

УДК 636.2:612.64.089.67

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВИТРИФИКАЦИИ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

А. С. Дешко¹, Л. В. Голубец¹, В. К. Пестис¹, И. С. Кысса¹,
Д. В. Машталер², В. И. Белевич¹

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by);

² – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела»

п. Лесные Поляны, Московская область, Российская Федерация

(Российская Федерация, 141212, Московская область, Пушкинский район, п. Лесные Поляны, ул. Ленина, стр. 13; e-mail: vniiplm@mail.ru)

Ключевые слова: криоконсервация эмбрионов, крупный рогатый скот, *in vitro*, экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), воспроизводство животных, трансплантация эмбрионов витрификация, криопротектор, эмбрионы, оттаивание эмбрионов.

Аннотация. Исследования, представленные в данной статье, посвящены изучению влияния различных методов криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота, полученных в системе *in vitro*, а именно метода «медленной заморозки» и метода витрификации. Полученные данные показывают, что исследуемые методы по-разному влияют на качественные показатели эмбрионов. Отмечается, что использование метода витрификации по сравнению с методом «медленной заморозки» увеличивало показатель сохранности эмбрионов на 25,8 п. п., а количество жизнеспособных эмбрионов отличного качества увеличивалось на 39,69 п. п. Полученные данные имеют практическую значимость для разработки технологии долговременного хранения эмбрионов, полученных в культуре *in vitro*, и будет способствовать увеличению сохранности эмбрионов.

THE INFLUENCE OF THE MULTIPLICITY OF USE OF DONOR-COWS TO THE EXIT OF THE OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES

A. S. Deshko¹, L. V. Golubets¹, V. K. Pestis¹, I. S. Kyssa¹,
D. V. Mashtaler², V. I. Belevich¹

¹ – EI «Grodno state agrarian university»

Grodno, Republic of Belarus

(Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Tereshkova st.; e-mail: ggau@ggau.by);

² – FSBSI «All-Russian scientific-research Institute of breeding» village Lesnye Polyany, Moscow region, Russian Federation (Russian Federation, 141212, Moscow region, Pushkin district, village Lesnye Polyany, p. 13 Lenin st.; e-mail: yniiplem@mail.ru)

Key words: *embryo cryopreservation, cattle, in vitro, in vitro fertilization (IVF), animal reproduction, embryo transplantation vitrification, cryoprotector, embryos, embryo thawing.*

Summary. *The research presented in this article is devoted to the study of the influence of various methods of cryopreservation of cattle embryos obtained in the in vitro system, namely the method of «slow freezing» and the method of vitrification. The data obtained show that the methods under study have different effects on the quality of embryos. It is noted that the use of vitrification method in comparison with the method of «slow freezing» increased the embryo safety index by 25,8 p. p., and the number of viable embryos of excellent quality increased by 39,69 p. p. The obtained data are of practical importance for the development of technology of long-term storage of embryos obtained in vitro culture and will contribute to the increase of embryo safety.*

(Поступила в редакцию 03.06.2019 г.)

Введение. Одной из актуальных задач технологии трансплантации является возможность длительного хранения криоконсервированных эмбрионов, что требует знания основных принципов криобиологии и совершенствования клинических и лабораторных подходов для успешной реализации программ криоконсервации [1-4].

Использование низких температур для длительного хранения биологических объектов востребованный биотехнологический метод. Доказано, что при достижении температуры -130°C , известной как температура «стеклования», образец может находиться в стабильном состоянии при практически полном отсутствии биохимических процессов.

Криоконсервация эмбрионов является составной частью репродуктивных технологий, она позволяет длительное время сохранять генетический материал животных, а также проводить трансплантацию эмбрионов в строго определенные сроки, обеспечивая высокую выживаемость эмбрионов после оттаивания и, в конечном счете, беременность и живое потомство после пересадки эмбрионов реципиенту, что достигается благодаря тщательной разработке и изучению методик замораживания и оттаивания [2, 5].

Однако стоит отметить, что процесс криоконсервации зачастую оказывает негативное действие на эмбрион. Это связано с тем, что не вся жидкость внутри клеток переходит в стекловидное состояние. В результате образуются кристаллы льда, которые нарушают целост-

ность клеточной стенки. Что при последующем оттаивании приводит к нарушению в развитии эмбриона, а также и его гибели [6].

Для успешного применения метода криоконсервации необходимо изучить влияние пенетрирующих криопротекторов и температурных режимов на выживаемость эмбрионов [7].

Таким образом, поиск и использование оптимальных методов заморозки имеет важное значение для сохранения и повышения устойчивости структур эмбриона при воздействии низких температур.

Научной основой применения пенетрирующих криопротекторов является их способность проникать внутрь эмбриона и защищать их от отрицательных факторов присущих процессу криоконсервации.

Эффективность криоконсервации зависит от многих показателей, включая стадию развития эмбрионов, их качество, происхождение эмбриона (полученный в естественных условиях – *in vivo* или в произведенный пробирке – *in vitro*), от правильного выбора и использования криопротектора, а также температурного режима заморозки и оттаивания. Оптимизация всех этих условий позволит в дальнейшем увеличить выживание и потенциал, связанный с развитием эмбриона [1-4, 8].

Цель работы – изучить эффективность метода медленной криоконсервации в сравнении с методом витрификации эмбрионов крупного рогатого скота, полученных в культуре *in vitro*

Материал и методика исследований. Исследования проводились в рамках двух государственных программ научных исследований: «Биотехнология» (подпрограмма «Развитие биологической науки, биологического образования и биологической промышленности на 2007-2011 гг. и на период до 2020 г.»), «Наукоёмкие технологии и техника на 2016-2020 гг.» (подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии-2020»). Исследования по изучению влияние кратности использования коров-доноров на выход ооцит-кумулясных комплексов проводили на базе биотехнологического центра по репродукции сельскохозяйственных животных Гродненского государственного аграрного университета, а также в учебно-практическом центре биотехнологий ОАО «Почапово» Пинского района Брестской области в 2013-2018 гг.

В качестве доноров ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) использовали коров-доноров живой массой 650-800 кг в возрасте 4-8 лет с удоом по наивысшей лактации 10-13,5 тыс. кг молока жирностью 3,8% и более.

Пункцию фолликулов проводили с использованием ультразвуковой системы Aloka SSD 500, включающей в себя ультразвуковой сканер Aloka Prosound 2, ультразвуковой излучатель с частотой 7,5 MHz, вакуумную помпу Craft suction unit, держатель ультразвукового излу-

чателя, иглы длиной 55 см и диаметром 17G (1,473 мм), 18 G (1,27 мм) и 20G (0,91 мм). В качестве промывной жидкости использовали фосфатно-солевой буфер Дюльбекко с добавлением 100 ед./мл гентамицина и 5% BSA. Локализацию ооцит-кумулюсных комплексов проводили с помощью эмбрионального фильтра EMCON, поиск и оценку качества полученных ооцитов осуществляли под микроскопом Olympus при 16- и 90-кратном увеличении соответственно [9].

Оплодотворение проводили заморожено-оттаянной спермой. Подготовку к оплодотворению осуществляли по следующей методике. Дозу спермы в среде для капацитации ставили в термостат на 1 час для процесса «флотации». Суть этого метода заключается во всплытии фракции наиболее активных сперматозоидов в верхние слои. Надосадочную фракцию три раза отмывали в среде для капацитации путем центрифугирования при 3000 об./мин в течение 10 мин. Затем в среду добавляли гепарин в концентрации 50 ед./мл и снова центрифугировали в том же режиме. После этого сперму дважды отмывали в среде для оплодотворения и в количестве 1×10^6 сперматозоидов в 1 мл добавляли к ооцитам, находящимся к этому времени в среде для оплодотворения.

Совместная инкубация спермы и ооцитов продолжалась в течение 18-20 ч при температуре 38,7°C в атмосфере 5% CO₂ и максимальной влажности. После совместного инкубирования ооциты отмывали от сперматозоидов и в среде для созревания на монослое кумулюсных клеток снова помещали в CO₂-инкубатор на 7-9 дней (до получения пригодных для криоконсервации эмбрионов). Питательные среды для созревания, капацитации и оплодотворения были приготовлены по нашим методикам на основе реактивов фирмы «Sigma» [10].

Для опыта использовались доимплантированные эмбрионы отличного качества на стадиях развития поздней и экспонированной бластоцисты. Криоконсервация эмбрионов осуществлялась двумя методами. В первом случае использовалась «медленная заморозка», во втором – витрификация. После оттаивания эмбрионы подвергались процедуре выведения криопротектора, после чего отмывались в культуральной среде и оценивались согласно критериям пригодности: отличный, хороший, удовлетворительный, неудовлетворительный. Эмбрионы, получившие оценку как неудовлетворительные, на культивирование не помещались.

Материалы исследований обработаны статистически по стандартным методикам (по П. Ф. Рокицкому (1973) и Н. А. Плохинскому (1969)) на персональном компьютере с использованием пакета программ Microsoft Office Excel.

Результаты исследований и их обсуждение. В первой серии опыта эмбрионы криоконсервировались при помощи замораживателя «FREEZE CONTROL» CL 5500, фирмы «CRYOLOGIC». В качестве криопротектора использовался 1,5 М раствор этиленгликоля на основе среды SOF. Эмбрионы помещали в раствор криопротектора, где выдерживали в течение определенного времени. После чего заправляли в пайеты (рисунок 1) и помещали в камеру замораживателя.

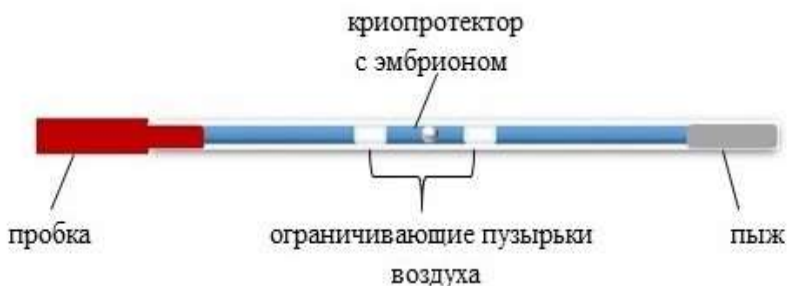


Рисунок 1 – Схема заправки эмбриона в пайету с криопротектором

Начальная температура цикла заморозки составляла $+20^{\circ}\text{C}$. Охлаждение осуществлялось со скоростью $2^{\circ}/\text{мин}$ до температуры -6°C . Далее происходила инициация кристаллизации «сидинг» и выдержка при -6°C в течение 10 мин. После выдержки температура снижалась со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -35°C . После чего пайеты с эмбрионами помещали в жидкий азот. Хранение осуществлялось в сосуде Дьюара.

Оттаивание эмбрионов производилось в водяной бане при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. После эмбрион извлекался из пайеты и помещался в раствор $0,3\text{M}$ сахарозы, где выдерживался в течении 5 мин. После чего отмывался в культуральной среде SOF и оценивался на пригодность. Всего для опыта было криоконсервировано и в последующем оттаяно 96 эмбрионов.

На рисунке 2 представлена сохранность эмбрионов после оттаивания (медленная заморозка).

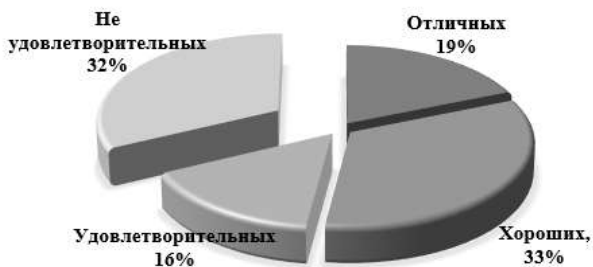


Рисунок 2 – Качество и выживаемость эмбрионов после разморозки (медленная заморозка), %

Итого, 65 эмбрионов были оценены как пригодные, что составило 67,7% от числа оттаянных. Количество неудовлетворительных составило 31 эмбрион, или 32,3% от оттаянных.

Проведенные исследования по изучению развития оттаянных эмбрионов после культивирования в течение 24 и 48 ч представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Развитие оттаянных эмбрионов после культивирования в течение 24 и 48 ч (n-%)

Поставлено на культивирование, n	Вышло из ZP через 24 ч	Вышло из ZP через 48 ч	Всего вышло из ZP	Развивались, но не вышли из ZP	Не развивались
65	13-20,0	12-18,46	25-38,46	25-38,46	15-23,07

Как показывает анализ представленных в таблице 1 данных, из 65 поставленных на культивирование эмбрионов всего вышло из зоны пеллюцида (ZP) 25 эмбрионов, что составило 38,46% от числа поставленных на культивирование. Не развивалось 15 эмбрионов, что составило 23,07% от числа поставленных.

Во второй серии опыта эмбрионы криоконсервировались при помощи витрификации. Принцип метода заключается в помещении эмбриона в концентрированный раствор криопротектора, затем перенос эмбриона на носитель «криотоп» и мгновенное погружение в жидкий азот. В качестве криопротектора использовался раствор на основе SOF с содержанием диметилсульфоксида (ДМСО), этиленгликоля (ЭГ), а также фетальной сыворотки крови КРС (FBS) и 0,5М сахарозы. Насыщение эмбрионов криопротектором проводили в 2 этапа. В первом растворе – ES (эквilibрационный раствор), где концентрация ЭГ-7% и ДМСО-7%, и во втором растворе – VS (витрификационный раствор),

где концентрация ЭГ-14%, DMSO-14%. Схема насыщения эмбриона криопротектором показана на рисунке 3.

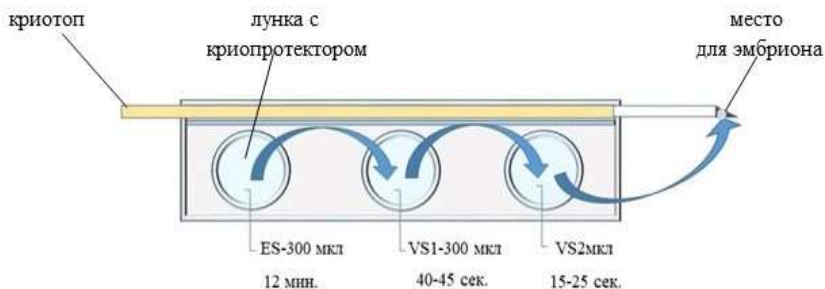


Рисунок 3 – Схема витрификации эмбрионов

Для опыта было криоконсервировано методом витрификации 77 эмбрионов, полученных в культуре *in vitro*. Хранение осуществлялось в жидком азоте в сосуде Дьюара. Оттаивание эмбрионов проводили в растворе для девитрификации, состоящем из 0,5М сахарозы на основе культуральной среды SOF. Согласно схеме, представленной на рисунке 4, носитель с эмбрионом извлекался из жидкого азота и мгновенно помещался в лунку с раствором ТС, предварительно подогретым до температуры +37°С, на одну минуту. После чего все действия выполнялись по порядку согласно схеме, представленной на рисунке 4.

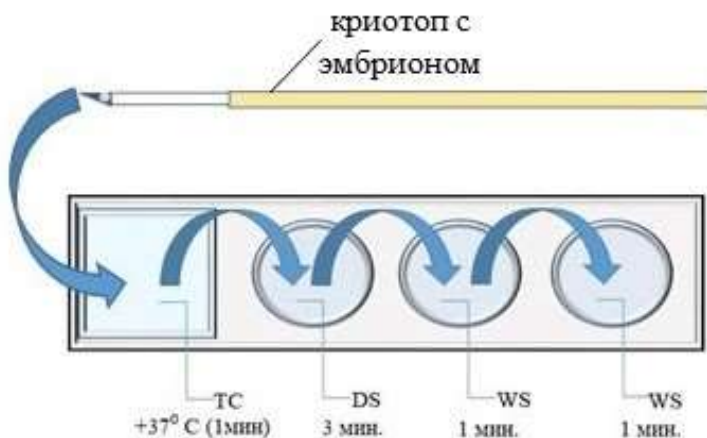


Рисунок 4 – Схема девитрификации эмбрионов

Качественные показатели эмбрионов после девитрификации представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Качество эмбрионов после девитрификации (n-%)

Оттаяно эмбрионов, n	Отличных	Хороших	Удовлетворительных	Неуд.	Всего пригод.
77	45-58,44	18-23,37	9-11,68	5-6,49	72-93,50

Согласно данным таблицы 2, из 77 оттаянных были оценены как пригодные 72 эмбриона, или 93,5% от числа оттаянных; 5 эмбрионов получили оценку как неудовлетворительные, что составило 6,49% от числа оттаянных.

После девитрификации эмбрионы отмывались в культуральной среде. Эмбрионы, оцененные как пригодные, помещались на культивирование. Результаты культивирования девитрифицированных эмбрионов отражены в таблице 3.

Таблица 3 – Развитие девитрифицированных эмбрионов после культивирования в течение 24 и 48 ч (n-%)

Поставлено на культивирование, n	Вышло из ZP через 24 ч	Вышло из ZP через 48 ч	Всего вышло из ZP	Развивались, но не вышли из ZP	Не развивались
72	25-34,72	23-31,94	48-66,66	17-23,61	7-12,50

Как видно из представленных данных таблицы 4, из 72 поставленных на культивирование эмбрионов всего вышло из зоны пеллюцида (ZP) 48 эмбрионов, что составило 66,66% от числа поставленных на культивирование. Не развивалось 7 эмбрионов, что составило 12,50% от числа поставленных.

Вывод. Таким образом, как показал анализ полученных результатов, оптимальным способом криоконсервации эмбрионов является метод витрификации. Применение данного метода повышало сохранность эмбрионов на 25,8 п. п., при этом отмечалось увеличение числа эмбрионов отличного качества на 39,69 п. п. в сравнении с методом медленного (программного) замораживания эмбрионов. Наблюдалось увеличение количества эмбрионов, вышедших из зоны пеллюцида (ZP), на 28,2 п. п., а количество неразвившихся было меньше на 10,57 п. п.

ЛИТЕРАТУРА

1. Campos-Chillon, LF. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos / LF. Campos-Chillon, [et. all.] // Theriogenology. 2006. – Vol. 65. – P. 1200-1214.
2. Dattena, M. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived / M. Dattena, [et. all.] // Theriogenology. 2004. – Vol. 62. – P. 481-493.

3. Guyader-Joly, C. Effect of lecithin on in vitro and in vivo survival of in vitro produced bovine blastocysts after cryopreservation / C. Guyader-Joly, [et. all.] // Theriogenology. 1999. – Vol. 52. – P. 1193-1202.
4. Nawroth, F. Cryopreservation in assisted reproductive technology: New trends. / F. Nawroth, [et. all.] // Semin. Reprod. Med. 2005. – Vol. 23. – P. 325-331.
5. Nedambale, TL. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol / TL. Nedambale, F. Du, X. Yang, XC.Tian // Anim. Reprod. Sci. 2006. – Vol. 93. – P. 61-75.
6. Seidel, GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation / GE. Seidel // Theriogenology. 2006. – Vol. 65. – P. 228-35.
7. Sommerfeld, V. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification / V. Sommerfeld, H. Niemann // Cryobiology. 1999. – Vol. 38. – P. 95-105.
8. Vajta, G. Improving cryopreservation systems / G. Vajta, M. Kuwayama // Theriogenology. 2006. – Vol. 65. – P. 236-244.
9. Голубец, Л. В. Оценка качества ооцитов и эмбрионов крупного рогатого скота / Л. В. Голубец, А. С. Дешко [и др.] // Учеб.-метод. пособие – Гродно: ГГАУ, 2011 – 68 с.
10. Пестис, В. К. Производство эмбрионов крупного рогатого скота в культуре in vitro / В. К. Пестис, Л. В. Голубец, А. С. Дешко [и др.] // Метод. рекомендации – Гродно: ГГАУ, 2018. – 52 с.

УДК 636.2.034.636.087.7

РАЗРАБОТКА И АДАПТАЦИЯ МЕТОДИКИ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО ГЕНУ ЛАКТОФЕРРИНА

О. А. Епишко, В. В. Пешко, А. А. Ситько

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail:
ggau@ggau.by)

***Ключевые слова:** ген лактоферрина, резистентность организма, молочная продуктивность, крупный рогатый скот.*

***Аннотация.** Изучен мировой опыт использования маркерных генов в селекции крупного рогатого скота для увеличения резистентности организма животных к воспалению молочной железы. Проведена адаптация методики генотипирования крупного рогатого скота по гену лактоферрина. Идентифицированы генотипы LTF AA и LTF AB. Генотип LTF BB выявлен не был.*