қол жеткіздік. 24 донор – саулықтардан 105 эмбрион алынды және морфологиялық көрсеткіштеріне байланысты бағаланды (2-кесте).

2-кесте – Гонадотропиндердің эмбриондардың сапасы мен санына әсері

Көрсеткіштер	Барлық эмбриондар
Жануарлар саны	24
Аналық клетка және эмбрион алынды Оның ішінде:	105
Ұрықтанбаған аналық клетка, n (%)	6 (5,7 %)
Дегенерацияға ұшырағандар, n (%)	7 (6,7 %)
Зиготалар, n (%)	3 (2,9 %)
2 клеткалылар, n (%)	6 (5,7 %)
4-8- клеткалылар, n (%)	26 (24,8 %)
Морулалар және бластоцисталар, n (%)	57 (54,2 %)

Бұл эмбрион даму сатысына қарай жіктелді, морула және бластоциста даму сатысындағы 57 эмбрион жиналды. Кейінгі зерттеуімізде тек қана морула және бластоциста даму сатысындағы эмбриондарды ары қарай криоконсервациялау мен трансплантациялауға пайдаландық. Эмбриондар бастапқыдағы зерттеу схемасына сәйкес ГЛ, ЭГ және ДМСО үш топтарына бөлінді. Одан ары осы эмбриондар жоғары айтылған әдіс бойынша суыту температуралық режимдерін сақтай отырып, криопротектор ретінде глицерин, этиленгликоль, және диметилсульфоксид пайдалану арқылы криоконсервацияланды. Жоғарыда айтылғандай әдіспен сұйық азотта  $-196^{\circ}\text{C}$  температурада мұздатып сақтаудан соң 12–15 күннен кейін еріттік. жасадық. Дамудың әр сатысындағы мұздатып – ерітілген эмбриондарды еріткеннен кейін оларды морфологиялық бағалаудан өткізіп келесі нәтижелер алдық (3-кесте).

3-кесте – Өртүрлі топтағы мұздатып-ерітілген эмбриондардың саны мен сапасын морфологиялық бағалау

Көрсеткіштер	Тәжірибелік топтар		
	ГЛ	ЭГ	ДМСО
Мұздатып-ерітілген эмбриондардың саны, n	19	19	19
Олардың ішінде:			
Трансплантациялауға жарамды, n (%)	8 (42,1)	12(63,1)	10 (52,6)
Трансплантациялауға жарамсыз, n (%)	11 (57,9)	7 (36,8)	9 (47,4)

Мұздатылған эмбриондардың жалпы санынан 19 (ЭГ) және 19 (ДМСО), даму сатысындағы морула және бластоцисталарды ары қарай трансплантациялауға жарамды эмбриондардың ең көп саны 12 эмбрион ЭГ және 10 эмбрион ДМСО, 63,1% сәйкесінше 52,6% көрсеткені анықталды. Сонымен қатар, эмбриондарды морфологиялық бағалау кезінде ары қарай трансплантациялауға ГЛ тобында 19 эмбрионнан 8 эмбрион, яғни 42,1% болып ең төмен пайызды көрсетті. Мұздатып және еріткеннен соң эмбриондарды морфологиялық бағалаудан алынған нәтижелерден ары қарай трансплантациялауға криопротектор ретінде этиленгликольді қолдану кезінде көбірек эмбриондар алынғаны көрініп тұр. Бұл глицерин мен диметилсульфоксидтің молекулалық массасына қарағанда этиленгликольдің молекулалық массасы төменірек екенінен туындаған, өз кезегінде этиленгликоль эмбрионға ену кезіндегі сияқты еріту кезінде оны шығарғандада эмбрион мен бластомерлердің цитоплазмалық мембранасы арқылы үлкен өткізгіштікті тұғызады.

*Трансплантация кезінде мұздатып – ерітілген эмбриондардың өміршеңдігін зерттеу.* Транспланталатын эмбриондардың даму сатысына сәйкес жыныстық цикл сатылары теңестірілген трансплантациялауға жарамды эмбриондар реципиенттерге трансплантацияланды. Эмбриондарды бір талдап әр реципиентке трансплантацияладық. Келесі жыныстық циклде эструс фазасының бар екендігін анықтау негізінде трансплантацияланған эмбриондардың өміршеңдігін зерттеу жүргізілді. Осы зерттеулерді жүргізу нәтижесінде трансплантат-қозылар алынды (4-кесте). Егер топтар бойынша нәтижелерді қарастырсақ, онда әртүрлі режимдерде мұздатылған әртүрлі криопротекторлардың (ГЛ тобы) глицерин, (ЭГ тобы) этиленгликоль, және (ДМСО тобы) диметилсульфоксид мұздатып – ерітілген эмбриондардың өміршеңдігіне әсері бойынша, онда криопротектор ретінде глицерин қолданылған ГЛ тәжірибелік тобында реципиенттерде 2 қозы алынды және ол жалпы трансплантацияланған 8 мұздатылып-ерітілген эмбриондардың 25% құрады. Криопротектор ретінде этиленгликоль қолданылған ЭГ тәжірибелік тобында реципиенттерде 5 қозы алынды және ол жалпы трансплантацияланған 12 мұздатылып-ерітілген эмбриондардың 41,6% құрады, ал криопротектор ретінде диметилсульфоксид қолданылған ДМСО тәжірибелік тобында реципиенттерде 3 трансплантат – қозы алынды және ол жалпы трансплантацияланған 10 мұздатылып-ерітілген эмбриондардың 30% құрады.

4-кесте – Мұздатылып-ерітілген эмбриондардың өміршеңдігін зерттеу

Эмбриондардың даму сатысы	Трансплантацияланған эмбриондардың жалпы саны, n			Трансплантат – қозылардың саны, n (%)		
	ГЛ	ЭГ	ДМСО	ГЛ	ЭГ	ДМСО
Морула мен бластоциста	8	12	10	2 (25%)	5 (41,6%)	3 (30%)

Сонымен зерттеуімізді қорыта келгенде, алынған ғылыми мәліметтеріміз бойынша теңдестірілген криоконсервациялауда (баяу мұздатуда) ең тиімді криопротекторлар этиленгликоль және диметилсульфоксид болып табылатындығы дәлелденді.

Сонымен қатар біздің ғылыми тәжірибелік нәтижелеріміз бойынша морула және бластоциста даму сатысындағы эмбриондарды криоконсервациялаған 12 мұздатылып -ерітілген (ЭГ тобында) морула мен бластоцистадан 41,6 % құрайтын 5 трансплантат – қозы алынып этиленгликоль криопротекторын қолдану ең тиімді екені анықталды.

Бұл қой эмбриондарының мұздатуда жиі зақымдалатын *zona pellucida* аймағы өте сезімтал болуына байланысты. Бұл зақымдалулар әртүрлі сипатқа ие сызаттан бастап жыртылуға дейін болады. Дамудың зигота, 2 жасушалы, 4-8 жасушалы эмбриондар сияқты ерте кезеңдері үшін *zona pellucida*-ның зақымдалуы тұтас (интактные) бластомердің зақымдалуына әкеліп соғады.

Алайда біздің зерттеулеріміз морула мен бластоцистаны криоконсервациялауда оң нәтижелерге ие болуы, егер морулалар мен бластоцисталарды криоконсервациялау кезінде олардың бластомерлері зақымдалмаса, онда *zona pellucida*-ның ішінара зақымдалуы реципиенттерге эмбриондарды трансплантациялау кезінде өміршеңдігінің нәтижелеріне онша әсерін тигізбейтіні бұл ары қарайғы хэтчинг процесіне байланысты екенін көрсетті.

#### ӘДЕБИЕТ

- [1] Pesotskii V.V. The resistance of cattle embryos at different stages to low temperature // Ref. Zh. – 1987. – Vol. 2. – 408 p.
- [2] Willadsen S.M., Trounson A.M., Rowson L.E.A., Polge C., Newcomb R. Preservation of cow embryos in vitro // Proc. 8<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Cracow. – 1986. – Vol. 3. – P. 329-332.
- [3] Trounson A.O., Willadsen S.M., Rowson L.E.A., Newcomb R. The storage of cow eggs at room temperature and at low temperatures // J. Reprod. Fertil. – 1976. – Vol. 46. – P. 173-178.
- [4] Nelson C.F., Nelson L. Cryopreservation of 7- to 9-day bovine embryos // Theriogenology. – 1988. – Vol. 29. – 281 p.
- [5] Whitman S.S., Lineweaver J.A., Saacke R.G., Pearson R.E., Duman J. Effect of seeding temperature and hemolymph on freeze-thaw survival of bovine embryos // J. Anim. Sci. – 1984. – Vol. 59, suppl. 1. – 457 p.
- [6] Wierbowski S., Wierzchos E., Smorag Z., Kareta W., Gajada B., Krupinski J., Zukowski K. The practical application of embryo freezing and transfer for preservation of endangered Polish red cattle and longwool primitive sheep // Proc. 10<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana. – 1984. – Vol. 2. – 252 p.
- [7] Takeda T., Elsdon R.P., Squires E.L. In vitro and in vivo development of frozen thawed equine embryos // Proc. 10<sup>th</sup> Intl. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana. – 1984. – Vol. 2. – 246 p.
- [8] Yamamoto Y., Oguri N., Tsutsumi Y., Hachimohe Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos // J. Reprod. Fert. – 1982. – Vol. 32, suppl. 1. – 399 p.
- [9] He L., Bailey J.L., Buhr M.M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential // Biol. Reprod. – 2001. – Vol. 64. – P. 69-79.
- [10] Rottem S., Yashouv J., Ne'eman A., Razin A. Cholesterol in mycoplasma membranes. Composition, ultrastructure and biological properties of membranes from mycoplasma mycoides var. capri cells adapted to grow with low cholesterol concentrations // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – Vol. 323. – P. 495-508.
- [11] Purdy P.H., Graham J.K. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm // Cryobiology. – 2004. – Vol. 48. – P. 36-45.
- [12] Horvath G., Seidel G.E. Jr. Vitrification of bovine oocytes in chemically defined media after treatment with cholesterol-loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin // Theriogenology. – 2006. – Vol. 66(4). – P. 1026-1033.
- [13] Gabriella H. The use of chemically defined media supplemented with fetuin or cholesterol loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin for vitrification of bovine oocytes // Theses of PhD dissertation. – 2008. – 21 p.
- [14] Moce E., Blanch E., Toma C. and Graham J.K. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future // Reprod. Dom. Anim. – 2010. – Vol. 45(2). – P. 57-66.
- [15] Jennifer R. Prentice and Muhammad Anzar Cryopreservation of Mammalian Oocyte for Conservation of Animal Genetics // Veterinary Medicine International. – 2011. – Article ID 146405. – 11 p.
- [16] Moraes E.A., Graham J.K., Torres C.A.A., Meyers M., Spizziri B. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival // Anim. Reprod. Sci. – 2010. – Vol. 118. – P. 148-154.

#### REFERENCES

- [1] Pesotskii, V.V. The resistance of cattle embryos at different stages to low temperature // Ref. Zh. 1987. Vol. 2. 408 p.
- [2] Willadsen S.M., Trounson A.M., Rowson L.E.A., Polge C., Newcomb R. Preservation of cow embryos in vitro // Proc. 8<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Cracow. 1986. Vol. 3. P. 329-332.
- [3] Trounson A.O., Willadsen S.M., Rowson L.E.A., Newcomb R. The storage of cow eggs at room temperature and at low temperatures // J. Reprod. Fertil. 1976. Vol. 46. P. 173-178.
- [4] Nelson C.F., Nelson L. Cryopreservation of 7- to 9-day bovine embryos // Theriogenology. 1988. Vol. 29. 281 p.

- [5] Whitman S.S., Lineweaver J.A., Saacke R.G., Pearson R.E., Duman J. Effect of seeding temperature and hemolymph on freeze-thaw survival of bovine embryos // *J. Anim. Sci.* 1984. Vol. 59, suppl. 1. 457 p.
- [6] Wierbowski S., Wierzchos E., Smorag Z., Karetta W., Gajada B., Krupinski J., Zukowski K. The practical application of embryo freezing and transfer for preservation of endangered Polish red cattle and longwool primitive sheep // *Proc. 10<sup>th</sup> Intl. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana.* 1984. Vol. 2. 252 p.
- [7] Takeda T., Elsdon R.P., Squires E.L. In vitro and in vivo development of frozen thawed equine embryos // *Proc. 10<sup>th</sup> Intl. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana.* 1984. Vol. 2. 246 p.
- [8] Yamamoto Y., Oguri N., Tsutsumi Y., Hachimohe Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos // *J. Reprod. FerM.* 1982. Vol. 32, suppl. 1. 399 p.
- [9] He L., Bailey J.L., Buhr M.M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential // *Biol. Reprod.* 2001. Vol. 64. P. 69-79.
- [10] Rottem S., Yashouv J., Ne'eman A., Razin A. Cholesterol in mycoplasma membranes. Composition, ultrastructure and biological properties of membranes from mycoplasma mycoides var. capri cells adapted to grow with low cholesterol concentrations // *Biochim. Biophys. Acta.* 1973. Vol. 323. P. 495-508.
- [11] Purdy P.H., Graham J.K. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm // *Cryobiology.* 2004. Vol. 48. P. 36-45.
- [12] Horvath G., Seidel G.E. Jr. Vitriification of bovine oocytes in chemically defined media after treatment with cholesterol-loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin // *Theriogenology.* 2006. Vol. 66(4). P.1.026-1033.
- [13] Gabriella H. The use of chemically defined media supplemented with fetuin or cholesterol loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin for vitrification of bovine oocytes // *Theses of PhD dissertation.* 2008. 21 p.
- [14] Moce E., Blanch E., Toma C., Graham J.K. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future // *Reprod. Dom. Anim.* 2010. Vol. 45(2). P. 57-66.
- [15] Jennifer R. Prentice and Muhammad Anzar Cryopreservation of Mammalian Oocyte for Conservation of Animal Genetics // *Veterinary Medicine International.* 2011. Article ID 146405. 11 p.
- [16] Moraes E.A., Graham J.K., Torres C.A.A., Meyers M., Spizziri B. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival // *Anim. Reprod. Sci.* 2010. Vol. 118. P. 148-154.

**ИНДУКЦИЯ СУПЕРОВУЛЯЦИИ И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ  
РАЗЛИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТАНТОВ И РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ  
НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЭМБРИОНОВ ОВЕЦ**

**М. М. Тойшибеков, Е. М. Тойшибеков, Г. А. Валшева**

«Институт экспериментальной биологии им. Ф. М. Мухамедгалиева» ТОО, Казахстан

**Ключевые слова:** овцы, суперовуляция, эмбрионы, криоконсервация.

**Аннотация.** В наших исследованиях были применены следующие дозы различных гормональных препаратов: Folligon - 1200ИЕ, СЖК – 1500ИЕ и Плюсет – 20 мг. На 3-х подопытных группах овец было изучено влияние различных гонадотропных препаратов на уровень суперовуляции. А также эмбрионы были криоконсервированы с использованием трех крипротекторов глицерина, этиленгликоля и диметилсульфоксида.

*Поступила 04.05.2016 г.*