

3. Установлено, что средний показатель передачи гена по лактоферрину человека потомству был на уровне 26,8 %, при этом от Лака-1 трансмиссия рекомбинантной ДНК приплоду составила 30,6 %, а от Лака-2 – 22,7 %. Следует отметить диспропорциональность в рождении самок и самцов от Лака-2 – 20,0 и 80,0 %, соответственно, при этом от Лака-1 количество родившегося приплода, разделенного по половому признаку, оказалось практически равным (45,5 и 54,5 %, соответственно).

Литература

1. Эрнст, Л. Использование биотехнологии в практике животноводства / Л. Эрнст // Главный зоотехник. – 2008. – № 2. – С. 19-21.
2. Шихов, И. Я. Структурные изменения в молочной железе трансгенных по химозину овец / И. Я. Шихов // ДНК-технологии в клеточной инженерии и маркировании признаков сельскохозяйственных животных : сб. тр. Междунар. конф. (ВИЖ, 12 нояб. 2001 г.). – Дубровицы, 2001. – С. 98-100.
3. Калмыков, С. П. Биологические и продуктивные особенности овец, трансгенных по гену химозина : автореф. дисс. ... канд. биол. наук : 03. 00. 023 / Калмыков С.П. – Горки Ленинские, 2008. – 22 с.
4. Юткин, Е. В. Получение трансгенных коз и изучение фенотипических показателей у трансгенных овец с геном α_1 -казеин- химозина : автореф. дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.023 / Юткин Е.В. – Горки Ленинские, 1999. – 29 с.
5. Production and processing of milk from transgenic goat expressing human lysozyme in the mammary gland / E. A. Maga [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2006. – Vol. 89. – P. 518-524.
6. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goat and analysis of expression / K. M. Ebert [et al.] // Biotechnol. – 1991. – Vol. 9. – P. 835-838.

(поступила 16.03.2010 г.)

УДК 636.2.034.612.602

А.И. ГАНДЖА¹, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ¹, В.П. СИМОНЕНКО¹,
Е.С. ЛОБАНОК², В.П. НИКОЛЬСКАЯ²

СОХРАННОСТЬ И МЕТАБОЛИЗМ ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫХ ООЦИТОВ И РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ КОРОВ

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

²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной
академии наук Беларуси»

Введение. Крיוконсервация гамет и эмбрионов при низких температурах (-196°C) является основным методом сохранения генетическо-

го фонда млекопитающих и играет огромную роль в племенном разведении сельскохозяйственных животных.

Создание криобанка ооцитов, зигот и эмбрионов, полученных *in vitro*, – наиболее перспективное направление исследований на современном этапе развития технологии получения эмбрионов вне организма, направленное на сохранение и планомерное использование генетических резервов сельскохозяйственных животных. Однако если криоконсервирование эмбрионов крупного рогатого скота за сравнительно короткий промежуток времени получило мировое признание и с успехом используется в животноводстве, то эффективность криоконсервации ооцитов не столь результативно [1].

На структурное и функциональное состояние ооцитов и эмбрионов после криоконсервации, изменение клеточного объема, ионного гомеостаза, активности ферментных комплексов влияют выбор криопротектора, его концентрация, продолжительность и температура экспозиции [2, 3]. При этом изменения в митохондриях в процессе криоконсервации могут быть одной из главных причин снижения жизнеспособности размороженных ооцитов и получаемых из них при оплодотворении *in vitro* эмбрионов. Поэтому по состоянию митохондрий, их трансмембранному потенциалу, интенсивности синтеза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и ее внутриклеточному содержанию в ооцитах и эмбрионах можно судить о выраженности и характере происходящих в них изменениях при замораживании-оттаивании [4].

В связи с вышесказанным, целью наших исследований явилось изучение сохранности и метаболизма деконсервированных ооцитов и ранних зародышей коров, полученных вне организма.

Материал и методика исследований. Яичники получали на Минском мясокомбинате и в убойном цехе экспериментальной базы «Жодино» Смолевичского района Минской области после убоя животного, отсекая их от матки с помощью ножниц. Извлечение ооцитов проводили путем рассечения ткани яичников лезвием безопасной бритвы в растворе Хенкса.

Для дальнейшей работы отбирали клетки с многослойным, компактным или слегка разрыхлённым кумулюсом, плотно прилегающим к зоне пеллюцида, мелкозернистой или имеющей небольшие участки гранулярной конденсации ооплазмы, заполняющей прозрачную оболочку, которая равномерна по толщине, не имеет никаких дефектов, округлая по форме. Перед замораживанием ооцит-кумуляусные комплексы разделили на две группы. Одну группу ооцитов подвергли криоконсервированию сразу после выделения, а другую после предварительного созревания в CO_2 -инкубаторе при $38,5^\circ\text{C}$ с максимальной влажностью (98 %) и присутствии в воздухе 5 % CO_2 под слоем минерального масла в течении 20 часов.

Для криоконсервирования ооцит-кумулюсных комплексов и зародышей на разных стадиях развития использовали специальный программный замораживатель Cryocell 1200 в 4 этапа.

Замораживание проводили по трем схемам:

I – клетки обрабатывали эквilibрационным раствором, состоящим из 10 % глицерина и 10 % пропандиола, а затем переносили в витрификационный раствор из смеси 25 % глицерина с 25 % пропандиола;

II – насыщение проводили в 1,4М растворе глицерина в три этапа;

III – в качестве криопротектора использовали 1,5М этиленгликоль в три этапа по возрастающей концентрации.

Оттаивание производили двумя способами:

– пайетту с ооцит-кумулюсными клетками помещали в водяную баню на 1 минуту (+ 25°C). Затем клетки переносили в 1М сахарозу на 5 минут, после чего промывали по 2 минуты в четырех сменах 20%-ной фетальной бычьей сыворотки (FBS).

– замороженную пайетту 10 секунд держали на воздухе, затем на 10 секунд помещали в водяную баню (+25°C). После извлечения клеток их помещали в 0,7М глицерин или 0,75М этиленгликоль с добавлением 0,5М сахарозы. Затем промывали по 2 минуты в четырех сменах 20% FBS.

Отмытые клетки I группы переносили в лунки планшета со средой для созревания в CO₂-инкубатор на 24 часа культивирования. Затем клетки оплодотворяли заморожено-оттаянной спермой, предварительно прошедшей процедуру капацитации по общепринятой методике. Размороженные клетки II группы сразу оплодотворяли предварительно подготовленной спермой в течение 18 часов.

Сохранность заморожено-оттаянных ооцит-кумулюсных комплексов на разных стадиях развития определяли по уровню оплодотворяемости клеток.

Зародыши замораживали на разных стадиях развития: 2-кл, 4-кл, 8-кл, морула ранняя (Mo I), морула поздняя (Mo II), бластоциста ранняя (Bl I), бластоциста поздняя (Bl II) с использованием проникающих криопротекторов 1,4М глицерина и 1,5М этиленгликоля. Насыщение клеток защитными растворами осуществляли в три этапа по возрастающей концентрации.

Сохранность замороженно-оттаянных эмбрионов определяли сразу после оттаивания и после 6-часового культивирования по следующим показателям: распад, условно годные и пригодные к пересадке.

Определение внутриклеточной концентрации АТФ проводили хемилюминесцентным методом по интенсивности свечения флуоресцирующего продукта в реакции с люциферин-люциферазой. Изменение состояния митохондрий оценивали по интенсивности флуоресценции связанного с ними катионного мембрано-чувствительного красителя

родамина 123 (Rd 123) на спектрофлуориметре Solar SM 2203 (РБ).

Результаты исследований и их обсуждение. Криоконсервирование клеток по I схеме (таблица 1) позволило сохранить наличие кумулюса у 100 % клеток обеих групп. Признаки деформации оболочки наблюдались у 10,7 % в I группе и 12,5 % у клеток II группы.

Фрагментация ооциты присутствовала у 82,1 % ооцитов I группы и 79,2 % – у II. После 20-часового совместного культивирования со спермиями наблюдалось 4,0 % дробящихся клеток в I группе. Во II группе после оплодотворения дробящихся клеток не обнаружено.

Насыщение и выведение глицерина по II схеме способствовало сохранению 94,4 и 87,5 % клеток кумулюса, деформации оболочки – у 13,9 и 8,3 % клеток, а фрагментации ооциты – у 88,9 и 79,2 % ооцитов I и II групп, соответственно. После оплодотворения дробление (5,0%) отмечено при замораживании клеток с предварительным (20 часов) созреванием.

Использование в качестве криофиликта этиленгликоля (схема III) позволило сохранить кумулюс у 100 % клеток в I группе, деформировалось 10,8 % оболочек, фрагментировалась ооциты у 54,1 % ооцитов. В данном опыте получено 9,7 % дробящихся клеток.

Для изучения возможности длительного хранения зародышей крупного рогатого скота на начальных (2-, 4- и 8-клеточных) стадиях дробления было заморожено-оттаянно 90 зародышей с последующей постановкой их на культивирование.

При замораживании в 1,4М глицерине отмечено нарушение межклеточных связей у 57,1 %, 66,7 и 71,4 % эмбрионов, криоконсервированных на 2-, 4- и 8-клеточных стадиях, соответственно. Нарушение целостности оболочки и деформация оболочки наблюдалась у 4,8 и 14,3% 2-х клеточных эмбрионов. При постановке на дальнейшее культивирование 9,5% клеток продолжили дробление. После оттаивания 4-х клеточных зародышей наблюдалось 8,3% клеток с нарушением целостности оболочки и 8,3% – с деформацией оболочки. Дальнейшее развитие продолжили 8,3% оттаянных клеток.

При использовании в качестве криофиликта 1,5М этиленгликоля наблюдалось нарушение межклеточных связей у 57,9 % 2-клеточных, 71,4 % 4-клеточных и 80,0 % 8-клеточных зародышей. Нарушение целостности оболочки и деформация оболочки отмечались у 10,5 и 21,1% 2-клеточных эмбрионов, соответственно. Продолжили свое развитие 5,3 % замороженно-оттаянных 2-клеточных эмбрионов. При постановке на дальнейшее культивирование 4- и 8-клеточные зародыши остановились в развитии.

При изучении возможности длительного хранения эмбрионов крупного рогатого скота заморожено-оттаянно 29 зародышей на преимплантационных стадиях развития: Мо I; Мо II; ВI I; ВI II (таблица 2).

Таблица 1 – Эффективность замораживания ооцит-кумулусных комплексов на разных стадиях созревания.

№ пп	Режим		Стадия созревания	Состояние ооцит-кумулусных комплексов								
	насыщения	оттаивания		после оттаивания				после оплодотворения				
				п	наличие кумулюса, п- %	деформация оболочки, п- %	фрагментация ооцитоплазмы, п- %	п	наличие кумулюса, п- %	деформация оболочки, п- %	фрагментация ооцитоплазмы, п- %	дробящихся клеток, п- %
I	1. 10% глицерина + 10% пропандиола, 10 мин.; 2. 25% глицерина + 25% пропандиола	1. водная баня 1 мин. + 25°C; 2. 1М сахароза, 5 мин.; 3-6. 20% FBS по 2 мин.	свежесделенные	28	28-100	3-10,7	23-82,1	25	14-56,0	6-24,0	22-88,0	1-4,0
II	1.4М глицерин в 3 этапа по 15 мин.	1. 10 сек. воздух, 10 сек. водная баня +25°C; 2. 0,7М глицерин или 0,75М этиленгликоль + 0,5М сахароза;	созревшие	24	24-100	3-12,5	19-79,2	21	6-28,6	8-38,1	20-95,2	-
III	1,5М этиленгликоль в 3 этапа 15 мин.	1. 10 сек. воздух, 10 сек. водная баня +25°C; 2. 0,7М глицерин или 0,75М этиленгликоль + 0,5М сахароза;	свежесделенные	36	34-94,4	5-13,9	32-88,9	35	12-34,3	7-20,0	34-97,1	-
			созревшие	24	21-87,5	2-8,3	19-79,2	20	15-75,0	5-25,0	18-90,0	1-5,0
			свежесделенные	37	37-100	4-10,8	20-54,1	31	25-80,6	7-22,6	27-87,1	3-9,7
			созревшие	21	19-90,5	1-4,8	16-76,2	18	13-72,2	5-27,8	17-94,4	1-5,6

Таблица 2 – Влияние глубокой заморозки на состояние преимплантационных эмбрионов.

№ пп	Режим насыщения	Стадия насыщения	Состояние эмбрионов						
			после оттаивания				после культивирования		
			п	распад, п-%	условно годные, п-%	хорошие, п-%	распад, п-%	условно годные, п-%	хорошие, п-%
I	1,4М глицерин в 3 этапа 15 мин.	Мо I	3	3-100	–	–	3-100	–	–
		Мо II	4	3-75,0	1-25,0	–	3-75,0	1-25,0	–
		ВI I	4	2-50,0	1-25,0	1-25,0	2-50,0	2-50,0	–
		ВI II	4	1-25,0	2-50,0	1-25,0	1-25,0	2-50,0	1-25,0
		всего	15	9-60,0	4-26,7	2-13,3	9-60,0	5-33,3	1-6,7
II	1,5М этиленгликоль в 3 этапа 15 мин.	Мо I	2	2-100	–	–	2-100	–	–
		Мо II	3	2-66,7	1-33,3	–	3-100	–	–
		ВI I	5	2-40,0	2-40,0	1-20,0	2-40,0	2-40,0	1-20,0
		ВI II	4	1-25,0	1-25,0	2-50,0	2-50,0	1-25,0	1-25,0
		всего	14	7-50,0	4-28,6	3-21,4	9-64,3	3-21,4	2-14,3
итого			29	16-55,2	8-27,6	5-17,2	18-62,1	8-27,6	3-10,3

При замораживании в 1,4М глицерине отмечен распад 100 % Мо I и 75 % Мо II. Распад также наблюдался у 50 % ВI I и 25 % ВI II. Условно годными признаны по 25 % Мо II и ВI I, 50 % – ВI II. При оттаивании ВI I и ВI II получено по 25 % эмбрионов хорошего качества. После культивирования в течение 6 часов только одна ВI II (25 %) продолжила свое развитие. Средний же показатель по группе составил 6,7 %.

При использовании в качестве криофиликта 1,5М этиленгликоля 100 % Мо I распались. У 66,7 % Мо II после оттаивания наблюдался распад, а 33,3 % оценены как условно годные, однако после 6-часового культивирования зафиксирован распад у 100 % эмбрионов. Из 5 замороженно-оттаянных ВI I у 2 (40 %) наблюдался распад, 2 (40 %) признаны условно годными и 1 (20 %) хорошего качества. После культивирования состояние эмбрионов осталось на прежнем уровне. При оттаивании ВI II 50 % из них оценены как хорошие, однако после культивирования эмбрионов хорошего качества осталось 25 %. В среднем по группе получено 14,3 % эмбрионов хорошего качества.

Для выяснения зависимости изменения энергетического статуса ооцитов и эмбрионов после криоконсервации от типа используемого при их замораживании криопротектора проведена сравнительная оценка трансмембранного потенциала и содержания АТФ в интактных ооцитах и клетках ранних зародышей.

Обнаружено, что интенсивность флуоресценции ($I_{флу}$) Rd123, связанного митохондриями интактных ооцитов, в пересчете на интенсив-

ность флуоресценции белковых триптофанилов составляла 3,96 отн. ед., в то время как данный параметр в суспензии ооцитов крупного рогатого скота, замороженных в смеси (1,4М глицерин+0,3М сахараза) равнялась 2,31 отн. ед., что в 1,2 раза выше, чем этот показатель для ооцитов, криоконсервированных в смеси 1,5М этиленгликоль+0,3М сахараза, который равен 1,95. Интенсивность флуоресценции Rd123, накопленного митохондриями ооцитов, криоконсервированными в присутствии 1,5М 1,2-пропандиол+0,3М сахараза, составила 3,74 отн. ед., что в 1,9 и 1,6 раза выше, чем в ооцитах, замороженных в этиленгликоле и глицерине, соответственно.

Установлено, что свежевыделенные ооциты крупного рогатого скота содержат 8,2 пМ АТФ на яйцеклетку, а после замораживания-оттаивания, отмывки от криоконсерванта и перевода ооцитов в среду для регистрации хемилюминесценции, внутриклеточный уровень АТФ в ооцитах, замороженных с применением криопротектора, в состав которого входили 1,4М глицерин и 0,3М сахараза, составлял 4,5 пМ/ооцит. Использование криоконсервирующей смеси, состоящей 1,5М этиленгликоля+0,3М сахаразы, приводит к менее выраженной криозащите, внутриклеточное содержание АТФ в данном случае было 4,3 пМ/ооцит. Наиболее высокую криопротекторную функцию проявлял 1,2-пропандиол. Внутриклеточный уровень АТФ в ооцитах, замороженных с использованием смеси 1,5М 1,2-пропандиола и 0,3М сахаразы, составлял 7,0 пМ на ооцит, что лишь в 1,17 раза ниже внутриклеточного содержания АТФ в свежевыделенных, интактных ооцитах. Следовательно, использование комплекса пропандиол + сахараза позволяет лучше других криопротекторов защитить ооциты от повреждения при заморозке и сохранить их функциональную активность после оттаивания.

Нами выявлено, что митохондрии клеток эмбрионов крупного рогатого скота, подвергнутые глубокой заморозке в криопротекторной смеси, содержащей 1,4М глицерин и 0,3М сахаразу, накапливают значительное количество потенциал-чувствительного зонда Rd 123. Отношение интенсивности флуоресценции Rd123 к $I_{\text{флу}}$ триптофанилов в оттаянных после заморозки эмбрионах равна 2,9 отн. ед., что составляет 80 % величины данного параметра в интактных, не подвергшихся замораживанию эмбрионах – $I_{\text{флу}}$ Rd123 равно 3,6 отн. ед.

Оценка энергетического статуса клеток эмбрионов крупного рогатого скота, криоконсервированных с использованием смеси 1,4М глицерина, как проникающего криопротектора, и 0,3М сахаразы, как непроникающего, показала, что внутриклеточный уровень АТФ в них лишь в 1,2 раза ниже, чем в незамороженных (5,1 пМ и 6,2 пМ на эмбрион, соответственно). Следовательно, повреждающие условия глубокой заморозки и последующее оттаивание менее критичны для эм-

брионов, чем для ооцитов. Эмбрионы крупного рогатого скота с достаточно высоким потенциалом к дальнейшему развитию можно получать, используя в качестве криопротекторной системы глицерин в сочетании с сахарозой.

Заключение. 1. Криоконсервирование свежевыделенных ооцит-кумулюсных комплексов коров в 1,5М растворе этиленгликоля обеспечивает сохранность ооцит-кумулюсных клеток на уровне 100 % и получение 9,7 % дробящихся клеток. Замораживание ооцитов с предварительным 20-часовым дозреванием позволяет получать после оттаивания и оплодотворения лишь 5,6 % зародышей на начальных стадиях дробления.

2. Глубокое криоконсервирование 2- и 4-клеточных зародышей в 1,4М растворе глицерина с использованием сахарозы обеспечивает продолжение дробления у 9,5 и 8,3 % эмбрионов, соответственно. При использовании в качестве криофилактика 1,5М этиленгликоля 5,3 % 2-клеточных эмбрионов продолжают дальнейшее дробление.

3. Использование в качестве криопротектора 1,4М глицерина обеспечивает сохранность после оттаивания и последующего культивирования поздних бластоцист хорошего качества на уровне 25 %. Применение по аналогичной схеме 1,5М этиленгликоля способствует сохранению 50 % поздних бластоцист хорошего качества после оттаивания и 25 % после последующего культивирования.

4. Использование катионного, потенциал-чувствительного зонда родамина 123, отражающего состояние митохондрий и люциферин-люциферазного метода определения внутриклеточного уровня АТФ, показало, что наилучшей криопротекторной системой в криоконсервировании ооцитов крупного рогатого скота является смесь, содержащая 1,5М 1,2-пропандиол и 0,3М сахарозу, а в криоконсервировании эмбрионов крупного рогатого скота – 1,4М глицерин в сочетании с 0,3М сахарозой.

Литература

1. Congelation d'embryons bovins par la methode au giucerol-suerose pour transfert direct, après / K. Tonati [et al.] // Ann. Mcol. Vet. – 1999. – Vol. 134, № 4. – P. 249-251.
2. Шаловило, С. Г. Удосконалення надшвидкого методу заморожування і деконсервації ембріонів без відмивання і виведення криопротекторів / С. Г. Шаловило, М. М. Шаран, М. Д. Пасіцький // Використання трансплантації ембріонів в селекції і відворенні сільськогосподарських тварин : матеріали Міжнар. наук. вид. конф. – Київ-Асканія-Нова, 1997. – С. 87-88.
3. Effects of sucrose concentration on the developmental potential of human frozen-thawed oocytes at different stages of maturity / Z. Chen [et al.] // Hum. Reprod. – 2004. – Vol. 19. – P. 2345-2349.
4. Paynter, S. J. A rational approach to oocyte cryoconservatin / S. J. Paynter // Reprod. Biomed. Online. – 2005. – Vol. 10. – P. 578-586.

(поступила 3.03.2010 г.)