УДК 636.2:612.621

Т. И. Кузьмина, И. П. Шейко, А. И. Ганджа, К. П. Брюсов

Развитие доимплантационных эмбрионов bos taurus и sus scrofa domesticus, полученных из девитрифицированных ооцитов

Аннотация. *Проанализированы цитоморфологические показатели качества эмбрионов коров и свиней, полученных из девитрифицированных ооцитов после оплодотворения in vitro. Предложены системы дозревания женских гамет, модернизированные преинкубацией ооцитов в жидкости фолликулов малого диаметра до витрификации, позволившие получить до 10% эмбрионов коров и 7% эмбрионов свиней на стадиях поздней морулы и бластоцисты.*

Ключевые слова: ооцит, витрификация, эмбрион, корова, свинья.

Авторы:

Кузьмина Татьяна Ивановна — доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией биологии развития, ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург-Пушкин, Московское шоссе, 55а, e-mail: prof.kouzmina@mail.ru;

Шейко Иван Павлович — доктор сельскохозяйственных наук, профессор, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси Первый заместитель генерального директора, Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», Беларусь, Минская обл., г.Жодино, ул. Фрунзе, 11, e-mail: belniig@tut.by;

Ганджа Алла Ивановна — кандидат сельскохозяйственных наук, заведующая лабораторией, Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», Беларусь, Минская обл., г. Жодино, ул. Фрунзе, 11, e-mail: agandja@mail.ru;

Брюсов Клаус-Питер — доктор биологических наук, профессор, Лейбницкий Институт биологии сельскохозяйственных животных, заместитель главы отдела репродуктивной биологии, Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196, Думмерсторф, Германия, телефон. +49 (0) 38208-68770, электронная почта: bruessow@fbn-dummerstorf.de.

Введение. В последние годы продовольственная сельскохозяйственная организация ООН (FAO) активно ведет работы по созданию глобальной программы для мониторинга и управления генетическими ресурсами животных, в которой важное значение имеет криоконсервация гамет и эмбрионов. Клеточные репродуктивные технологии играют огромную роль не только в решении задач получения высокопродуктивных животных для хозяйственных и биомедицинских целей, но и в сохранении генетических ресурсов (создание криобанков гамет, эмбрионов) одомашненных и исчезающих видов животных. Разработка эффективных технологий криоконсервации донорских ооцитов животных позволит интенсифицировать технологии клонирования, трансгенеза, т.к. обеспечит в достаточной мере число донорских ооцитов, а, значит, и количество цитопластов и зигот, необходимых в качестве реципиентов для переноса в них ядер или генов.

В настоящее время исследователи разрабатывают несколько подходов к криоконсервации ооцитов млекопитающих: медленное замораживание или витрификация целого яичника, ткани яичника (секции, кортекса) и женской гаметы [1, 2, 3. 4]. Для ооцитов, как показывает анализ данных литературы, витрификация представляется, как наиболее эффективный метод криоконсервации по сравнению с медленным замораживанием [5]. Ооцит-кумулюсные комплексы для процедуры витрификации извлекаются из яичников животных post mortem или из антральных фолликулов живых особей трансвагинальной аспирацией (Ovum pick up technology). Несмотря на то, что исследования по витрификации ооцитов сельскохозяйственных животных активизировались в последние 10 лет, выход жизнеспособных эмбрионов на стадии бластоцисты, пригодных для трансплантации невысок, по сравнению с эмбрионами, полученными из нативных ооцитов, созревших in vivo или in vitro. Цель настоящего исследования — оптимизировать этапы технологии витрификации ооцитов коров и свиней на стадии диплотены для получения из них доимплантационных эмбрионов in vitro.

Условия, материалы и методы исследований. Материалом для исследований служили ооцит-кумулюсные комплексы, выделенные из антральных фолликулов свиней (породы ландрас) и коров post mortem. Витрификацию ооцитов проводили после извлечения из фолликулов (на стадии диплотены). В экспериментах использовали ооциты, окруженные не менее чем 5–6 слоев кумулюсных клеток, с равномерной по ширине зоной пеллюцида,

гомогенной ооплазмой. Ооциты, предназначенные для витрификации, обрабатывались тремя растворами криопротекторов (CPA), приготовленными на среде ТС-199 с 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, HyClone, Logan, UT). CPA-1: 0.7 М диметилсульфоксид (ДМСО) + 0.9 М этиленгликоля (ЭГ); CPA-2: 1.4 М ДМСО + 1.8 М ЭГ; CPA-3: 2.8 М ДМСО + 3.6 М ЭГ + 0.65 М трегалоза. Ооцит-кумулюсные комплексы поэтапно экспонировали в течение 30 сек в CPA-1, затем в CPA-2 и 20 секунд в CPA-3. Пайеты с ооцитами помещали в жидкий азот. Ооцит-кумулюсные комплексы извлекали из пайет не раньше, чем через 60 минут, и помещали в 0,25 М трегалозу в ТС-199 с 10% ФБС при 37^0С, отмывали в 0,19 М, затем в 0,125 М трегалозе, окончательно в ТС-199. Отбор ооцит-кумулюсных комплексов, оценку качества фолликулов, получение фолликулярной жидкости, проводили методами, описанными нами ранее [6]. Режимы культивирования и оплодотворения ооцитов свиней и коров in vitro, а также культивирования доимплантационных эмбрионов представлены в методических рекомендациях, разработанных в лаборатории биологии развития ФГБНУ ВНИИГРЖ и статье [7, 8, 9]. Статус хроматина ооцитов и эмбрионов оценивали по методу A. Tarkowski [10].

Для сравнения результатов, полученных в опытных и контрольных группах, использовали критерий $\chi 2$, данные обработаны с помощью статистической программы Sigma Stat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P<0,05$; $P<0,01$; $P<0,001$, для 3 независимых экспериментов.

Анализ и обсуждение результатов. Разработанная нами ранее модель среды созревания ооцитов коров на основе ТС-199, с добавлением 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, 50 нг/мл бычьего пролактина и кокультивированием ооцит-кумулюсных комплексов совместно с клетками гранулезы (10^6 клеток гранулезы на мл среды) позволяет получать до 40% эмбрионов на стадии бластоцисты с высокими качественными характеристиками [11]. Успешной для получения свиных эмбрионов оказалась модель среды следующего состава: NCSU 23 — синтетическая питательная среда, дополненная 10 М.Е. хорионического гонадотропина человека, М.Е. хорионического гонадотропина лошади, 10% фолликулярной жидкость (диаметр фолликулов 3–5 мм). Культивирование ооцит-кумулюсных комплексов проводили на стенках фолликулов, помещенных на дно чашки Петри, в течение 44 часов Результативность использования такой системы выражалась в выходе эмбрионов на стадии поздней морулы — бластоцисты до 45% [9]. Основываясь на вышеизложенном, в наших экспериментах мы использовали именно эти модели для созревания девитрифицированных ооцитов исследуемых видов животных. Хроматин ооцитов, выделенных из яичников животных post mortem, находится на стадии диплотены. Идентифицированы три типа диплотен: диффузная, фибриллярная и видимых бивалентов, структура первых двух представлена тонкими нитями хромосом. Особенность структуры хромосом на этой стадии мейоза объясняет уязвимость ооцита, в данном случае большую вероятность криоповреждений в ооците. В своих исследованиях мы исходили из следующих заключений: преинкубация женской гаметы в жидкости фолликулов малого диаметра, во-первых, замедлит процесс реинициации мейоза, который имеет место после извлечения ооцита из микроокружения фолликула, т.к. ранее нами было показано, что низкомолекулярные белки фолликулярной жидкости ингибируют реинициацию мейоза, и, тем самым, уменьшается вероятность повреждения тонкой структуры хроматина, а, во-вторых, вследствие высокой вязкости жидкости фолликулов затрудняется образование кристаллов [12, 13]. Для преинкубации ооцитов каждого вида животного использовали гомологичную инактивированную фолликулярную жидкость из фолликулов диаметром не более 3 мм. Как показали предыдущие исследования, созревшие нативные и девитрифицированные ооциты, предварительно преикубированные в фолликулярной жидкости, после культивирования были окружены кумулюсом с высокой степенью экспансии (до 80%) [14]. Ооциты, не прошедшие преинкубацию в фолликулярной жидкости, имели низкие показатели экспансии кумулюсных клеток (45%). Последний факт свидетельствует в пользу позитивного влиянии фолликулярной жидкости на витрификацию кумулюсных клеток, а, априори, и ооцитов, т.к. одним из маркеров успешного созревания ооцитов in vitro является уровень экспансии клеток кумулюса.

Исследованию подверглись следующие экспериментальные группы: ооцит-кумулюсные комплексы, выделенные из фолликулов и прокультивированные в течение 24 часов для ооцитов коров и 44 для ооцитов свиней [нативные ооциты (-)]; ооцит-кумулюсные комплексы, выделенные из фолликулов и инкубированные в течение 30 минут в жидкости фолликулов диаметром до 3 мм, затем прокультивированные в течение 24 часов для ооцитов коров и 44 для ооцитов свиней [нативные ооциты (+)]; ооцит-кумулюсные комплексы, выделенные из фолликулов, подвергались про-

цедурам витрификации-девитрификации и затем культивировали в течение 24 часов для ооцитов коров и 44 для ооцитов свиней [девитрифицированные ооциты (-)]; ооцит-кумулюсные комплексы, выделенные из фолликулов и инкубированные в течение 30 минут в жидкости фолликулов диаметром до 3 мм, после витрификации-девитрификации культивировали в течение 24 часов для ооцитов коров и 44 для ооцитов свиней [девитрифицированные ооциты (+)];

Результаты экспериментов по получению эмбрионов коров и свиней из нативных и девитрифицированных ооцитов, представлены в таблицах 1 и 2. Выход эмбрионов коров на стадиях поздней морулы, бластоцисты, развившихся из девитрифицированных ооцитов, достигал 10%, а у свиней этот показатель составил 7%, что соответствует лучшим достижениям исследователей, занимающихся проблемами витрификации ооцитов свиней и коров [15, 16]. Показано, что преинкубация ооцитов до витрификации в жидкости фолликулов до 3 мм повышает число доимплантационных эмбрионов коров и свиней (52% против 33%, $P<0,05$ и 31% против 14%, $P<0,05$, соответственно) (табл. 1 и 2).

При раннем развитии эмбрионов коров и свиней часто наблюдается их дегенерация, особенно высоко число дегенерированных зародышей при получении их из девитрифицированных ооцитов. В изложенных далее результатах экспериментов оценивали эмбрионы с учетом следующих морфологических критериев: компактность клеток; правильность формы эмбриона; отклонения в размере клеток; цвет и структура; наличие больших везикул; присутствие экструдированных элементов клеток; целостность зоны пеллюцида; наличие фрагментов клеток. При цитоанализе учитывали плоидность, соответствие числа ядер количеству бластомеров, уровень пикнозов. Следует отметить, что при морфологической оценке эмбрионов во всех группах эксперимента не обнаружено достоверных различий по уровню эмбрионов с морфологическими признаками дегенерации (табл. 3).

Выводы. Выявлен положительный эффект преинкубации донорских ооцитов коров и свиней в гомологичной жидкости фолликулов диаметром до 3 мм перед процедурой витрификации, который выражался в повышении выхода дробящихся клеток. Предложена среда для культивирования девитрифицированных ооцитов коров (ТС-199 + 10% фетальной бычьей сыворотки + 10^6 клеток/мл гранулезы + 50 нг/мл бычьего пролактина), обеспечивающая при последующем оплодотворении in vitro выход эмбрионов на стадиях поздней морулы и бластоцисты до 10%. Адаптирована модель экстракорпорального дозревания девитрифицированных ооцитов свиней, компонентами которой

Таблица 1. **Развитие доимплантационных эмбрионов из нативных и девитрифицированных ооцитов коров (число ооцитов — 656)**

Группы эксперимента	Преинкубация в фолликулярной жидкости	n ооцитов	n (%) дробления	n (%) морул-бластоцист
Нативные ооциты	-	136	97(71)[a]	50(37)[e]
	+	151	100(66)[b]	42(28)[f]
Девитрифицированные ооциты	-	191	63(33)[c]	8 (4)[j]
	+	178	93(52)[d]	18(10)[k]

(критерий χ-квадрат) a:c; a:d; b:c; c:d; b:d;e:j;e:k $P<0.05$

Среда культивирования: ТС199 + 10% фетальной бычьей сыворотки + 10^6 клеток/мл гранулезы + 50 нг/мл бычьего пролактина

Таблица 2. **Развитие доимплантационных эмбрионов из нативных и девитрифицированных ооцитов свиней (число ооцитов — 781)**

Группы эксперимента	Преинкубация в фолликулярной жидкости	n ооцитов	n (%) дробления	n (%) морул-бластоцист
Нативные ооциты	-	189	91(48)[a]	62(33)[e]
	+	176	83(47)[b]	40(23)[f]
Девитрифицированные ооциты	-	211	30(14)[c]	6(3)[j]
	+	205	64(31)[d]	14(7)[k]

a:c;b:c;a:d;c:d;b:d;e:j;e:k;f:j $P<0.05$(критерий χ-квадрат) Среда культивирования: NCSU 23 — синтетическая питательная среда + 10 М.Е. хорионического гонадотропина человека + 10 М.Е. хорионического гонадотропина лошади +10% фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–5 мм) + стенки фолликулов (диаметр фолликулов 3–5 мм).

являются стенки фолликула и его жидкость, позволяющая получать до 7% эмбрионов свиней на стадиях поздней морулы и бластоцисты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-90038 Бел_а).

Таблица 3. **Цитоморфологическая оценка доимплантационных эмбрионов коров и свиней, полученных из девитрифицированных ооцитов (число эмбрионов — 567)**

Вид животных	Группы эксперимента	Преинкубация ооцитов в фоллику-лярной жидкости	n эмбрионов	n(%) дегенерированных эмбрионов
корова	нативные ооциты	-	97	17(18)
		+	100	16(16)
	девитрифицированные ооциты	-	60	14(23)
		+	72	15(21)
свинья	нативные ооциты	-	91	17(19)
		+	83	12(14)
	девитрифици-рованные ооциты	-	24	6(25)
		+	40	9(23)

Литература

1. Baudot A. Towards whole sheep ovary cryopreservation./A. Baudot, B. Courbiere, V. Odagescu, B. Salle, C. Mazoyer, J. Massardier & J. Lornage //Cryobiologyю. 2007. Vol. 55. P. 236–248.
2. Bordes A. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes/Bordes, A., J. Lornage, B. Demirci, M. Franck, B. Courbiere, J. F. Guerin&B. Salle.//Hum Reprod. 2005. Vol. 20. 2745-2748.
3. Borges, E. N. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes./E. N. Borges, R. C. Silva, D. O. Futino, C. M. Rocha-Junior, C. A. Amorim, S. N. Bao & C. M. Lucci.//Cryobiology. 2009. Vol. 59, P.195–200. 1090–2392.
4. Celestino J. J. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue./J. J. Celestino, R. R. Dos Santos, C. A. Lopes, F. S. Martins, M. H. Matos, M. A. Melo, S. N.Bao, A. P. Rodrigues, J. R. Silva&J. R. De Figueiredo.//Anim Reprod Sci, 2008. Vol. 108. P. 309–318, 1873–2232.
5. Zhou X. L. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development./X. L. Zhou, Al. A. Naib, D. W. Sun, P. Lonergan // Cryobiology. 2010. Vol. 61. P. 66–72, 2010.
6. Кузьмина Т. И. Методы оценки функционального состояния донорских ооцитов, соматических клеток фолликулов и эмбрионов сельскохозяйственных животных/Т. И. Кузьмина, В. Ю. Денисенко, И. Ю. Лебедева, О. В. Шокин//Метод рекомендации/Москва. 2005. С. 32.
7. Кузьмина Т. И. Биотехнология получения эмбрионов крупного рогатого скота in vitro./Т. И. Кузьмина, В. А. Багиров, А. В. Егиазарян, Х. Альм, Х. Торнер//Санкт-Петербург-Пушкин. 2009. С. 44.
8. Кузьмина Т. И. Методы получения эмбрионов свиней in vitro. / Т. И. Кузьмина, Х. Альм, Х. Торнер// СПб – Пушкин. 2008. С.37.
9. Кузьмина Т. И. Моделирование систем созревания ооцитов свиней in vitro/Т. И. Кузьмина, Д. А. Новичкова, Н. А. Волкова//Сельскохозяйственная биология. 2013. № 2. С.52–57.
10. Tarkowski A. K. An air drying method for chromosomal preparation from mouse eggs/A. K. Tarkowski // Cytogenetic. 1966. V. 1. P. 394–400.
11. Kuzmina T. I. Innovative embryotechnology in the reproduction of animals from basic researches to practice./T. I. Kuzmina, X. Torner, H. Alm //J. Advances in science and technology agro industrial complex.2010. V. 4. P. 66–68.
12. Kuzmina T. I. Evaluation of the functional status of bovine oocytes culture in vitro after vitrification/ T. I. Kuzmina, B. I. Protasov//Cell and tissue biology. 2004. V. 46. № 9. P. 781.

13. Kuzmina T. I Effect of pre-treating bovine oocytes with the follicular fluid prior to vitrification on their nuclear-cytoplasmic maturation/T.I. Kuzmina, V. Yu. Denisenko, A. Yu. Malishev //Reproductive Bio-Med-cine. 2010. V. 20. suppl. 3. P.538–539.
14. Кузьмина Т. И. Ооцит-кумулюсные взаимодействия и ядерное созревание нативных и девитрифицированных ооцитов коров in vitro/Кузьмина Т. И., Шейко И. П., Позднякова Т. Э., Ганджа А. И. // Известия С. петербургского Аграрного Университета. 2012. № 26. С.102-106.
15. Zhang W. Advances on in vitro production and cryopreservation of porcine embryos./W. Zhang, K. Yi, H. Yan, X. Zhou //Anim Reprod Sci. 2012. V. 132. P. 115–122.
16. Prentice-Biensch J. R. Vitrification of immature bovine cumulus-oocyte complexes: effects of cryoprotectants, the vitrification procedure and warming time on cleavage and embryo development/J. R. Prentice-Biensch, J. Singh, R. J. Mapletoft, M. Anzar //Reproductive Biology and Endocrinology. 2012, V. 10. P. 1186–1477.

Kuzmina T. I., Sheiko I. P., Gandja A. I., Brussow K.-P.

Development of pre-implantation embryos bos taurus and sus scrofa domesticus, derived from devitrified oocytes

Abstract. *Cytomorphological indicators of quality of embryos in cows and pigs derived from devitrified oocytes after fertilization in vitro have analized. The systems of maturation of female gametes, upgraded by pre-incubation of oocytes before vitrification in liquid from follicles of small diameter, were proposed, which allowed to receive 10% cow's and 7% of porcine embryos at the stage of late morula and blastocyst .*

Keywords: oocyte, vitrification, embryo, cow, pig.

Authors:

Kuzmina Tatiana Ivanovna — Dr. of Biological Sciences, Professor, Head of Laboratory of Developmental Biology, Russian Research Institute for Farm Animal Genetics & Breeding, Tel. 7(921)3921947, e-mail:prof.kouzmina@mail.ru;

Sheiko Ivan Pavlovich — Dr. of agricultural Sciences, Professor, Corresponding member of National academy of sciences of Belarus, First Deputy General Director, The republican unitary enterprise «the Scientifically-practical centre of National academy of sciences of Belarus on animal industries, tel. +375 1775 3 27 86, e-mail: belniig@tut.by;

Gandja Alla Ivanovna — The candidate of agricultural sciences, The leading scientific employee, The republican unitary enterprise «the Scientifically-practical centre of National academy of sciences of Belarus on animal industries», tel.:+375177523746; e-mail agandja@mail.ru;

Brussow Klaus-Piter — Dr. of Biological Sciences, Professor, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Institute of Reproductive Biology, Deputy. of head of Experimental Reproductive Biology department, Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany, Phone. +49(0)38208-68770, e-mail: bruessow@fbn-dummerstorf.de.