

Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ¹, А.И. ГАНДЖА¹, Т.И. КУЗЬМИНА²,
В.П. СИМОНЕНКО¹, И.В. КИРИЛЛОВА¹, О.П. КУРАК¹,
Н.В. ЖУРИНА¹, М.А. КОВАЛЬЧУК¹

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫХ ООЦИТОВ КОРОВ ПОСЛЕ ВИТРИФИКАЦИИ ФРАГМЕНТОВ ЯИЧНИКОВ И ОВАРИАЛЬНЫХ ФолЛИКУЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМБИНАЦИИ КРИОПРОТЕКТОРОВ

¹РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

²ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
генетики и разведения животных»

Установлено, что витрификация фрагментов яичников и овариальных фолликулов коров позволяет после оттаивания сохранять жизнеспособность 50,0-55,5 % ооцитов и способствует получению после культивирования в 4 мл культуральной среды в течение 24-27 часов с последующим оплодотворением 16,6-27,3 % дробящихся зародышей.

Ключевые слова: яичники, овариальные фолликулы, криопротектор, витрификация.

L.L. LETKEVICH¹, A.I. GANDZHA¹, T.I. KUZMINA², V.P. SIMONENKO¹,
I.V. KIRILLOVA¹, O.P. KURAK¹, N.V. ZHURINA¹, M.A. KOVALCHUK¹

VIABILITY OF UNFROZEN BOVINE OOCYTES AFTER VITRIFICATION OF FRAGMENTS OF OVARIES AND OVARY FOLLICLES USING COMBINATION OF CRYOPROTECTANTS

¹RUE «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus
on Animal Husbandry»

²The All-Russian Research Institute of Genetic and Breeding of Farm Animal

It is determined that vitrification of fragments of bovine ovaries and ovary follicles allows after thawing keeping viability of 50,0-55,5 % of oocytes and contributes to obtaining 16,6-27,3 % developing embryos after culturing in 4 ml of culture medium for 24-27 hours followed by fertilization.

Key words: ovaries, ovary follicles, cryoprotectant, vitrification.

Введение. Для сохранения генофонда в скотоводстве назрела острая необходимость в разработке технологии длительного хранения посредством криоконсервирования яичников, ооцитов и ранних эмбрионов, полученных вне организма. Отработанная технология глубокого замораживания преимплантационных эмбрионов коров, полученных в результате стимуляции суперовуляции фолликулов, предусматривает следующие этапы: насыщение криопротектором, постепенное охла-

ждение, перенос в жидкий азот, оттаивание, выведение криопротектора и отмывание в культуральной среде [1]. Замороженные с соблюдением технического регламента эмбрионы сохраняют жизнеспособность в 60 % случаев, после оттаивания и трансплантации в матку реципиентов обеспечивают приживляемость на уровне 50 % [2]. В то же время разработка метода криоконсервирования ооцит-кумулусных комплексов и яичников коров находится на начальных этапах развития, что обусловлено их морфофункциональными особенностями. Этому вопросу в настоящее время уделяется пристальное внимание, однако решение практических моментов сопряжено с рядом трудностей. Существует несколько подходов к замораживанию ооцитов, в том числе криоконсервирование репродуктивных органов (яичника и сегментов яичника), фолликулов и ооцитов. За последние десять лет намечился прогресс в технологии замораживания гамет и яичников отдельных видов сельскохозяйственных животных. Поэтому именно это направление является наиболее перспективным в плане создания криобанка генетических ресурсов в скотоводстве [3, 4].

В связи с вышесказанным, целью наших исследований явилась оценка жизнеспособности деконсервированных ооцитов после витрификации фрагментов яичников и овариальных фолликулов с использованием комбинации криопротекторов.

Материал и методика исследований. Исследования проведены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» в 2014 году. Яичники получали на Минском мясокомбинате. Перед замораживанием их иссекали на 6-8 фрагментов, которые затем помещали в один из растворов на основе среды ТС-199 или Хенкса с 20 % фетальной сыворотки: I. 1. 40 % этиленгликоль (эт. гл.), 2. 20 % эт. гл. + 20 % диметилсульфоксид (ДМСО); II. 1. 7,5 % эт. гл. + 7,5 % ДМСО, 2. 15 % эт. гл. + 15 % ДМСО; III. 1. 10 % глицерин (гл.) + 15 % пропандиол (пр.), 2. 25 % гл. + 25 % пр.; IV. 1. 15 % гл. + 20 % пр., 2. 25 % гл. + 25 % пр. Хранили в контейнерах в жидком азоте. Витрификацию овариальных фолликулов проводили согласно методике В. Исаченко и Ф. Осташко [5] в нашей модификации. Овариальные фолликулы после оттаивания были разделены на три опытные группы: 1) стандартное культивирование в малом объеме среды с регулярной её заменой; 2) культивирование в большом объеме культуральной среды без помешивания; 3) культивирование в большом объеме культуральной среды с помешиванием. Выделение, созревание ооцитов их оплодотворение и культивирование ранних зародышей проводили в условиях CO₂-инкубатора при 38,5 °С и 5 % CO₂ по общепринятым методикам. Биометрическую обработку проводили об-

щепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Проведён сравнительный анализ ооцитов, выделенных из деконсервированных фрагментов яичников, витрифицированных в композиционных криопротекторах этиленгликоль+ДМСО и глицерин+пропандиол, приготовленных на основе базовых сред Хенкса и ТС-199 (таблица 1).

Таблица 1 – Жизнеспособность ооцитов коров, извлеченных из витрифицированных фрагментов яичников, в условиях варьирования состава криопротекторов (этиленгликоль + ДМСО, глицерин + пропандиол) и базовых сред (Хенкса и ТС-199)

№ п/п	Базовая среда	Криопротектор	Количество ооцитов				Уровень дробления, п-%
			деконсервировано, п	проведен цитогенетический анализ, п-%	созрело до метафазы II, п-%	оплодотворено, п	
1	2	3	4	5	6	7	8
1	ТС-199	1.40% эт.гл.; 2.20% эт.гл. +20% ДМСО	52	16-30,8	8-50,0	35	6-17,1
2	ТС-199	1.7,5% эт.гл.+7,5% ДМСО; 2.15% эт. гл. + 15% ДМСО;	64	12-18,8	5-41,7	52	4-7,7
3	Хенкса	1.40% эт.гл.; 2.20% эт.гл. +20% ДМСО	33	10-30,3	3-30,0	23	2-8,7
4	Хенкса	1.7,5% эт.гл. + 7,5% ДМСО; 2.15% эт.гл. +15% ДМСО	44	11-25,0	4-36,4	33	3-9,1
5	ТС-199	1.10% гл. + 15% пр.; 2.25% гл. + 25% пр.	54	10-18,5	4-40,0	44	5-11,4
6	ТС-199	1.15% гл. + 20% пр.; 2.25% гл. + 25% пр.	36	9-25,0	4-44,4	26	4-15,4

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8
7	Хенкса	1.10% гл. + 15% пр.; 2.25% гл. + 25% пр.	28	8-28,6	2-25,0	20	2-10,0
8	Хенкса	1.15% гл. + 20% пр.; 2.25% гл. + 25% пр.	37	8-21,6	1-12,5	28	3-10,7
Всего:			348	84-24,1	31-36,9	261	29-11,1
в т. ч. ТС-199			206	47-22,8	21-44,7	157	19-12,1
Хенкса			142	37-26,1	10-27,0	104	10-9,6
1.) 1. 40% эт.гл.;							
2. 20% эт.гл.+20% ДМСО			85	26-30,6	11-42,3	58	8-13,8
2.) 1. 7,5% эт.гл.+7,5% ДМСО;							
2. 15% эт.гл.+15% ДМСО			108	23-21,3	9-39,1	85	7-8,2
3.) 1. 10% гл.+15% пр.;							
2. 25%гл.+25% пр.			82	18-21,9	6-33,3	64	7-10,9
4.) 1. 15% гл.+20% пр.;							
2. 25% гл.+25% пр.			73	17-23,3	5-29,4	54	7-13,0

У половины выделенных ооцитов отмечены признаки дегенерации. Большинство дробящихся клеток также было с признаками морфологических повреждений. Самый высокий уровень дробления оплодотворённых ооцитов – 17,1 % – наблюдался при витрификации фрагментов яичников в 20% этиленгликоле + 20% ДМСО с предварительной эквilibрацией в 40% этиленгликоле, базовой средой являлась среда ТС-199 с 20% фетальной сыворотки, количество дегенерированных клеток составило 33,3 %. Проведение цитогенетического исследования 30,8 % гамет, прошедших созреванию в течение 24 часов в условиях CO₂-инкубатора, позволило установить, что 50,0 % клеток сохранили жизнеспособность, так как они возобновили мейоз и созрели до стадии метафаза II. Применение в качестве криопротектора глицерина в композиции с пропандиолом на основе ТС-199 оказалось обнадеживающим.

Результаты исследований показали, что замораживание фрагментов яичников коров методом витрификации с использованием 25 % глицерина + 25 % пропандиола способствует после оттаивания сохранению жизнеспособности и созреванию до стадии метафаза II 44,4 % клеток, что позволяет получать 15,4 % дробящихся зародышей.

Среда Хенкса является, по сути, солевым раствором, в отличие от которой ТС-199 – полноценная питательная среда для культивирова-

ния ранних зародышей вне организма, обогащённая кроме солей аминокислотами, витаминами и энергетическими компонентами. Обе эти среды используются на определённых этапах технологии экстракорпорального оплодотворения ооцитов коров. Уровень созревания ооцитов до стадии метафаза II, извлечённых из фрагментов яичников, замороженных в криопротекторах, на основе ТС-199 составил 44,7 %, а на основе среды Хенкса – 27,0 %; уровень дробления – 12,1 и 9,6 %, а количество дегенерированных клеток – 57,9 и 90,0 %, соответственно. В целом жизнеспособность ооцитов в условиях варьирования состава криопротекторов и базовых сред составила 36,9 %, после созревания и оплодотворения которых получен уровень дробления 11,1 %.

Анализ эффективности композиционных составов криопротекторов для витрификации ооцитов коров позволил установить следующее:

1) криоконсервирование в 20 % этиленгликоле + 20 % ДМСО: жизнеспособность – 42,3 %, уровень дробления – 13,8 %;

2) витрификация в 15 % этиленгликоле + 15 % ДМСО: сохранность ооцитов – 39,1 %, уровень дробления – 8,2 %;

3) замораживание методом витрификации в 25 % глицерине + 25 % пропандиоле: жизнеспособность – 33,3 %, дробящихся клеток – 10,9 %;

4) витрификация в витрифицирующем растворе, содержащем 25 % глицерина + 25 % пропандиола: жизнеспособность – 29,4 %, дробящихся клеток – 13,0 %.

Количество дегенерированных клеток в данных группах составило, соответственно, 37,5 %, 85,7, 71,4 и 85,7 %.

Изучено влияние условий культивирования (время созревания, объём среды) витрифицированных (криопротектор этиленгликоль+ ДМСО) и оттаянных овариальных фолликулов на уровень созревания (метафаза II) и уровень дробления, извлечённых из них и оплодотворённых ооцитов коров (таблица 2).

Как видно из таблицы, культивирование деконсервированных овариальных фолликулов в культуральной среде в условиях CO₂-инкубатора позволяет получать после дисекции 42,5 % ооцитов, пригодных к оплодотворению, а после их оплодотворения – 15,9 % дробящихся зародышей. Культивирование в 4 мл среды с периодическим помешиванием способствует увеличению данных показателей на 13,3 и 10,7 %, соответственно, в сравнении с малым объёмом среды при созревании.

Таблица 2 – Жизнеспособность ооцитов коров извлеченных из витрифицированных (криопротектор этиленгликоль + ДМСО) овариальных фолликулов, в связи с различными условиями созревания после оттаивания (время созревания, объем среды) вне организма

Вариант опыта	Время культивирования, ч	Количество ооцитов				Уровень дробления, п-%	Количество дегенерированных клеток, п-%
		деконсервировано, п	проведен цитогенетический анализ, п-%	созрело до метафазы II, п-%	оплодотворено, п-%		
I	24	16	7-43,8	3-42,9	9-56,2	1-11,1	1-100
	27	12	5-41,7	3-60,0	7-58,3	1-14,3	–
	36	15	8-53,3	1-12,5	7-46,7	–	–
Всего		43	20-46,5	7-35,0	23-53,5	2-8,7	1-50,0
II	24	18	8-44,4	4-50,0	10-55,6	2-20,0	1-50,0
	27	20	9-45,0	5-55,5	11-55,0	3-27,3	2-66,7
	36	14	7-50,0	1-14,3	7-50,0	–	–
Всего		52	24-46,2	10-41,7	28-53,8	5-17,9	3-60,0
III	24	20	8-40,0	4-50,0	12-60,0	3-25,0	1-33,3
	27	22	10-45,5	5-50,0	12-54,5	2-16,6	1-50,0
	36	18	11-61,1	5-45,5	7-38,9	1-14,3	1-100
Всего		60	29-48,3	14-48,3	31-51,7	6-19,4	2-33,3
Итого		155	73-47,1	31-42,5	82-52,9	13-15,9	7-53,8
в т.ч. 24ч		54	23-42,6	11-47,8	31-57,4	6-19,4	3-50,0
27ч		54	24-44,4	13-54,2	30-55,5	6-20,0	3-50,0
36ч		47	26-55,3	7-26,9	21-44,7	1-4,8	1-100

Анализ жизнеспособности ооцитов в зависимости от времени созревания без учёта объёма культуральной среды показал, что созревание в течение 24 часов позволяет получить 26,3 % гамет на стадии метафаза II, 4,0 % с уровнем дегенерации 100,0 %; после 27 часов созревания стадии оплодотворения достигли 60,7 % ооцитов, из них количество повреждённых клеток составило 40,0 %. Увеличение времени созревания гамет до 36 часов не дало положительных результатов, лишь 25,0 % клеток созрело, а начало дробиться лишь 8,0 %. Однако все они оказались с признаками дегенерации. Таким образом, оптимальным является культивирование девитрифицированных овариальных фолликулов коров в течение 27 часов в культуральной среде в условиях CO₂-инкубатора.

Оценена жизнеспособность ооцитов коров по уровню созревания и количеству оплодотворённых клеток, извлечённых из витрифицированных (криопротектор глицерин + пропандиол) овариальных фолликулов (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние условий культивирования витрифицированных (криопротектор глицерин+пропандиол) и оттаянных овариальных фолликулов на уровень созревания и уровень дробления, извлечённых из них и оплодотворённых ооцитов коров

Вариант опыта	Время культивирования, ч	Количество ооцитов:				Уровень дробления, п-%	Количество дегенерированных клеток, п-%
		деконсервировано, п	проведен цитогенетический анализ, п-%	созрело до метафазы II, п-%	оплодотворено, п-%		
I	24	19	8-42,1	2-25,0	11-57,9	1-9,1	1-100
	27	22	8-36,4	4-50,0	14-63,6	1-7,1	1-100
	36	14	7-50,0	2-28,6	7-50,0	–	–
Всего		55	23-41,8	9-39,1	32-58,2	2-6,3	2-100
II	24	15	7-46,7	2-28,6	8-53,3	–	–
	27	20	8-40,0	3-37,5	12-60,0	2-16,7	1-50,0
	36	16	7-43,8	2-28,6	9-56,2	1-11,1	1-100
Всего		51	22-43,1	7-31,8	29-56,9	3-10,3	2-66,7
III	24	10	4-40,0	1-25,0	6-60,0	–	–
	27	14	6-42,9	3-50,2	8-57,1	2-25,0	–
	36	15	6-40,0	1-16,7	9-60,0	1-11,1	1-100
Всего		39	16-41,0	5-31,3	23-59,0	3-13,0	1-33,3
Итого		145	61-42,1	21-34,4	84-57,9	8-9,5	5-62,5
в т.ч. 24ч		47	19-40,4	5-26,3	25-53,2	1-4,0	1-100
27ч		56	22-39,3	10-45,5	34-60,7	5-14,7	2-40,0
36ч		35	20-57,1	5-25,0	25-71,4	2-8,0	2-100

В данном опыте культивирование деконсервированных овариальных фолликулов в культуральной среде в условиях CO₂-инкубатора позволяет получать после дисекции и созревания 34,4 % ооцитов, пригодных к оплодотворению, а после их оплодотворения – 9,5 % дробящихся зародышей. Культивирование в 4 мл среды с периодическим помешиванием способствует увеличению на 6,7 % выхода дробящихся клеток при одинаковом уровне созревания до стадии метафаза II в сравнении с малым объёмом среды при созревании. Анализ жизнеспособности ооцитов в зависимости от времени созревания без учёта объёма культуральной среды показал, что созревание в течение 24 часов позволило получить 47,8 % на стадии метафаза II, 19,4 % дробящихся клеток с уровнем дегенерации 50,0 %; после 27 часов созревания стадии оплодотворения достигли 54,2 % ооцитов, с таким же количеством повреждённых клеток, как и при 24 часовом созревании. Увеличение времени созревания гамет ещё на 12 часов не дало положительных результатов, лишь 26,9 % клеток созрело, а начало дробиться 4,8 %. Таким образом, оптимальным в данном опыте, так же как и в предыдущем, является культивирование девитрифицированных овариальных

фолликулов коров в течение 27 часов в культуральной среде в условиях CO₂-инкубатора.

По результатам исследований, у большей части клеток после замораживания, оттаивания, культивирования и оплодотворения отмечены выраженные признаки повреждений, задержка и остановка в развитии начавших дробиться зародышей вне организма. Несмотря на это наличие ооцитов на стадии метафаза II и делящихся зародышей на соответствующих этапах ЭКО обнадеживает и свидетельствует о перспективности метода и необходимости проведения дальнейших исследований в данном направлении. Необходимо совершенствовать как технологические режимы витрификации и программного регулирования скорости снижения температур до сверхнизких, так и состав криозащитных средств, их комбинации, концентрации, а также скорость насыщения перед криоконсервированием и выведения после оттаивания. Актуальными остаются вопросы поиска новых веществ, защищающих клетки от повреждающего воздействия низких температур, а для гамет не только сохранения жизнеспособности, но и способности возобновлять мейоз и оплодотворяться вне организма с получением зародышей, способных имплантироваться после пересадки в рог матки реципиента.

Заключение. Витрификация фрагментов яичников коров с использованием базовой среды ТС-199 и композиционных криопротекторов 25 % глицерина + 25 % пропандиола или 20 % этиленгликоля + 20 % ДМСО с двухэтапным насыщением способствует после оттаивания сохранению жизнеспособности и созреванию до стадии метафаза II 44,4-50,0 % ооцитов, что позволяет получать после оплодотворения их вне организма 15,4-17,1 % дробящихся зародышей.

Замораживание овариальных фолликулов коров методом витрификации в криопротекторе, содержащем 20 % этиленгликоля + 20 % ДМСО или 25 % глицерина + 25 % пропандиола на основе базовой среды ТС-199 + 20 % фетальной сыворотки с предварительной эквilibрацией в растворе 50 % этиленгликоля или 50 % глицерина, соответственно, культивирование в 4 мл культуральной среды в течение 24-27 часов позволяет получать 50,0-55,5 % ооцитов, пригодных к оплодотворению, и 16,6-27,3 % дробящихся зародышей после оплодотворения.

Литература

1. Приживляемость замороженно-оттаянных эмбрионов крупного рогатого скота в связи с их подготовкой для прямой пересадки реципиентам / А. И. Будевич [и др.] // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2014. – Т. 49, ч. 1. – С. 32-44. – Авт. также : Пайтеров С.Н., Сапсалёв С.А., Кирикович Ю.К., Лукашевич Т.Н., Михедова И.В., Сахончик П.Е., Жданович В.В.

2. Голубец, Л. Репродуктивная технология *in vitro* в промышленном животноводстве: опыт Белоруссии / Л. Голубец ; беседу вела Т. Вишневская // Аграрное обозрение.

– 2014. – № 3(43). – С. 24-28.

3. Development of vitrified matured cattle oocytes after thawing and culture in vitro/ Le Gal [et al.] // Vet. Rec. – 2000. – N 146. – P. 469-471.

4. Развитие доимплантационных эмбрионов *bos taurus* и *sus scrofa domestica*, полученных из девитрифицированных ооцитов / Т. И. Кузьмина [и др.] // Генетика и разведение животных. – С.-П. – Пушкин, 2014. – Вып. 4. – С. 15-19. – Авт. также : Шейко И.П., Ганджа А.И., Брюсов К.П.

5. Исаченко, В. Эффективный метод культивирования витрифицированных фрагментов яичника человека / В. Исаченко, Ф. Осташко, Е. Исаченко // Проблемы репродукции. – 2006. – № 2. – С. 25-29.

(поступила 26.02.2015 г.)

УДК 636.4.082

Н.А. ЛОБАН

МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ МЯСО-ОТКОРМОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ СВИНЕЙ ПО ГЕНУ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 2 (СОМАТОМЕДИНА А) IGF 2⁽ⁱⁿ⁻²⁾

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

В условиях племенных предприятий Республики Беларусь проведено ДНК-типирование плановых пород свиней по гену инсулиноподобного фактора роста 2 (соматомедина А) IGF-2⁽ⁱⁿ⁻²⁾. Установлена положительная и достоверная ассоциация мясо-откормочной продуктивности животных материнских пород (БКБ; БЧП и Й) с генотипами IGF-2^{BB} по отношению к генотипам IGF-2^{AA}. Разработана схема подбора родительских пар, позволяющая повысить откормочную и мясную продуктивность потомства на 2,8-17,4 % (P<0,01; 0,001).

Ключевые слова: ДНК-типирование, ген IGF-2⁽ⁱⁿ⁻²⁾, маркерная селекция, мясо-откормочная продуктивность свиней, методы подбора, отбор.

N.A. LOBAN

METHOD OF INCREASING MEAT AND FATTENING PERFORMANCE OF PIGS BY INSULIN LIKE GROWTH FACTOR 2 GENE (SOMATOMEDIN A) IGF-2⁽ⁱⁿ⁻²⁾

RUE «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus
on Animal Husbandry»

Under the conditions of breeding companies in Belarus DNA typing of plan pig breeds was carried out by insulin-like growth factor 2 gene (somatomedin A) IGF-2⁽ⁱⁿ⁻²⁾. Positive and significant association of meat and fattening performance of maternal breeds of animals (BGW; BBM and Y breeds) was determined for IGF-2^{BB} genotypes related to IGF-2^{AA} genotypes. The scheme of selection of parental pairs was developed, allowing to increase the fattening and meat performance of offspring by 2,8-17,4 % (P <0,01; 0,001).