

Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, А.И. ГАНДЖА, В.П. СИМОНЕНКО, А.А. ПУТИК

ВИТРИФИКАЦИЯ РАННИХ ЭМБРИОНОВ КОРОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ВНЕ ОРГАНИЗМА

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

Введение. В настоящее время в скотоводстве для сохранения генетических ресурсов широко применяются такие технологии, как криоконсервирование спермы и эмбрионов, полученных методом трансплантации. Технология глубокого замораживания последних хорошо отработана, используется в практике и предусматривает следующие этапы: насыщение криопротектором, постепенное охлаждение, перенос в жидкий азот, оттаивание, выведение криопротектора и отмывание в культуральной среде [1]. Заморожено-оттаянные эмбрионы сохраняют жизнеспособность в 60 % случаев и, трансплантированные в матку реципиентов, обеспечивают приживляемость на уровне 50 % [2]. Несмотря на то, что первые работы по криоконсервации зародышей млекопитающих в жидком азоте появились более 20 лет назад, до сих пор не существует каких-то общепринятых схем замораживания [3]. Продолжается интенсивный поиск наиболее эффективных криопротекторов, определение их приемлемых концентраций, условий эквilibрации и определение оптимальной стадии развития эмбрионов при криоконсервировании.

Эмбрионы коров, полученные из созревших вне организма ооцитов в синтетических питательных средах, морфологически существенно отличаются на клеточном и субклеточном уровне от ранних эмбрионов, полученных *in vivo* [4]. Период формирования преимплантационных зародышей в искусственных условиях длится от 8 до 10 суток, тогда как в организме – 7-8. В эмбрионах, полученных *in vitro*, наблюдается высокий уровень миксоплоидии (72 % против 26 %), ранняя кавитация, пониженное число клеток во внутриклеточной массе бластоцист и т. д. [5]. Все это требует новых подходов к криоконсервированию ранних эмбрионов коров, полученных вне организма, в том числе таких перспективных и малозатратных, как витрификация и сверхбыстрое замораживание.

В связи с вышеуказанным, целью наших исследований явилась разработка способа криоконсервирования прямым погружением в жидкий

азот ранних эмбрионов крупного рогатого скота, полученных вне организма.

Материал и методика исследований. Исследования выполнены в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Объектом исследований служили эмбрионы на ранних стадиях развития, полученные вне организма по общепринятой методике из яйцников убитых на мясокомбинате коров. Для заморозки и оттаивания использовали зиготы и эмбрионы на разных стадиях дробления (2, 4, 8, 16 клеток, морулы, бластоцисты), а в качестве проникающих и непроникающих криопротекторов – глицерин, пропандиол, этиленгликоль, сахарозу. Базовым раствором для приготовления криофилактиков служила среда ТС-199 с добавлением 20%-ной фетальной сыворотки (Sigma).

При сверхбыстром замораживании эмбрионы обрабатывали в 10%-ном глицерине в течение 10 мин, а затем переносили в раствор, состоящий из смеси 30 % глицерина и 70 % 1М сахарозы. В некоторых опытах эмбрионы помещали в смесь криопротекторов без предварительной эквilibрации в глицерине. В качестве проникающего криопротектора также использовали 1,2М пропандиол или 1,5М этиленгликоль. Замораживание эмбрионов коров путем витрификации осуществляли в смеси глицерина и пропандиола. Эмбрионы эквilibрировали в течение 10 мин при комнатной температуре в растворе, содержащем 10 % глицерина и 20 % пропандиола. Затем переносили в раствор, содержащий 25 % глицерина и 25 % пропандиола. Эмбрионы с помощью микроаспиратора помещали в пластиковые пайетты и опускали в сосуд Дьюара с жидким азотом на хранение. Оттаивали пайетты на водяной бане при температуре +20 и +37°C. После оттаивания эмбрионы помещали в раствор 0,5 или 1М сахарозы на 10 минут, а затем отмывали в трёх сменах среды для созревания, оценивали и помещали в CO₂-инкубатор на культивирование.

Сохранность эмбрионов определяли по способности дробиться и продолжать свое развитие вне организма.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Основные результаты криорезистентности ранних зародышей крупного рогатого скота, полученных *in vitro* и замороженных сверхбыстрым способом и витрификацией, приведены в таблице 1.

Эмбрионы на начальных стадиях дробления и морулы плохо переносили сверхбыстрое замораживание в 1,5М этиленгликоле и 1,4М глицерине с сахарозой с предварительной эквilibрацией, а также витрификацию в 25% глицерине и 25% пропандиоле. После оттаивания 92,3% 2-16 клеточных зародышей, замороженных с использованием

1,5М этиленгликоля, 68,4 % замороженных с 1,4М глицерином, и 85,2% – с использованием 25% глицерина и 25% пропандиола, оценены как «нежизнеспособные».

К «условно-годным» отнесены 7,7 % эмбрионов на начальных стадиях дробления с применением 1,5М этиленгликоля, 26,3 % – с 1,4М глицерином, 7,4 % – с глицерином и пропандиолом.

Получено после оттаивания по 2 «хороших» эмбриона с криоконсервированием в глицерине (5,3 %) и комбинации глицерина и пропандиола (7,4 %), однако в процессе культивирования их жизнеспособность была утрачена. Следует отметить, что морулы также плохо сохраняли жизнеспособность после глубокой заморозки. Так, после витрификации получено 73,3 % «нежизнеспособных» морул и 26,7 % «условно-годных», а с использованием 1,5М этиленгликоля – 80,0 % и 10,0 %, соответственно, и 1 визуально «хороший» эмбрион, который утратил в дальнейшем способность к развитию.

Бластоцисты показали гораздо лучшую сохранность после сверхбыстрого замораживания и витрификации. После витрификации бластоцист в смеси глицерина с пропандиолом получено 26,7 % «условно-годных» и 66,7 % «хороших» зародышей, из которых 71,4 % утратили жизнеспособность в процессе культивирования, а 28,6 % остались «условно-годными» и не продолжили дробление. Использование этиленгликоля и глицерина в смеси с сахарозой оказалось благоприятным для бластоцист и позволило после оттаивания получить 23,1 и 50,0 % «условно-годных» и 69,2 и 50,0 % «хороших» эмбрионов, соответственно. После их культивирования половина клеток погибла, 30,0 и 33,4 % остались «условно-годными», а 16,6 и 20,0 % бластоцист продолжили развиваться, соответственно. Пропандиол не оказал криозащитного действия на бластоцисты в процессе витрификации, 100 % клеток после оттаивания погибли.

Таким образом, бластоцисты коров обладают лучшей криорезистентностью по сравнению с более ранними эмбрионами.

Нами проведены исследования по изучению криорезистентности трех стадий бластоцист. Различают раннюю, позднюю и экспандированную бластоцисты. Ранняя бластоциста (Бл I) имеет одинаковую толщину прозрачной оболочки на всем протяжении, четкую дифференциацию клеток трофобласта и эмбриобласта, с хорошо различимой небольшой blastopore, перивителлиновое пространство узкое, прозрачное. У поздней бластоцисты (Бл II) зона пеллюциды утончена, перивителлиновое пространство отсутствует, полость бластоцисты большая, имеет гладкую поверхность, четкую дифференциацию клеток. Поздняя экспандированная бластоциста (ЭБл) отличается наличием большой полости, занимающей все перивителлиновое пространство, клетки трофобласта уплощены, хорошо дифференцированы от эмбриобласта, прозрачная оболочка утончена, растянута.

Изучена устойчивость бластоцист к процедуре замораживания-оттаивания в растворах криопротекторов (таблица 2). Проведены три серии опытов с применением в качестве криопротекторов 1,5М этиленгликоля или 1,4М глицерина с 1М сахарозой и 25 % глицерина в комплексе с 25 % пропандиола. Учитывая отрицательный результат с 1,5М пропандиолом в предыдущих опытах, данный проникающий криопротектор в смеси с сахарозой при криоконсервировании бластоцист не применялся, а использовался в комплексе с глицерином при витрификации. Для заморозки использовались только бластоцисты хорошего качества.

С использованием 1,5М этиленгликоля сверхбыстрым способом заморожено 18 бластоцист, из них после оттаивания количество «нежизнеспособных» Бл I составило 71,4 %, Бл II – 25,0 %; «условно-годных» Бл I – 28,6 %, Бл II – 37,5, ЭБл – 66,7 %; «хороших» Бл I не получено, Бл II – 37,5 %, ЭБл – 33,3 %. Для более достоверной оценки сохранения жизнеспособности «условно-годные» и «хорошие» бластоцисты были поставлены на культивирование в среде ТС-199 в лунках планшета в CO₂-инкубатор. После их культивирования 45,4 % бластоцист оценены «нежизнеспособными», 27,3 % – «условно-годными», из них по 33,3 % Бл II и ЭБл; Бл I «условно-годных» и «хороших» не отмечено. Получено всего 27,3 % «хороших» зародышей на стадии бластоциста от количества поставленных на культивирование, из них Бл II – 16,7 %, ЭБл – 66,7 %. Как показал анализ проведенных исследований, жизнеспособность бластоцист хорошего качества после замораживания-оттаивания сверхбыстрым способом с использованием этиленгликоля в среднем составила 16,7 % от общего количества замороженных зародышей.

Из 12 бластоцист, замороженных в 1,4М глицерине, после оттаивания 60,0 % Бл I оказались «нежизнеспособными», по 20 % – «условно-годными» и «хорошими».

Сохранность Бл II и ЭБл выглядела следующим образом: «нежизнеспособные» – 50,0 и 33,4 %, «условно-годные» и «хорошие» – по 25,0 и 33,3 %, соответственно. После непродолжительного культивирования «условно-годных» и «хороших» бластоцист сохранность их составила 50,0 %. Всего в среднем получено 16,7 % «нежизнеспособных» зародышей от поставленных на культивирование, 50,0 % «условно-годных» и 33,3 % «хороших».

Таким образом, жизнеспособность бластоцист после процедуры замораживания-оттаивания сверхбыстрым способом с применением глицерина составила 16,7 % от общего количества замороженных бластоцист этим способом.

Витрификацию бластоцист проводили после двухступенчатого насыщения в растворе, содержащем 25 % глицерина и 25 % пропандиола. Как и в предыдущих опытах, сохранность Бл I после оттаивания

оказалась низкой: «нежизнеспособных» – 50,0 %, «условно-годных» – 50,0 %. После культивирования последних половина клеток утратила жизнеспособность в начале инкубирования, вторая половина осталась по морфологическим признакам «условно-годной». Несколько лучше выглядели результаты витрификации поздних бластоцист. «Нежизнеспособных» получено 40,0 %, «условно-годных» – 20,0 %, «хороших» – 40,0 %. После культивирования «условно-годных» и «хороших» 33,3% клеток не сохранили жизнеспособность, 33,3 % остались «условно-годными» и 33,4 % оценены как «хорошие». После оттаивания ЭБл «нежизнеспособных» не отмечено, 75,0 % оказались «условно-годными» и 25,0 % – хорошего качества, непродолжительное инкубирование двух последних групп выявило наличие 25,0 % «нежизнеспособных», 50,0 % – «условно-годных» и 25,0 % – «хороших» клеток. Всего в среднем процедура витрификации с применением 25 % глицерина в смеси с 25 % пропандиола позволяет получать 15,4 % жизнеспособных бластоцист от общего количества замороженных.

Заключение. Бластоцисты коров обладают лучшей криорезистентностью по сравнению с более ранними эмбрионами. Сверхбыстрое замораживание и витрификация поздних бластоцист позволяют сохранять их жизнеспособность после оттаивания на уровне 15,4-16,7 %.

Литература

1. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве / под ред. М. В. Зубец, В. П. Буркат. – Киев, 1999. – 702 с.
2. Голубец, Л. В. Биотехнологические аспекты репродукции животньк / Л. В. Голубец – Барановичи : Баранов. укрупн. тип., 2001. – 127 с.
3. Мильхим, В. И. Опыт работы центра при использовании замораживания и кратковременного хранения эмбрионов крупного рогатого скота / В. И. Мельхельм, В. В. Песоцкий //Тез. докл. – 1988. – С. 86.
4. Ковтун, С. И. Современные перспективы использования биотехнологии в воспроизводстве животных = Realizări și perspective în creșterea animalelor / С. И. Ковтун // Materialele simpozionului și în Nific consacrat jubileului de 50 de ani de la fondarea Institutului de Zootehnie și Medicină Veterinară. – Maximovca, 2006. – P. 133-136.
5. Кузьмина, Т. И. Использование маркеров цитоплазматического созревания донорских ооцитов сельскохозяйственных животных в клеточных технологиях репродукции / Т. И. Кузьмина, Х. Торнер, Х. Альм // Современные методы генетики и селекции в животноводстве : материалы междунар. науч. конф. (26-28 июня 2007 г.) / ВНИИГРЖ. – СПб, 2007. – С. 281-286.

(поступила 26.01.2011 г.)