

О.В. ПАЙТЕРОВА, А.И. БУДЕВИЧ, Л.В. ГОЛУБЕЦ,
С.Н. ПАЙТЕРОВ, Ю.К. КИРИКОВИЧ

ВЛИЯНИЕ ФОРСКОЛИНА В СОСТАВЕ КРИОФИЛАКТИКОВ НА СОХРАННОСТЬ ЗАМОРОЖЕНО-ОТТАЯННЫХ ЭМБРИОНОВ КОРОВ

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

В статье представлены результаты научной работы, целью которой было изучение влияния различных концентраций делипидирующего агента форсколина в составе защитных сред на регенерационную способность заморожено-оттаянных эмбрионов крупного рогатого скота. В ходе исследований установлено повышение криорезистентности заморожено-оттаянных зародышей коров-доноров при использовании защитных сред на основе глицерина, этиленгликоля и диметилсульфоксида с введением в их состав стимулятора липолиза форсколина в концентрации 10 мкМ, позволяющих получить минимальное снижение качества биоматериала (0,36-0,73 балла) и увеличить выход пригодных к трансплантации эмбрионов.

Ключевые слова: криопротектор, криофилактик, зародыш, криоконсервация, биологически активное вещество, форсколин, глицерин, этиленгликоль, диметилсульфоксид

O.V. PAITSERAVA, A.I. BUDEVICH, L.V. GOLUBETS,
S.N. PAITSERAV, U.K. KIRIKOVICH

EFFECT OF FORSKOLIN AS PART OF CRYOPHYLACTICS ON THE VIABILITY OF FROZEN-THAWED COW EMBRYOS

*Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences
of Belarus for Animal Breeding, Zhodino, Republic of Belarus*

This paper contains the results of a scientific work aimed at studying the influence of different concentrations of the delipidating agent forskolin as part of protective media on the regenerative capacity of frozen-thawed cattle embryos. The studies revealed an increase in cryoresistance of frozen-thawed embryos of donor cows when using protective media based on glycerol, ethylene glycol and dimethyl sulfoxide with the introduction of the lipolysis stimulator forskolin at a concentration of 10 μ M, which allows for minimal deterioration in the quality of the biomaterial (0.36-0.73 points) and an increase in the yield of embryos suitable for transplantation.

Key words: cryoprotectant, cryophylactic, embryo, cryopreservation, biologically active substance, forskolin, glycerol, ethylene glycol, dimethyl sulfoxide.

Введение. Внутриклеточные липиды являются структурными элементами плазматических мембран и органелл эмбрионов, входят в состав клеточных сигнальных медиаторов, а также служат одним из основных энергетических источников, способствующих устойчивому росту и развитию эмбрионов вне организма [1]. Вместе с тем имеются данные [2, 3, 4] о повреждающем действии жировой составляющей клетки при её глубоком замораживании.

Одним из возможных способов нивелирования действия указанного негативного фактора на жизнеспособность заморожено-оттаянных зародышей при сверхнизких температурах является трансформирование их липидного содержимого через использование различных биологически активных соединений в составе криозащитных сред [5, 6]. В их числе липолитический агент форсколин, являющийся мощным активатором аденилатциклазы [7]. Его действие на указанный фермент эмбриональных клеток приводит к активации липазы через путь ц-АМФ [8, 9] и далее к частичному снижению содержания внутриклеточных липидов в результате стимулированного расщепления триацилглицеридов, которые гидролизуются до жирных кислот и глицерина. Дополнительное образование глицерина, вероятно, может способствовать повышению устойчивости эмбрионов к криоконсервации, что, в свою очередь, ведёт к росту их восстановительного потенциала после оттаивания.

Целью исследований являлось изучение влияния различных концентраций делипидирующего агента форсколина в составе защитных сред на регенерационную способность заморожено-оттаянных эмбрионов крупного рогатого скота.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в племенных хозяйствах РДУП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского и СПК «Агрокомбинат Снов» Несвижского районов Минской области.

Объектом исследования служили эмбрионы отличного и хорошего качества, полученные от племенных коров-доноров. Перед замораживанием зародыши насыщались криопротекторами, которые служили контролем: 1,4 М раствором глицерина, 1,5 М раствором этиленгликоля, 1,5 М раствором диметилсульфоксида и модифицированными (опыт), в состав которых дополнительно включался форсколин («Sigma-Aldrich», Germany) в концентрации 5, 10 и 25 мкМ. Регенерационный статус деконсервированных эмбрионов определялся под стереомикроскопом с визуальной оценкой их качества.

Результаты исследований и их обсуждение. Данные о качестве оттаянных эмбрионов, замороженных с включением различных концентраций форсколина в криопротекторную среду на основе 1,4 М раствора глицерина, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты морфологической оценки заморожено-оттаянных эмбрионов, подвергнутых криоконсервации с использованием 1,4 М раствора глицерина с форсколином

Показатель		Контроль- ная группа		Опытные группы					
				Форсколин, мкМ					
				5		10		25	
		до заморажива- ния	после оттаивания	до заморажива- ния	после оттаивания	до заморажива- ния	после оттаивания	до заморажива- ния	после оттаивания
Количе- ство эмбрионов	п	9	9	13	13	14	14	13	13
	%	100	100	100	100	100	100	100	100
в том числ по качеству: отличное	п	6	3	8	4	12	7	9	5
	%	66,7	33,3	61,5	30,8	85,7	50,0	69,2	38,5
хорошее	п	3	4	5	6	2	7	4	6
	%	33,3	44,4	38,5	46,2	14,3	50,0	30,8	46,2
удовлетво- рительное	п	-	1	-	2	-	-	-	1
	%	-	11,1	-	15,4	-	-	-	7,7
неудовле- ствитель- ное	п	-	1	-	1	-	-	-	1
	%	-	11,1	-	7,7	-	-	-	7,7
Пригодных к пере- садке	п	9	8	13	12	14	14	13	12
	%	100	88,9	100,0	92,3	100,0	100,0	100,0	92,3
Средний балл		4,67 ±0,17	4,00 ±0,33	4,62 ±0,14	4,0 ±0,25	4,86 ±0,1	4,5 ±0,14	4,69 ±0,13	4,15 ±0,25
Среднее сниже- ние качества эм- брионов после оттаивания		0,67		0,62		0,36		0,54	

Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии липидомодулирующей добавки при замораживании зародышей в комплексе с 1,4 М раствором глицерина. В зависимости от её количества, вводимого в криопротектор, в группе эмбрионов с форсколином установлено преимущество применения делипидирующего агента в концентрации 10 мкМ, которое позволило увеличить на 11,1 п. п., 7,7 и 7,7 п. п. клеток, пригодных для эмбриотрансплантации, на 22,2 п. п., 23,0 и 15,3 п. п. долю биоматериала отличного и хорошего качества, на 8,3 п. п., 8,3 и 2,7 п. п. выход эмбрионов, восстановивших своё первоначальное отличное качество после дефростации, и на 0,31, 0,26 и 0,18 средний показатель снижения жизнеспособности зародышей после оттаивания

по сравнению с контрольной и опытными (5 и 25 мкМ) группами соответственно.

Таким образом, применение комплексной среды на основе глицерина с добавлением делипидирующего агента форсколина в концентрации 10 мкМ способствовало получению 100,0 % пригодных к трансплантации зародышей при выходе 58,3 % эмбрионов отличного качества, сохранивших своё первоначальное развитие после деконсервирования и с минимальным показателем снижения жизнеспособности биоматериала (0,36 балла).

Сохранность оттаянных зародышей, замороженных в 1,5 М растворе этиленгликоля в комплексе с форсколином, представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Качество деконсервированных эмбрионов при комплексном использовании 1,5 М раствора этиленгликоля и форсколина

Показатель		Контрольная группа		Опытные группы					
				Форсколин, мкМ					
				5		10		25	
		до замораживания	после оттаивания	до замораживания	после оттаивания	до замораживания	после оттаивания	до замораживания	после оттаивания
Количество эмбрионов	n	11	11	9	9	19	19	11	11
	%	100	100	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
в том числе по качеству: отличное	n	5	3	5	2	14	8	9	5
	%	45,5	27,3	55,6	22,2	73,7	42,1	81,8	45,5
хорошее	n	6	6	4	5	5	8	2	4
	%	54,5	54,5	44,4	55,6	26,3	42,1	18,2	36,4
удовлетворительное	n	-	1	-	1	-	2	-	1
	%		9,1		11,1		10,5		9,1
неудовлетворительное	n	-	1	-	1	-	1	-	1
	%		9,1		11,1		5,3		9,1
Пригодных к пересадке	n	11	10	9	8	19	18	11	10
	%	100,0	90,9	100,0	88,9	100,0	94,7	100,0	90,9
Средний балл		4,45 ±0,16	4,0 ±0,27	4,56 ±0,18	3,89 ±0,31	4,74 ±0,1	4,21 ±0,2	4,82 ±0,12	4,18 ±0,3
Среднее снижение качества эмбрионов после оттаивания		0,45		0,67		0,53		0,64	

Данные таблицы свидетельствуют о том, что в опытной группе эмбрионов с добавлением форсколина в концентрации 10 мкМ показатель сохранности оттаиваемых зародышей, соответствующих отличному и хорошему качеству, составил 84,2 %, в то время как в контроле он был ниже на 2,4 п. п. (81,8 %). При других концентрациях делипидирующего агента жизнеспособность биоматериала находилась на уровне или была ниже по сравнению с контрольной группой зародышей.

Применение усилителя липолиза форсколина в концентрации 5 мкМ снизило показатель отличного качества зародышей на 5,1 п. п. (22,2 против 27,3 %), однако введение указанной добавки в количествах 10 и 25 мкМ позволило увеличить выход отличных эмбрионов на 14,8 п. п. (42,1 против 27,3 %) и 18,2 п. п. (45,5 против 27,3 %) соответственно. Применение форсколина в сочетании с 1,5 М раствором этиленгликоля в концентрации 5, 10 и 25 мкМ способствовало снижению качества биоматериала на 0,22, 0,08 и 0,19 балла по сравнению с контролем соответственно. Вместе с тем среднее значение сохранности зародышей после оттаивания в группе с содержанием липидомодулятора 10 мкМ в криопротекторе составило 0,53 баллов, что было ниже на 0,08 балла, чем в контроле.

Таким образом, использование форсколина в концентрации 10 мкМ в составе 1,5 М раствора этиленгликоля позволило получить 94,7 % зародышей, пригодных для эмбриотрансплантации, из которых доля клеток отличного и хорошего качества составила 84,2 %, при этом из них свою первоначальную отличную оценку после оттаивания сохранило 57,1 % биоматериала.

Данные результатов морфологической оценки, представленные в таблице 3, свидетельствуют о том, что замораживание зародышей в 1,5 М растворе диметилсульфоксида с добавлением форсколина оказало положительное влияние на показатели их качества после оттаивания.

Введение в защитную среду дополнительного липидомодулирующего компонента в концентрации 10 мкМ привело к увеличению процента зародышей, сохранивших своё отличное качество после оттаивания, на 7,1 п. п. по сравнению с контролем. При этом средний показатель снижения сохранности эмбрионов во всех опытных группах был ниже, чем в контроле (0,9 балла) и составил в зависимости от концентрации форсколина: 5 мкМ – 0,89, 10 мкМ – 0,73 и 25 мкМ – 0,82 балла.

Использование форсколина в концентрации 10 мкМ в составе защитной среды с диметилсульфоксидом способствовало получению 90,9 % зародышей, пригодных для трансплантации реципиентам, с долей отличных и хороших эмбрионов 72,8 %, из которых своё первоначальное отличное качество сохранили 50,0 % клеток со средним показателем

снижения сохранности биоматериала после оттаивания 0,73 балла.

Таблица 3 – Влияние 1,5М раствора диметилсульфоксида с форсколином на сохранность заморожено-оттаянных зародышей коров

Показатель		Контроль- ная группа		Опытные группы					
				Форсколин, мкМ					
				5		10		25	
		до замора- живания	после оттаивания	до замора- живания	после оттаивания	до замора- живания	после оттаивания	до замора- живания	после оттаивания
Количество эмбрионов	n	10	10	9	9	11	11	11	11
	%	100	100	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
в том числе по качеству: отличное	n	7	3	6	2	8	4	7	3
	%	70,0	30,0	66,7	22,2	72,7	36,4	63,6	27,3
хорошее	n	3	4	3	4	3	4	4	5
	%	30,0	40,0	33,3	44,4	27,3	36,4	36,4	45,5
удовлетворительное	n	-	1	-	1	-	2	-	1
	%	-	10,0	-	11,1	-	18,2	-	9,1
неудовлетворительное	n	-	2	-	2	-	1	-	2
	%	-	20,0	-	22,2	-	9,1	-	18,2
Пригодных к пересадке	n	10	8	9	7	11	10	11	9
	%	100	80,0	100,0	77,8	100,0	90,9	100,0	81,8
Средний балл		4,7 ±0,1 5	3,8 ±0,3 6	4,67 ±0,1 7	3,78 ±0,3 8	4,73 ±0,1 4	4,0 ±0,3	4,64 ±0,1 5	3,82 ±0,3 3
Среднее снижение качества эмбрионов после оттаивания		0,9		0,89		0,73		0,82	

Закключение. 1. Установлено положительное влияние делипидирующей добавки форсколина в концентрации 10 мкМ в составе криозащитных сред на основе глицерина, этиленгликоля и диметилсульфоксида на криорезистентность заморожено-оттаянных зародышей коров-доноров, выразившееся в повышении выхода пригодных для трансплантации эмбрионов на 11,1, 3,8 и 10,9 п. п. по сравнению с контрольной группой соответственно.

2. Изучение липолитического агента форсколина с содержанием 25мкМ в средах не привело к ожидаемому повышению сохранности эмбрионов после оттаивания. В этой связи целесообразно проведение

дальнейших исследований в направлении снижения концентрации указанного компонента при замораживании зародышей крупного рогатого скота.

Литература

1. Effects of forskolin on cryopreservation and embryo development in the domestic cat / T. Rakhmanova, V. Mokrousova, S. Okotrub [et al.] // *Theriogenology*. – 2023. – Vol. 210(3). – P. 192-198. – DOI: 10.1016/j.theriogenology.2023.07.035.
2. Van Meer, G. Membrane lipids: where they are and how they behave / G. Van Meer, D. Voelker, G. Feigenson // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008 – Vol. 9(2). – P. 112-124. – DOI: 10.1038/nrm2330.
3. Quinn, P. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes / P. A. Quinn // *Cryobiology*. – 1985. – Vol. 22(2). – P. 128–146. – DOI: 10.1016/0011-2240(85)90167-1.
4. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes / Y. Ghetler, Y. Saar, S. Ruth, A. Amir // *Human Reproduction*. – 2005. – Vol. 20(12). – P. 3385–3389. – DOI: 10.1093/humrep/dei236. Epub 2005 Jul 29.
5. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipidation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis / H. Men, Y. Agca, L. K. Riley, J. K. Critser // *Theriogenology*. – 2006. – Vol. 66(8). – P. 2008-2016. – DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.05.018.
6. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes / J. Galiguis, M. C. Gómez, S. P. Leibo, C. E. Pope // *Cryobiology*. – 2014. – Vol. 68(3). – P. 459-466.
7. Seamon, K. B. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes in intact cells / K. B. Seamon, W. Padgett, J. W. Daly // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1981. – Vol. 78. – P. 3363–3367. – DOI: 10.1073/pnas.78.6.3363.
8. Honnor, R. C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. II. Definition of steady-state relationship with lipolytic and antilipolytic modulators / R. C. Honnor, G. S. Dhillon, C. Londos // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 260. – P. 15130–15138.
9. Stralfors P, Belfrage P. Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1983; 258:15146–15152. – DOI: [10.1016/S0021-9258\(17\)43785-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)43785-9)

Поступила 3.03.2025 г.

УДК 636.1.082.12 (476)

А.Н. РУДАК, Ю.И. ГЕРМАН, А.И. ГЕРМАН, Д.О. КАЗЬМИН

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ ГЕНОФОНДНЫХ ПОРОД ЛОШАДЕЙ, РАЗВОДИМЫХ В БЕЛАРУСИ

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

В настоящее время сегодняшний день проблема сохранения генетических ресурсов домашних животных стала одной из самых актуальных в мире. В связи