

Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ¹, А.И. ГАНДЖА¹, Т.И. КУЗЬМИНА²,
В.П. СИМОНЕНКО¹, И.В. КИРИЛЛОВА¹, О.П. КУРАК¹,
Н.В. ЖУРИНА¹, М.А. КОВАЛЬЧУК¹, Е.Д. РАКОВИЧ¹

СОХРАННОСТЬ ДЕВИТРИФИЦИРОВАННЫХ ДОНОРСКИХ ООЦИТОВ КОРОВ ПОСЛЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО СОЗРЕВАНИЯ¹

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

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

Установлено, что предварительное культивирование ооцит-кумулосных комплексов коров в течение 20 часов в количестве 20 штук на 500 мкл среды перед витрификацией в 20 % этиленгликоля + 20 % ДМСО + 20 % фетальной сыворотки в ТС-199 повышает криорезистентность гамет, что проявляется в повышении их жизнеспособности на 3,0-9,2 % после оттаивания и выхода количества, созревших до стадии метафаза II мейоза, клеток – на 3,9-12,5 % по сравнению с контролем.

Ключевые слова: яичники, ооциты, 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,
E.D. RAKOVICH¹

THE DAFTY OF VITRIFIED DONOR BOVINE OOCYTES AFTER PRELIMINARY MATURATION

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

²FSBSI «All-Russian scientific and research institute for genetics and breeding of animals»

It is determined that preliminary culturing of bovine oocyte-cumulus complexes during 20 hours in amount of 20 pcs. per 500 mcl of medium before vitrification in 20 % of ethylene glycol + 20% DMSO + 20% fetal serum in TC-199 increases cryoresistance of gametes, thus increasing their viability by 3.0-9.2% after thawing and output of cells matured prior to meta-phase II of meiosis stage - by 3.9-12.5% compared to the control.

Key words: ovaries, oocytes, cryoprotectant, vitrification.

Введение. Существует несколько подходов к сохранению генетических ресурсов в скотоводстве, одним из которых является криокон-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б14Р-237).

сервирование репродуктивных клеток (спермиев, ооцитов) и тканей (яичника, сегментов яичника, фолликулов) [1, 2, 3, 4]. В этой связи за последние годы значительно возрос интерес к совершенствованию элементов технологии замораживания гамет и тканей яичников отдельных видов сельскохозяйственных животных в плане повышения криотолерантности деконсервированных ооцитов с сохранением потенции к оплодотворяемости и дальнейшему развитию вне организма [3, 4]. В естественных условиях ооциты дозревают обособленно друг от друга в фолликулах. В период одного полового цикла у крупного рогатого скота созревает и овулирует, как правило, одна яйцеклетка. В технологии получения эмбрионов вне организма созревание ооцитов проводят группами, и количество клеток в группах при культивировании, в том числе и деконсервированных ооцитов, играет не последнюю роль наряду с составом питательных сред и временем созревания. Кроме того, изучение жизнеспособности ооцитов, как и эмбрионов, после криоконсервации является наиболее перспективным направлением исследований в плане создания криобанка высокоценных генотипов, редких и исчезающих пород сельскохозяйственных животных [2, 5].

В связи с вышесказанным целью наших исследований явился анализ сохранности девитрифицированных донорских ооцитов коров, прошедших предварительное созревание перед замораживанием.

Материал и методика исследований. Исследования проведены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». Яичники получали на Минском мясокомбинате. Изучена сохранность замороженно-оттаянных донорских ооцитов коров (по количеству клеток, созревших до стадии метафазы II, и уровню дробления вне организма) после витрификации с использованием в качестве криофилика этиленгликоля с диметилсульфоксидом в условиях предварительного созревания перед витрификацией в группах с различным количеством клеток (А-1; Б-5; В-10; Г-20 и Д-30) в течение 20 и 24 часов или без предварительного культивирования в культуральных средах, с последующим созреванием после оттаивания в течение 3; 7 и 27 часов, соответственно. Культивирование проводили в 4-луночных планшетах в 500 мкл среды созревания на основе ТС-199. Оттаивали пайетты, погружая их на 10 сек в водяную баню при 38 °С после предварительной выдержки на воздухе 10 сек. Выведение криофиликтиков осуществляли при участии сахарозы. Последующее дозревание замороженно-оттаянных ооцитов, оплодотворение, оценку уровня дробления проводили по общепринятой методике, как и для свежизвлечённых клеток, в условиях CO₂-инкубатора при 38,5 °С и 5%

СО₂ по общепринятым методикам.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Всего в опыте с этиленгликолем и диметилсульфоксидом заморожено и оттаяно 814 ооцитов, из них 131 клетка использована для проведения цитогенетических исследований (таблица 1). Изучение влияния количества культивируемых ооцитов коров в определённом объёме культуральных сред и продолжительности их мейотического созревания вне организма до и после размораживания позволили установить определённые различия между опытными группами по жизнеспособности гамет. Количество морфологически «нормальных» клеток после размораживания, имеющих неповреждённую прозрачную оболочку, гомогенную и мелкозернистую ооплазму, в среднем по группам составило: 60,8 % в опыте А, 76,5 % в опыте Б, 77,9 % – В, 74,9 % – Г и 66,3 % – в опыте Д. Следует отметить положительное влияние предварительного созревания гамет вне организма на их сохранность после деконсервации: так, инкубация в течение 24 часов позволила получить в опытах А 70,6 %, Б, В и Г – 82,1-84,4 % морфологически «нормальных» ооцитов, пригодных к культивированию и оплодотворению вне организма, а в опыте Д – 67,4 %. Из них созрело до метафазы II после оттаивания и культивирования в течение 3 часов 50,0 % в опытах А, Б, В, 60,0 % – в опыте Г и 41,6 % клеток в опыте Д. Созревание ооцитов перед замораживанием в течение 20 часов способствовало сохранению морфологических структур 68,8 % клеток опыта А, 75,8 % – Б, 80,6 % – В, 78,8 % – Г, 72,2 % – Д. Целостность клеточных структур замороженных свежезвлечённых ооцитов значительно снизилась после оттаивания во всех опытах, их пригодность для ЭКО составила после деконсервации от 44,4 до 71,4 %, достигли стадии метафаза II 25,0-50,0 % клеток.

Как предварительное культивирование перед криоконсервированием, так и его отсутствие, окончательное созревание и оплодотворение одиночных ооцитов не позволили получить дробящиеся зародыши в трёх вариантах опыта. Установлено, что увеличение количества клеток при культивировании в 500 мкл среды под слоем минерального масла до 5-20 единиц способствовало получению 5,1-12,4 % подробившихся клеток в среднем от общего количества поставленных на оплодотворение, а увеличение до 30 клеток в лунке вызвало снижение выхода оплодотворенных яйцеклеток и составило 3,5 %.

Таблица 1 – Жизнеспособность деконсервированных ооцитов коров после витрификации с использованием композиционных криофиллактиков этиленгликоль+ДМСО

| Опыт- ные группы | Количество клеток, п | Время пред- варительного культивиро- вания, ч | Количество кле- ток пригодных для культивиро- вания | | Время куль- тивирования после оттаи- вания, ч | Проведён цитогене- тический анализ, п | Количество клеток | | | |
|------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------|------|------------------------------------------|------|
| | | | п | % | | | Созрело до метафазы II | | Подробилось после оплодо- творения | |
| | | | | | | | п | % | п | % |
| А | 17 | 24 | 12 | 70,6 | 3 | 6 | 3 | 50,0 | - | - |
| | 16 | 20 | 11 | 68,8 | 7 | 5 | 2 | 40,0 | - | - |
| | 18 | 0 | 8 | 44,4 | 27 | 4 | 1 | 25,0 | - | - |
| Итого | 51 | - | 31 | 60,8 | - | 15 | 6 | 40,0 | - | - |
| Б | 28 | 24 | 23 | 82,1 | 3 | 10 | 5 | 50,0 | 1 | 7,1 |
| | 29 | 20 | 22 | 75,8 | 7 | 8 | 3 | 37,5 | 1 | 7,7 |
| | 28 | 0 | 20 | 71,4 | 27 | 8 | 3 | 37,5 | - | - |
| Итого | 85 | - | 65 | 76,5 | - | 26 | 11 | 42,3 | 2 | 5,1 |
| В | 68 | 24 | 56 | 82,4 | 3 | 12 | 6 | 50,0 | 4 | 9,1 |
| | 72 | 20 | 58 | 80,6 | 7 | 10 | 4 | 40,0 | 4 | 8,3 |
| | 55 | 0 | 38 | 69,1 | 27 | 8 | 3 | 37,5 | 2 | 6,7 |
| Итого | 195 | - | 152 | 77,9 | - | 30 | 13 | 43,3 | 10 | 8,2 |
| Г | 77 | 24 | 65 | 84,4 | 3 | 10 | 6 | 60,0 | 10 | 18,2 |
| | 80 | 20 | 63 | 78,8 | 7 | 9 | 4 | 44,4 | 5 | 9,3 |
| | 62 | 0 | 36 | 58,1 | 27 | 8 | 4 | 50,0 | 2 | 7,1 |
| Итого | 219 | - | 164 | 74,9 | - | 27 | 14 | 51,9 | 17 | 12,4 |
| Д | 89 | 24 | 60 | 67,4 | 3 | 12 | 5 | 41,6 | 3 | 6,3 |
| | 90 | 20 | 65 | 72,2 | 7 | 11 | 4 | 36,4 | - | - |
| | 85 | 0 | 50 | 58,8 | 27 | 10 | 3 | 30,0 | 2 | 5,0 |
| Итого | 264 | - | 175 | 66,3 | - | 33 | 12 | 36,4 | 5 | 3,5 |
| Всего | 814 | - | 587 | 72,1 | - | 131 | 56 | 42,7 | 34 | 7,5 |

Как показали результаты исследований, оптимальным является культивирование 20 клеток в 500 мкл среды ТС-199. Такое соотношение обеспечивает достаточное питание и метаболизм, способствующий поддержанию жизнеспособности ооцитов вне организма и криотолерантности при сверхнизких температурах с выходом до 18,2 % дробящихся зародышей после оплодотворения. Одиночное культивирование, как и культивирование в небольших группах по 5 или 10 клеток, а также нахождение 30 ооцитов в одной лунке в 500мкл среды не обеспечивают создание комфортных условий для полноценного созревания и оплодотворения не только деконсервированных, но и интактных ооцитов крупного рогатого скота вне организма.

Цитогенетический анализ подтвердил преимущество предварительного культивирования ооцитов коров перед замораживанием в течение 24 часов по сравнению со свежеизвлечёнными по количеству клеток, пригодных для культивирования, полученных после оттаивания и окончательного культивирования вне организма в течение 3 часов, стадии метафаза II достигли на 20,0-25,0 % больше ооцитов по сравнению с остальными опытами. В этих же экспериментах получено дробящихся зародышей на 3,5-9,9 % больше. Во всех вариантах опыта Д с количеством клеток 30 штук в лунке наметилась тенденция снижения изучаемых показателей: так, сохранность клеток после оттаивания составила 58,8-72,2 %, до стадии метафаза II созрело 30,0-41,6 % клеток, уровень дробления в среднем составил 3,5 %. В опыте А, где были использованы одиночные клетки, при уровне созревания до стадии метафаза II 25,0-50,0 % ооцитов, после совместного инкубирования со спермиями дробящихся клеток не отмечено. Как отмечалось выше, из всех вариантов опыта наилучший результат получен в группе Г при культивировании в одной лунке 20 клеток, сохранность после оттаивания составила 58,1-84,4 %, стадии метафаза II достигло 44,4-60,0 % ооцитов при уровне дробления 7,1-18,2 %.

Таким образом, предварительное культивирование ооциткумулюсных комплексов коров в течение 20 часов в количестве 20 штук на 500 мкл среды перед витрификацией в 20 % этиленгликоля + 20 % ДМСО + 20 % фетальной сыворотки + ТС-199 повышает криорезистентность гамет, что проявляется в повышении их жизнеспособности на 3,0-9,2 % после оттаивания и выхода количества, созревших до стадии метафаза II мейоза, клеток – на 3,9-12,5 % по сравнению с остальными опытными группами. Установлена сохранность деконсервированных ооцитов на уровне 58,1-84,4 %, а созревание – на уровне 44,4-60,0 % с выходом 7,1-18,2 % дробящихся зародышей.

Заключение. Предварительное культивирование ооциткумулюсных комплексов коров в течение 20 часов в количестве 20

штук на 500 мкл среды перед витрификацией в 20 % этиленгликоля + 20 % ДМСО + 20 % фетальной сыворотки + ТС-199 повышает криорезистентность гамет, что проявляется в повышении их жизнеспособности на 3,0-9,2 % после оттаивания и выхода количества, созревших до стадии метафаза II мейоза, клеток – на 3,9-12,5 % по сравнению с остальными опытными группами. Установлена сохранность деконсервированных ооцитов на уровне 58,1-84,4 %, а созревание – на уровне 44,4-60,0 % с выходом 7,1-18,2 % дробящихся зародышей.

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., Сапсалева С.А., Кирикович Ю.К., Лукашевич Т.Н., Михедова И.В., Сахончик П.Е., Жданович В.В.

2. Витрификация донорских ооцитов свиней для интенсификации использования клеточных репродуктивных технологий / Т. И. Кузьмина [и др.] // Научный фактор в стратегии инновационного развития свиноводства : сборник материалов XXII Международной научно-практической конференции (9-11 сентября 2015 г.). – Гродно, 2015. – С. 71-75. – Авт. также : Шейко И.П., Ганджа А.И., Станиславович Т.И.

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. Жизнеспособность деконсервированных ооцитов коров после витрификации фрагментов яичников и овариальных фолликулов с использованием комбинации криопротекторов / Л. Л. Леткевич [и др.] // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2015. – Т. 50, ч. 1. – С. 109-117. – Авт. также : Ганджа А.И., Кузьмина Т.И., Сищенко В.П., Кириллова И.В., Курак О.П., Журина Н.В., Ковальчук М.А.

5. Голубец, Л. Репродуктивная технология in vitro в промышленном животноводстве: опыт Белоруссии / Л. Голубец ; беседа вела Т. Вишневская // Аграрное обозрение. – 2014. – № 3(43). – С. 24-28.

(поступила 15.03.2015 г.)

УДК 636.223.1:636.033

Р.В. ЛОБАН¹, И.С. ПЕТРУШКО¹, С.В. СИДУНОВ¹, В.И. ЛЕТКЕВИЧ¹,
А.А. КОЗЫРЬ¹, Т.Л. ГОЛУБЕНКО²

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АБЕРДИН-АНГУССКОЙ ПОРОДЫ В ЗОНЕ ПРИПЯТСКОГО ПОЛЕСЬЯ

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

²Винницкий национальный аграрный университет

Установлена возможность создания стад мясного скота в зоне Припятского Полесья путём поглотительного скрещивания чёрно-пёстрых коров с быками абердин-ангусской