

ВИТРИФИКАЦИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Голубец Л. В., Дешко А. С., Стецкевич Е. К., Белевич В. И.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

В связи с тем, что эмбрионы полученные методом in vitro обладают более низким функциональным статусом, требуется применение более деликатных методов криоконсервации, позволяющих гарантированно сохранить качество эмбриона.

Для определения оптимального протокола и метода заморозки нами был проведен ряд опытов по сравнению методов криоконсервации, а также растворов криопротекторов.

Исследования проводились на базе биотехнологического центра по репродукции сельскохозяйственных животных УО «ГГАУ» и учебно-практического центра биотехнологий ОАО «Почапово».

Для опыта использовали доимплантированные эмбрионы КРС, полученные из ооцит-кумулюсных комплексов. Ооцит-кумулюсные комплексы извлекали прижизненно методом OPU (трансвагинальной аспирации) из антральных фолликулов яичников коров доноров. Поиск и морфологическую оценку осуществляли на стереомикроскопе лабораторного класса Olympus SZ51 при 16-кратном увеличении. Для дозревания ооцитов использовали среду 199 (Medium 199, Neres modification, 25mM.) с добавлением 10% эстральной сыворотки крови крупного рогатого скота, Na-пирувата, BSA, 1,0 ЕД/мл лютеинизирующего гормона, 10 МЕ/мл фолликулостимулирующего гормона, 1,0 мкг/мл эстрадиола (спиртовой раствор) и 50 мкг/мл гентамицина [1, 2].

После оплодотворения зиготы отмывали в растворе SOF и механически удаляли клетки кумулюса посредством пипетирования при помощи наконечников для денудации ооцитов диаметром 135 мкм. Для опыта использовали эмбрионы только отличного качества, находящиеся на стадии развития от BL-II (поздняя бластоциста) до BL-IV (полностью экспандированная). Выход доимплантированных бластоцист от числа поставленных на созревание яйцеклеток составил 29,42%.

Криоконсервация опытных образцов 1-3 группы осуществлялась с помощью программного замораживателя фирмы «CRYOLOGIC» (модель CL 5500), а эмбрионы 4 группы замораживались с помощью метода витрификации при помощи готовых наборов криопротекторов

«Криотек» (Япония).

Для криоконсервации эмбрионов 1-3 группы использовали протокол, где начало охлаждения идет с $+20^{\circ}\text{C}$, охлаждение ведется со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -6°C , далее следует индукция кристаллизации (синдинг) и выдержка при этой температуре в течение 10 мин, далее охлаждение до -35°C со скоростью $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

После завершения цикла заморозки пайетты с эмбрионами переносились в жидкий азот и хранились при температуре -196°C .

Четвертая группа замораживалась витрификацией, где в качестве криопротектора использовали стандартный раствор фирмы «Криотек». После проводки в растворе криопротектора эмбрион помещался на носитель «Криотоп» и погружался в жидкий азот.

Оттаивание пайетт с эмбрионами 1-3 групп производилось в водяной бане при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Эмбрионы, криоконсервированные методом витрификации, оттаивались по схеме девитрификации.

Морфологическая оценка производилась на стереомикроскопе Olympus SZ 51 при 40-кратном увеличении. Эмбрионы, оцененные как пригодные, после выведения криопротектора помещались в среду SOF.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что наилучший результат сохранности показали эмбрионы 4 группы, криоконсервированные методом витрификации. Из 77 замороженных эмбрионов 75 получили оценку как пригодные, что составило 97,40%. Наименьший результат сохранности показали эмбрионы, криоконсервированные в 1,8 М этиленгликоле, что составило 50 пригодных эмбрионов, или 59,44%. Эмбрионы, замороженные в 1,5 М этиленгликоле и 1,4 М глицерине, заняли промежуточное положение.

Основываясь на результатах проведенных исследований, можно сделать вывод, что метод витрификации позволяет достигать минимальных потерь при заморозке эмбрионов, которые составили 2,6%.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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: ГТАУ, 2018 – 52 с.
2. Пестис, В. К. Некоторые аспекты получения ооцитов крупного рогатого скота путем трансвагинальной пункции фолликулов / В. К. Пестис, Л. В. Голубец, А. С. Дешко, И. С. Кысса, М. В. Попов // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 123-128.