

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

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ООЦИТОВ КОРОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЯИЧНИКОВ

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

Введение. В последние годы в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота всё более широкое применение находят такие биотехнологические методы, как трансплантация эмбрионов и получение ранних зародышей вне организма. В перспективе использование этих методов в практике рассматривается как основа ускоренного воспроизводства высокопродуктивных животных, способствующая увеличению темпов селекции в скотоводстве.

Несмотря на то, что элементы технологии получения ранних зародышей вне организма достаточно хорошо отработаны, выход преимплантационных эмбрионов на современном этапе не превышает 18 % и не отличается стабильностью [1, 2]. Поэтому основные этапы технологии, как в практическом, так и в научном плане, требуют дальнейшего изучения и совершенствования.

Кроме того, из-за территориальной удалённости, низкой эффективности способов кратковременного хранения биоматериала, ограниченной возможности производственных мощностей лаборатории по получению ранних эмбрионов вне организма большая часть потенциально запаса репродуктивных клеток высокопродуктивных животных не используется в селекционном процессе [3]. Для решения этого вопроса необходима разработка способов длительного хранения биологического материала в глубоководном состоянии. В этом плане перспективным направлением является криоконсервирование яичников, ооцит-кумулюсных комплексов и ранних зародышей, полученных вне организма, что позволит не только спланировать график работы, но и создать банк генетического материала высокопродуктивных животных и исчезающих пород крупного рогатого скота, осуществлять транспортировку на дальние расстояния. Создание криобанка яичников, ооцитов, зигот и эмбрионов путём их глубокого замораживания в жидком азоте при температуре -196°C является на современном этапе одним из приоритетных и перспективных методов сохранения генетических ресурсов пород сельскохозяйственных животных [4, 5, 6]. Если технология глубокого замораживания эмбрионов отработана хотя бы частично, то криоконсервирование ооцит-кумулюсных комплексов и яични-

ков коров находится на начальных этапах развития, что обусловлено их морфофункциональными особенностями. Вопросами криоконсервирования яичников в мире практически никто не занимается, хотя именно это направление является наиболее перспективным в плане создания криобанка генетических ресурсов в скотоводстве [7].

Поэтому выбор эффективных криозащитных сред, поиск оптимальных режимов замораживания яичников, которые обеспечивают постепенное дообезвоживание клеток и подготовку их к переносу в жидкий азот, а также выбор оптимального режима оттаивания являются необходимым условием их длительного хранения.

Целью работы стало изучение жизнеспособности ооцитов коров вне организма, полученных из деконсервированных яичников.

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

Объектом исследований служили яичники убитых на мясокомбинате коров, выбракованных по различным причинам. Яичники получали на Минском мясокомбинате и в убойном цехе экспериментальной базы «Жодино» после убоя животного путём отсекания от матки с помощью ножниц. Доставляли материал в лабораторию в стерильном солевом растворе Хенкса с добавлением 200 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина в бытовом термосе при 25°C. Перед замораживанием яичники дважды промывали раствором Хенкса с добавлением антибиотиков, замораживали и хранили при -18°C в морозильной камере бытового холодильника, -80°C в камере низкотемпературного морозильника «NBS» (Англия) J 410-86 или при -196°C в жидком азоте без использования программных замораживателей несколькими способами: 1) в течение 5 минут охлаждали до +4°C и сразу же помещали в морозильную камеру -18°C, -80°C, или в жидкий азот без использования криопротектора; 2) на первом этапе при +25°C помещали яичники в 0,7М раствор глицерина на 10 минут, на втором этапе – на 10 минут в 1,4М раствор глицерина и затем помещали в морозильную камеру при -80°C; 3) на первом этапе яичники находились в 0,7М растворе глицерина 10 минут, на втором – в 0,7М растворе глицерина + 0,7М растворе сахарозы и после этого переносились в морозильную камеру при температуре -80°C на хранение.

При оттаивании использовали 0,2М, 0,25М или 0,3М растворы сахарозы на 20%-ной сыворотке, в некоторых случаях использовали вместе 0,7М сахарозу и 0,7М глицерин. После извлечения из морозильной камеры пакет вскрывался, и яичники помещали в один из указанных растворов с температурой среды +10, +20, +27, +37°C. После оттаивания в одном из растворов криопротектора яичники помещались

в 20%-ный раствор сыворотки для окончательного вывода криофиликтика. Все дальнейшие манипуляции с яичниками (извлечение ооцитов, созревание, оплодотворение) проводили по методике, разработанной для свежеполученных яичников. При разработке режима замораживания, хранения и оттаивания яичников коров учитывали следующие показатели: сохранность ооцит-кумулюсных комплексов по состоянию ооплазмы, кумулюсных слоёв и целостности оболочки; оплодотворяемость ооцитов вне организма по уровню дробления, количеству дегенерированных клеток. Морфологическую оценку ооцит-кумулюсных комплексов проводили визуально под микроскопами при увеличении в 56 раз.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Отличительной особенностью в технологии криоконсервирования яичников является наличие большого количества разнородных клеток, различающихся строением и функцией. Кроме половых клеток, находящихся в разной стадии оогенеза и расположенных в фолликулах коркового слоя, основную часть яичника занимает строма, состоящая из плотной соединительной ткани, гладких мышечных волокон, интерстициальных и эпителиальных клеток. Яичник также богат сосудами и нервами. В этой связи криоконсервирование яичников до настоящего времени представляет большие трудности. Показателем выживаемости ооцитов после криоконсервирования яичников служат интактная *zone pellucida* и клеточная мембрана, нормальные размеры периветтилинового пространства, отсутствие подтекания цитоплазмы и деформации ооцита.

В своих исследованиях критерием жизнеспособности ооцитов, извлечённых из деконсервированных яичников, мы избрали уровень дробления оплодотворённых яйцеклеток, так как у большинства извлечённых клеток наблюдалась интактная зона пеллюцида, клеточная мембрана без видимых признаков деформации и подтекания цитоплазмы. Следует отметить, что общее количество ооцитов, извлечённых из деконсервированных яичников, было в 2-4 раза меньше, чем из свежеполученных. По-видимому, перепады температур приводят к разрыву оболочек у более половины ооцитов во время процедуры замораживания-оттаивания. Для культивирования отбирали ооциты с клетками кумулюса без разрыва оболочек. Нами оттаяно 30 яичников, хранящихся в камере бытового морозильника при -18°C . Заморожены они были без криопротектора. Режимы деконсервации яичников и жизнеспособность ооцитов представлены в таблице 1.

Всего выделено 150 ооцитов, из них получено 12 дробящихся клеток, или 8,0 %. У половины выделенных ооцитов отмечены признаки дегенерации. Большинство дробящихся клеток так же были с видимыми признаками дегенерации. Самый высокий уровень дробления (15,6%) наблюдался при деконсервации яичников в 0,3М сахарозе при

+20°C, 10 мин, а затем в 20%-ной эстральной сыворотке при +27°C, 10 мин. В этих же чашках Петри хорошо развился монослой кумулюсных клеток, выделенный из этих же яйчников, что является хорошим признаком. Одинаковое количество дробящихся клеток получено при деконсервации яйчников в 20%-ной эстральной сыворотке при +37°C, 10 мин – 8,3 % и в 0,25М сахарозе при оттаивании со скоростью 1°C в мин в течение 20 мин на первом этапе, а затем на втором этапе в 20%-ной эстральной сыворотке при +22°C, 10 мин – 8,5 %.

Таблица 1 – Жизнеспособность ооцитов, полученных из деконсервированных яйчников, хранящихся при -18°C

№ п/п	Режимы деконсервации	Количество ооцитов, п	Уровень дробления, п-%	Количество дегенерированных, п-%
1	1) 0,3М сахароза, +37°C, 10 мин; 2) 20%-ная эстральная сыворотка, +37°C, 10 мин	22	–	–
2	1) 0,2М сахароза, +27°C, 10 мин; 2) 20%-ная эстральная сыворотка, +27°C, 10 мин	24	1–4,2	1–4,2
3	20%-ная эстральная сыворотка, +37°C, 10 мин	12	1–8,3	1–8,3
4	1) 0,2М сахароза, +20°C, 10 мин; 2) 20%-ная эстральная сыворотка, +37°C, 10 мин	18	–	–
5	1) 0,3М сахароза, +20°C, 10 мин; 2) 20%-ная эстральная сыворотка, +27°C, 10 мин	32	5–15,6 образовался монослой	1–20,0
6	1) 0,25М сахароза, 20 мин от +2 до +22°C; 2) 20%-ная эстральная сыворотка, +22°C, 10 мин	59	5–8,5	1–20,0
Всего		150	12–8%	4–33,3

Режимы подготовки к криоконсервированию и деконсервации яйчников, хранящихся при -80°C, и сохранность извлечённых ооцитов представлены в таблице 2.

Всего оттаяно 25 яйчников. Выделено и поставлено на созревание 111 ооцитов, из них 14, или 12,6 %, начали дробиться. У большинства

дробящихся клеток наблюдались признаки дегенерации.

Таблица 2 – Жизнеспособность ооцитов, полученных из деконсервированных яичников, хранящихся при -80°C.

№ п/п	Режим подготовки к криоконсервированию	Режим деконсервации	Количество ооцитов, п	Уровень дробления, п-%	Количество дегенерированных, п-%
1	1) 0,7М гл, + 27°C, 10 мин; 2) 1,4М гл, + 27°C, 10 мин;	1) 0,7М гл + 0,2М сах., + 20°C, 5 мин; 2) 0,2М сах., +27°C, 5 мин; 3) 20% э. с., +37°C, 10 мин	12	–	–
2	1) 0,7М гл, + 27°C, 10 мин; 2) 1,4М гл, + 27°C, 10 мин;	1) 0,7М гл. + 0,3 сах., 27°C, 10 мин; 2) 0,3М сах., +27°C, 10 мин; 3) 20%-ная э. с. + 27°C, 10 мин	22	4–18,2 образовался монослой	–
3	–	1) 0,3М сах., + 10°C, 10 мин; 2) 20%-ная э. с., +21°C, 10 мин	30	3–10,0 образовался монослой	–
4	0,7М сах, + 0,7М гл, + 27°C, 10 мин	1) 0,2М сах, + 10°C, 10 мин; 2) 20%-ная э. с., + 21°C, 10 мин	26	2–7,7	2–7,7
5	–	1) 0,3М сах., + 10°C, 7 мин; 2) 0,2М сах., + 22°C, 7 мин; 3) 20%-ная э. с., + 22°C, 10 мин	21	5–23,8	4–80,0
Всего			111	14–12,6	9–64,0

Использование криопротектора при подготовке к криоконсервированию не отразилось на выходе зигот и образовании жизнеспособного монослоя кумулюсных клеток. Наиболее перспективными оказались опыт с использованием криопротектора глицерина перед заморозкой в два этапа: 1) 0,7М глицерин, +27°C, 10 мин; 2) 1,4М глицерин, +27°C, 10 мин и при оттаивании в три этапа: 1) 0,7М глицерин + 0,3М сахаро-

за, +27°C, 10 мин; 2) 0,3М сахароза, +27°C, 10 мин; 3) 20%-ная эстральная сыворотка, +27°C, 10 мин. В этом случае уровень дробления составил 18,2 %, и все клетки были практически без видимых признаков дегенерации по морфологическим признакам, наблюдалось так же образование хорошего монослоя кумулюсных клеток. Положительный результат по уровню дробления отмечен в опыте без предварительного использования криопротектора при замораживании яичников с применением криофиллактов в три этапа: 1) 0,3М сахарозы, +10°C, 7 мин; 2) 0,2М сахарозы, +22°C, 7 мин; 3) 20%-ная эстральная сыворотка, +22°C, 10 мин. Уровень дробления составил 23,8 %, хотя 80 % клеток оказалось деформированными.

Проведён опыт по использованию соматических клеток оттаянного яичника для получения монослоя в системе созревания ооцит-кумулюсных комплексов и культивирования ранних зародышей. Яичник хранился при температуре -80°C. Методом аспирации жидкости из фолликулов размером 3-6 мм в диаметре получили клетки гранулезы, которые затем трёхкратно центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об./мин в среде для созревания на основе ТС-199. Полученные клетки для образования монослоя высевали в чашки для культивирования, содержащие питательную среду ТС-199.

Через 12 суток сформировался жизнеспособный монослой клеток гранулёзы. На этот монослой посадили 24 свежеизвлечённых ооцит-кумулюсных комплекса (таблица 3).

Таблица 3 – Эффективность использования заморожено-оттаянной гранулёзы в технологии *in vitro*

Группа	Оплодотворено ооцитов, n	Уровень дробления, n-%	Выход морул, n-%
Опыт	24	11–45,8	5–20,8
Контроль	23	12–52,2	4–17,4

Из 24 ооцит-кумулюсных комплексов 11 клеток, или 45,8 %, вступили в стадию деления-дробления, получено 5 морул, что составило 20,8 % от общего количества поставленных на культивирование. В контроле выход преимплантационных эмбрионов составил 17,4 %.

Таким образом, заморожено-оттаянные яичники могут быть использованы в технологии получения ранних эмбрионов вне организма для получения монослоя клеток гранулезы, что позволит сократить дополнительные затраты на доставку предварительного материала и спланировать научно-исследовательскую работу.

Хранение яичников при температуре жидкого азота (-196°C) не дало положительных результатов. Наличие 0,7М, 1,4М глицерина или

его отсутствие, исходная температура среды при деконсервации не повлияли на жизнеспособность ооцит-кумулюсных комплексов. Слишком низкая температура объёмного исходного материала не позволяет быстро провести оттаивание или хотя бы достигнуть положительной температуры в короткий промежуток времени.

Оптимальным режимом криоконсервирования и хранения в жидком азоте является метод витрификации фрагментов яичников с использованием 1,5М пропандиола. В таком состоянии яичники могут храниться несколько лет. Однако необходимо отработать режимы деконсервации.

Таким образом, несмотря на то, что хранение при температуре -196°C является наиболее перспективным и надёжным способом длительного хранения биоматериала в криобиологии, режимы замораживания и оттаивания яичников коров требуют тщательной доработки и остаются проблематичными в настоящее время. Исследования в этом направлении необходимо продолжать. Необходимо так же создавать криобанк яичников выдающихся животных, выбракованных по технологическим причинам. Успехи криобиологии последних десятилетий обнадеживают в плане отработки оптимальных режимов криоконсервирования и деконсервирования различных видов тканей и клеток. Это позволит уже в ближайшее время использовать ценный генетический материал в животноводстве.

Заключение. Разработаны режимы замораживания и хранения яичников коров при -18°C. Криоконсервирование без криопротектора, хранение при -18°C до 6-ти месяцев, деконсервация в 0,3М сахарозе в два этапа при +20°C позволяет получать 15,6 % дробящихся клеток. Разработаны режимы замораживания и хранения яичников коров при температуре -80°C. Криоконсервирование в 1,4М глицерине в два этапа, хранение до двух лет, оттаивание с использованием 0,3М сахарозы в три этапа способствует сохранению жизнеспособности и оплодотворяемости у 18,2 % клеток. Отсутствие криофилактика при подготовке к криоконсервированию и оттаивание в три этапа в 0,3М сахарозе позволяет получить 23,8 % дробящихся клеток, хотя 80 % из них деформированы.

Оптимальным режимом криоконсервирования и хранения в жидком азоте является метод витрификации фрагментов яичников с использованием 1,5М пропандиола. В таком состоянии яичники могут храниться несколько лет. Однако необходимо отработать режимы деконсервации. Заморожено-оттаянные яичники могут быть использованы в технологии получения ранних эмбрионов вне организма для получения монослоя клеток гранулезы, что позволит сократить дополнительные затраты на доставку предварительного материала и спланировать научно-исследовательскую работу.

Литература

1. Мильхим, В. И. Опыт работы центра при использовании замораживания и кратковременного хранения эмбрионов крупного рогатого скота / В. И. Мильхим, В. В. Песоцкий // Тез. докл. – М., 1988. – С. 86.
2. Нетеча, В. И. Современная технология криоконсервации эмбрионам / В. И. Нетеча // Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных : сб. науч. тр. – М., 1988. – С. 81-83.
3. Голубец, Л. В. Биотехнологические аспекты репродукции животных / Л. В. Голубец. – Барановичи : Баранов. укрупн. тип., 2001. – 230 с.
4. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве / под ред. М. В. Зубец, В. П. Бурковой. – Киев, 1999. – 730 с.
5. Lie, J. M. The post-thaw development capacity of frozen bovine oocytes following in vitro maturation and fertilization / J. M. Lie, Y. Furui, H. Ono // Theriogenology. – 1991. – Vol. 35, № 6. – P. 1225-1235.
6. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro / A. C. Schroeder [et al.] // J. Reprod. Fert. – 1990. – Vol. 89. – P. 43-50.
7. Марселла, Т. Влияние концентрации сахарозы на морфологические характеристики ткани яичников после процедуры криоконсервации / Т. Марселла // Проблемы репродукции. – 2008. – Т. 14, № 2. – С. 100.

(поступила 27.02.2009 г.)

УДК 636.4.082.12.

Н.А. ЛОБАН, О.Я. ВАСИЛЮК, А.С. ЧЕРНОВ

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ГЕНЕАЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛОРУССКОЙ КРУПНОЙ БЕЛОЙ ПОРОДЫ СВИНЕЙ

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

Введение. Итогом целенаправленной селекционной работы на протяжении 1975-2006 гг. явилось создание белорусской крупной белой породы свиней. Свиньи белорусской крупной белой породы характеризуются крепкой конституцией и облегчённым типом телосложения, высокой естественной резистентностью организма, приспособленностью к региональным условиям и технологии разведения, стрессустойчивостью и высокими эксплуатационными качествами при промышленном производстве свинины. При чистопородном разведении они превосходят стандарт класса «элита»: по многоплодию – на 7,7 %, возрасту достижения живой массы 100 кг – на 3,7 %, среднесуточным приростам живой массы – на 12,1 %, расходу корма на 1 кг прироста – на 13,6 %, толщине шпика – на 17,4 %, массе задней трети полутуши – на 10 %. Белорусская крупная белая порода свиней с высокой эффективностью используется в промышленном скрещивании с животными