

А.И. ГАНДЖА¹, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ¹, Т.И. КУЗЬМИНА²,
В.П. СИМОНЕНКО¹, И.В. КИРИЛЛОВА¹, Е.Д. РАКОВИЧ¹,
О.П. КУРАК¹, Н.В. ЖУРИНА¹, М.А. КОВАЛЬЧУК¹,
Л.В. ГЛУЩЕНКО¹, О.В. БУРАКОВА¹

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ И КРИОТОЛЕРАНТНОСТЬ ООЦИТОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ¹

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

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

В результате совместного проведения экспериментов получены новые знания о механизмах криотолерантности ооцитов коров, на основе которых модернизирован способ получения эмбрионов из интраовариально витрифицированных гамет путём использования превентивной ВСВ-диагностики и введения в среду дозревания ооцитов 0,001 % высокодисперсного кремнезёма. Сохранность деконсервированных ооцитов составила 58,1-84,4 %, созревание – 44,4-60,0 % с выходом 7,1-18,2 % дробящихся зародышей, в том числе 5,5 % бластоцист.

Ключевые слова: ооциты, криопротектор, криоконсервирование, культивирование, витрификация, зародыш, криорезистентность.

A.I. GANDZHA¹, L.L. LETKEVICH¹, T.I. KUZMINA², V.P. SIMONENKO¹,
I.V. KIRILLOVA¹, E.D. RAKOVICH¹, O.P. KURAK¹, N.V. ZHURINA¹,
M.A. KOVALCHUK¹, L.V. GLISCHENKO¹, O.V. BURAKOVA¹

CRYOPRESERVATION AND CRYOTOLERANCE OF OOCYTES OF FARM ANIMALS

¹RUE «Scientific and practical center of the National academy of sciences of Belarus
for Animal husbandry»

²FSBRI «All-Russian research institute of genetics and breeding farm animal»

As a result of joint experiments, new knowledge has been obtained on mechanisms of cryotolerance of cow oocytes, on the basis of which the method of obtaining embryos from intraovary vitified gametes has been modernized by using preventive VSV-diagnostics and introducing 0.001 % of highly disperse silica into the oocyte ripening medium. The preservation of thawed oocytes made 58.1-84.4 %, maturation – 44.4-60.0 % with the yield of splitting embryos of 7.1-18.2 %, including 5.5 % of blastocysts.

Keywords: oocytes, cryoprotectant, cryopreservation, cultivation, vitrification, embryo, cryoresistance.

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

Введение. В настоящее время в животноводство многих стран мира активно внедряются клеточные репродуктивные технологии, основанные на использовании донорских ооцитов млекопитающих, их созревании и оплодотворении вне организма [1]. Созревшие *in vitro* клетки широко используются в клонировании в качестве клеток-реципиентов, а зиготы – для получения трансгенных животных, изучения механизмов фолликуло- и эмбриогенеза, оогенеза и раннего развития млекопитающих. Во многих лабораториях мира разработаны системы дозревания ооцитов из яичников животных и их оплодотворения вне организма, однако выход преимплантационных зародышей не превышает 40 % [2]. При этом результаты варьируют в довольно широких пределах, что связано с наличием ограниченного количества биологически полноценных ооцитов [3]. Одной из основных причин, сдерживающих масштабную реализацию возможностей технологии экстракорпорального оплодотворения ооцитов, являются условия хранения боинского материала постоянно выбывающих из технологического цикла высокопродуктивных животных.

В связи с вышесказанным проведены совместные исследования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» с ФГБНУ «Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и разведения животных». Целью наших исследований явилось изучение криотолерантности ооцитов сельскохозяйственных животных после витрификации.

Материал и методика исследований. Яичники получали на мясокомбинате, доставляли в лабораторию в растворе Хенкса. Выделение ооцитов проводили путём надрезания стенок фолликулов и рассечения тканей яичников стерильным лезвием безопасной бритвы в чашке Петри в солевом растворе с добавлением антибиотиков.

Криотолерантность замороженно-оттаянных донорских ооцитов коров изучали после витрификации с использованием композиционного криофиликтика в два этапа (20 % этиленгликоль + 20 % ДМСО) в условиях созревания перед замораживанием в течение 20 и 24 часов и после оттаивания в течение 3, 7 и 27 часов и различного количества клеток в группах. В качестве базовой среды служила среда ТС-199. В сумме созревание деконсервированных ооцитов в условиях *in vitro* длилось 27 часов. Численность ооцитов в одной лунке в опытах составила: А – 1 ооцит, Б – 5 ооцитов, В – 10 ооцитов, Г – 20 ооцитов, Д – 30 ооцитов. Культивирование проводили в 4-луночных планшетах в 500 мкл среды. Оттаивали пайетты путём погружения на 10 сек в водяную баню 38 °С после предварительной выдержки на воздухе 10 сек. Выведение криофиликтиков проводили по схеме с использованием 0,5 М сахарозы. Последующее дозревание замороженно-оттаянных ооци-

тов, оплодотворение, оценку уровня дробления проводили по общепринятой методике, как и для свежеизвлеченных клеток [4]. Уровень сохранности деконсервированных ооцитов определяли по морфологическим характеристикам (целостность и деформация оболочки, повреждение цитоскелета), созреванию до стадии метафаза II мейоза методом цитогенетического анализа и количеству дробящихся клеток.

Изучена криорезистентность соматических клеток фолликула по деструктивным процессам (апоптоз, пикноз) при использовании различных моделей витрификации (интра- и экстраовариальная), а также самих ооцитов с помощью комплекса биомаркеров ядерно-цитоплазматического созревания, показатели которых анализировались с помощью микроскопической техники последнего поколения (ФБГНУ ВНИИГРЖ, ЦКП «Хромас», г. Санкт-Петербург). Проведена модернизация среды дозревания ооцитов за счёт использования 0,001 % высокодисперсного кремнезёма

Результаты эксперимента и их обсуждение. 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 ранних эмбрионов вне организма созревание ооцитов проводят группами, и количество клеток в группах при культивировании играет не последнюю роль наряду с составом питательных сред и временем созревания.

Всего в серии опытов выделено 874 ооцита, из них заморожено методом витрификации, девитрифицировано и поставлено на созревание и оплодотворение 587 клеток, 131 ооцит использован для проведения цитогенетических исследований. Результаты применения этиленгликоля + ДМСО отражены в таблице 1. Изучение влияния количества культивируемых ооцитов коров в определённом объёме культуральных сред и продолжительности их мейотического созревания вне организма до и после размораживания позволило установить определённые различия между опытными группами по жизнеспособности гамет. Количество морфологически «нормальных» клеток, после размораживания имеющих неповрежденную 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 варианте Д. Следует отметить положительное влияние предварительного созревания гамет вне организма на их сохранность после деконсервации. Так, инкубация в течение 24 часов перед замораживанием 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 %. Созревание ооцитов перед

Таблица 5 – Жизнеспособность деконсервированных ооцитов коров после витрификации с использованием композиционных криофлактивов этиленгликоль – ДМСО

Опытные группы (к-во клеток)	Количество клеток, п		Время предварительного культивирования, ч	Количество клеток после витрификации, пригодных для культивирования		Время культивирования после оттаивания, ч	Проведен цитогенетический анализ, п	Количество клеток		Подробилось после оплодотворения
				поставлено на культивирование	снято с культивирования			Созрело до метафазы II		
	п	%						п	%	
А (1)	19	17	24	12	70,6	3	6	3	50,0	-
	17	16	20	11	68,8	7	5	2	40,0	-
	18	18	0	8	44,4	27	4	1	25,0	-
Итого	54	51	-	31	60,8	-	15	6	40,0	-
Б (5)	30	28	24	23	82,1	3	10	5	50,0	1
	30	29	20	22	75,8	7	8	3	37,5	1
	30	28	0	20	71,4	27	8	3	37,5	-
Итого	90	85	-	65	76,5	-	26	11	42,3	2
В (10)	70	68	24	56	82,4	3	12	6	50,0	4
	80	72	20	58	80,6	7	10	4	40,0	4
	60	55	0	38	69,1	27	8	3	37,5	2
Итого	210	195	-	152	77,9	-	30	13	43,3	10
Г (20)	80	77	24	65	84,4	3	10	6	60,0	10
	80	80	20	63	78,8	7	9	4	44,4	5
	80	62	0	36	58,1	27	8	4	50,0	2
Итого	240	219	-	164	74,9	-	27	14	51,9	17
Д (30)	90	89	24	60	67,4	3	12	5	41,6	3
	100	90	20	65	72,2	7	11	4	36,4	-
	90	85	0	50	58,8	27	10	3	30,0	2
Итого	280	264	-	175	66,3	-	33	12	36,4	5
Всего	874	814	-	587	72,1	-	131	56	42,7	34

замораживанием в течение 20 часов способствовало сохранению морфологических структур 68,8 % клеток опыта А, 75,8 % – В, 80,6 % – В, 78,8 % – Г, 72,2 % – Д. Целостность клеточных структур замороженных свежеизвлеченных ооцитов значительно снизилась после оттаивания во всех опытах, их пригодность для ЭКО составила после деконсервации от 44,4 до 71,4 %.

При созревании и оплодотворении одиночных ооцитов, как с предварительным культивированием, так и его отсутствием, не получено дробящихся зародышей во всех трёх вариантах опытов. Установлено, что увеличение количества клеток при культивировании в 500 мкл среды под слоем минерального масла до 5-20 единиц способствовало получению 5,1-18,2 % подробившихся клеток от общего количества поставленных на оплодотворение. Увеличение до 30 клеток в лунке вызвало снижение выхода оплодотворенных яйцеклеток и составило в среднем 3,5 %. Результаты исследований показали, что 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 500 мкл среды не обеспечивают создание комфортных условий для полноценного созревания и оплодотворения деконсервированных 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 5,6-25,0 % больше ооцитов по сравнению с остальными опытами. В этих же экспериментах получено на 3,5-9,9 % больше дробящихся зародышей. Во всех вариантах опыта Д намечалась тенденция снижения изучаемых показателей: так, сохранность клеток после оттаивания составила 58,8-72,2 %, до стадии метафаза II созрело 30,0-41,6 % клеток. В опыте А уровень созревания ооцитов до стадии метафаза II составил 25,0-50,0 %, 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 ооцит-кумулюсных комплексов коров в течение 24 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 сохранении их жизнеспособности после оттаивания на уровне 84,4 %, созревании до стадии метафаза II мейоза 60,0 % клеток с выходом 18,2 % дробящихся зародышей.

На основании анализа показателей криорезистентности соматических клеток фолликула (кумулюс) при использовании различных моделей витрификации (интра- и экстраовариальная) выявлено, что деструктивными процессами (апоптоз, пикноз) затронуты в большей степени кумулюсные клетки ооцитов коров, девитрифицированных интраовариально. Обнаружены видовые различия при использовании различных моделей витрификации ооцит-кумулюсных комплексов, выражающиеся в различиях показателей криорезистентности соматических клеток овариальных фолликулов (степень экспансии кумулюса, уровень апоптозов, пикнозов), что позволяет сделать вывод о более высокой степени криорезистентности соматических клеток фолликула (кумулюса), *Bos Taurus* чем *Sus Scrofa Domesticus* в условиях предложенных нами методов витрификации и докультивирования девитрифицированных ооцитов. Не обнаружено достоверных различий в достижении интра-овариальных и экстра-овариально витрифицированных ооцитов *Bos Taurus* после культивирования стадии метафазы II (49 и 52 %). Напротив, вышеуказанный показатель отличался у ооцитов *Sus Scrofa Domesticus* (33 и 48 %, $P < 0,02$). При оценке функциональной активности клеточных компартментов (митохондрий и структурных элементов цитоскелета – актина) получены нижеследующие результаты: уровень интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTRos (маркера функциональной активности митохондрий) после завершения 24-часового культивирования в нативных ооцитах ($475 \pm 14,3$) *Bos Taurus* превышал таковой в девитрифицированных ооцитах вне зависимости от модели витрификации (экстра-овариальная – $411 \pm 17,8$, $P < 0,05$, интраовариальная – $198 \pm 10,5$, $P < 0,05$, $P < 0,001$), обнаружены достоверные различия в интенсивности флуоресценции в зависимости от модели витрификации ооцитов ($P < 0,001$). При сравнительном анализе показателей функциональной активности митохондрий в нативных и девитрифицированных интра-овариально или экстраовариально свиных ооцитах выявлено резкое снижение интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange в ооцитах, подвергшихся интраовариальной витрификации по сравнению с нативными и девитрифицированными экстраовариально ооцитами (89,4 против 149,2 и 161,0 $P < 0,01$). В нативных ооцитах, завершивших фазу роста *in vivo*,

морфология липидов представлена гранулярной формой, трансформирование липидных гранул в кластеры при культивировании следует расценивать как предиктор последующих деструктивных изменений в ооците. Выявлены достоверные различия в функциональной активности цитоскелета ооцитов исследованных видов животных в зависимости от модели витрификации, интенсивность флуоресценции родамин-фаллоидина в ооцитах *Sus Scrofa Domesticus* и *Bos Taurus*, девитрифицированных интраовариально была значительно ниже, чем в нативных и девитрифицированных экстраовариально ооцитах через 4 часа культивирования. Получены эмбрионы, в том числе и на стадии бластоцисты из интраовариально витрифицированных ооцитов *Sus Scrofa Domesticus* (21 и 5 %) и коров *Bos Taurus* (32 и 6 %) на основе модернизации среды дозревания ооцитов с использованием 0,001 % высокодисперсного кремнезема.

Заключение. Совместное выполнение проекта значительно интенсифицировало выполнение научных исследований за счёт количества используемых в экспериментах животных, повысило информативность полученных данных в результате применения для оценки криорезистентности ооцитов комплекса биомаркеров ядерно-цитоплазматического созревания. В результате совместного проведения эксперимента получены новые знания о механизмах криотолерантности женских гамет крупного рогатого скота, на основе которых модернизирован способ получения эмбрионов коров из интраовариально витрифицированных ооцитов путём использования превентивной ВСВ-диагностики и введения в среду дозревания ооцитов 0,001 % высокодисперсного кремнезема. Выход эмбрионов составил 7,1-18,2 %.

Литература

1. Голубец, Л. Репродуктивная технология *in vitro* в промышленном животноводстве: опыт Белоруссии / Л Голубец ; беседу вела Т. Вишневецкая // Аграрное обозрение. – 2014. – № 3(43). – С. 24-28.
2. 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. – СПб: ВНИИГРЖ, 2007. – С. 281-286.
3. Развитие доимплантационных эмбрионов *bos taurus* и *sus scrofa domesticus*, полученных из девитрифицированных ооцитов / Т. И. Кузьмина [и др.] // Генетика и разведение животных : сб. науч. тр. – СПб-Пушкин, 2014. – Вып. 4. – С. 15-19.
4. Усовершенствованная технология получения ранних зародышей вне организма для ускоренного размножения и сохранения высокоценных животных в скотоводстве : методические рекомендации / А. И. Ганджа [и др.]. – Жодино, 2011 – 35 с.

Поступила 17.03.2017 г.