



Санкт-Петербургский государственный
агарный университет

Эффективность использования инозитола в криопротекторных средах для замораживания тканей яичников *Gallus gallus domesticus*



ДОКЛАДЧИК
к.б.н., н.с. Силюкова Ю.Л.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
в рамках выполнения ГЗ по теме: FGNN-2024-0013 «Изучение молекулярно-биологических основ формирования воспроизводительных функций и совершенствование биотехнологий, направленных на повышение и эффективное использование репродуктивного потенциала сельскохозяйственных животных»

II международная
научно-практическая конференция
«ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ
РАЗВИТИЯ ПТИЦЕВОДСТВА»

27 ноября
2025
СПбГАУ



ЦЕЛЬ РАБОТЫ: разработка методов сохранения *in vitro* женских гамет *Gallus gallus domesticus*.

ЗАДАЧИ:

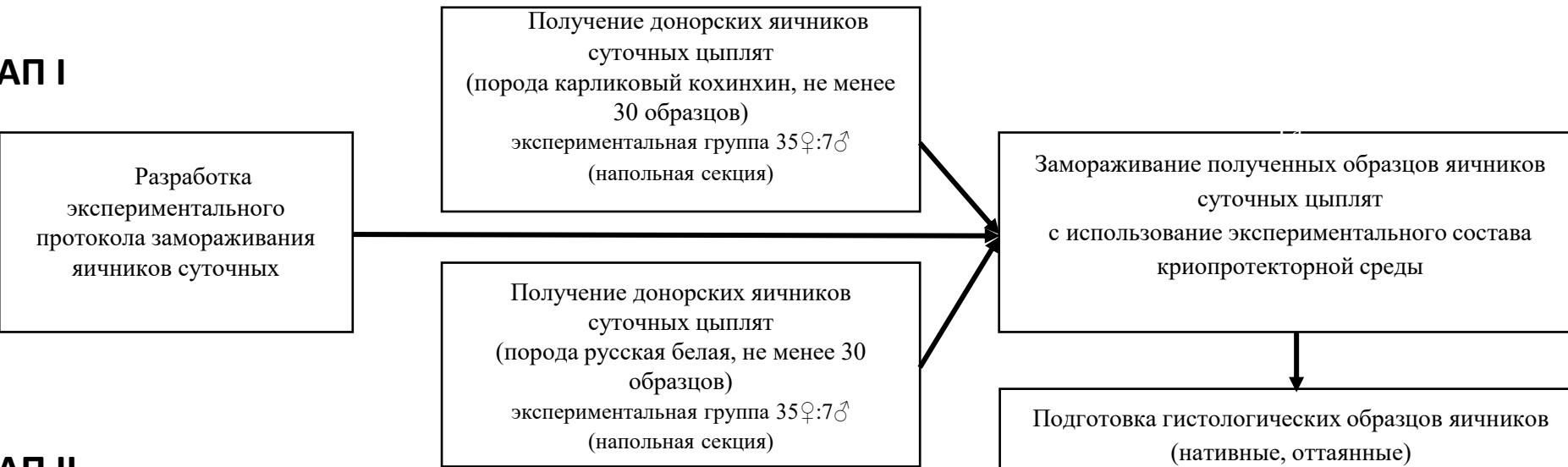
1. Разработать экспериментальный протокол замораживания эмбриональных тканей гонад кур (технология замораживания, разработка экспериментальной среды для замораживания, оценка жизнеспособности клеток тканей гонад и гамет после оттаивания) с учетом породных особенностей (русская белоснежная, карликовый кохинхин).
2. Получить экспериментальные данные при использовании экспериментального протокола замораживания донорских тканей эмбриональных гонад.
3. Разработать и апробировать протокол выделения овогоний из тканей гонад.
4. Разработать и апробировать протокол подготовки эмбрионов-реципиентов (стерилизация).

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые будет предложен полиол в качестве компонента криопротекторной среды для тканей яичников суточных цыплят *Gallus gallus domesticus* и протокол по интраовариальной криоконсервации женских гамет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ЭТАП I



ЭТАП II

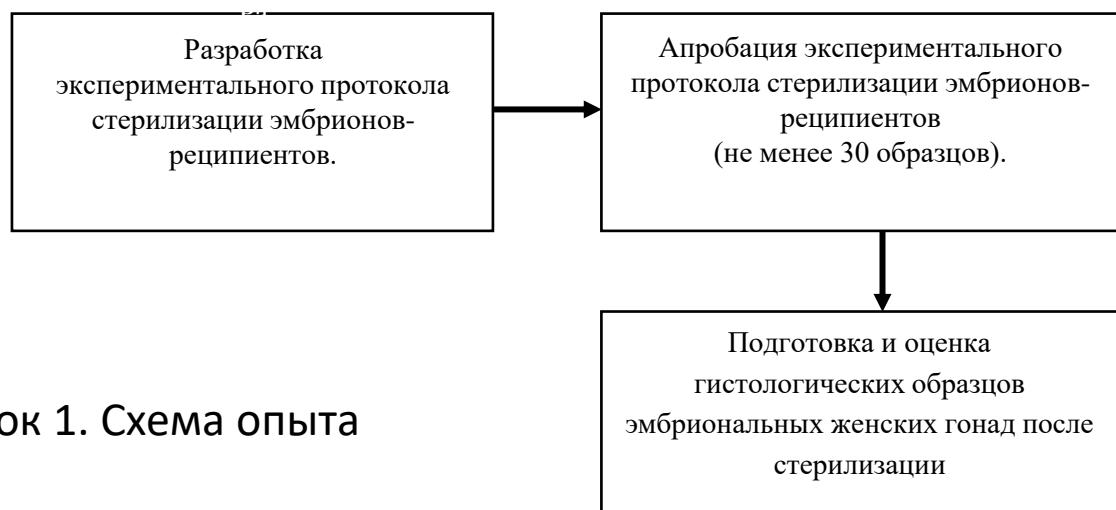


Рисунок 1. Схема опыта

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение экспериментального состава криопротекторной среды для замораживания яичников суточных цыплят. Определение экспериментального протокола замораживания эмбриональных тканей яичников суточных цыплят.

- Определен экспериментальный состав криопротекторной среды для замораживания яичников суточных цыплят (табл. 1), содержащий полиол **инозитол в количестве 0,5М.**
- Определен и апробирован экспериментальный протокол замораживания эмбриональных тканей яичников суточных цыплят (табл. 2).

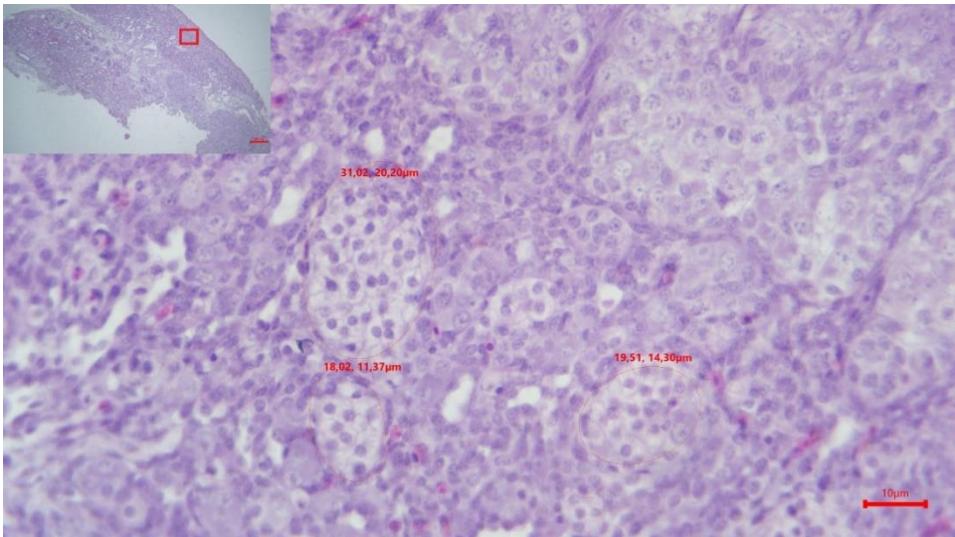
Таблица 2. Показатели оценки гистологических препаратов нативных и оттаянных яичников суточных цыплят по количественному и качественному составу клеток ($n=10$) (mean \pm se).

n =10								
	Толщина коркового слоя, мкм	Расстояние между тяжами стромальных клеток, мкм	Кол-во сосудов яичника, шт.	Кол-во оогоний в корковом слое (в поле зрения), шт.	Размер оогоний в корковом слое, мкм	Кол-во ГЗК в пуле, шт.	Размер ГЗК, мкм	Кол-во атрезивных оогоний, шт.
нативный яичник	184,65 \pm 38,75	56,77 \pm 3,80	1-2	26,1 \pm 2,51	6,39 \pm 0,18	19,64 \pm 3,43	5,9 \pm 0,18	1,8 \pm 0,64
оттаянный яичник (среда А)	136,19 \pm 6,03	184,33 \pm 14,20 ^c	-	1,4 \pm 0,37 ^a	7,76 \pm 0,42 ^c	6,10 \pm 0,64	5,63 \pm 0,18	33,3 \pm 2,28
оттаянный яичник (среда Б)	138,09 \pm 7,37	59,25 \pm 7,76 ^d	-	9,0 \pm 1,63 ^b	8,79 \pm 0,25 ^b	7,5 \pm 0,93	5,92 \pm 0,28	28,1 \pm 2,71

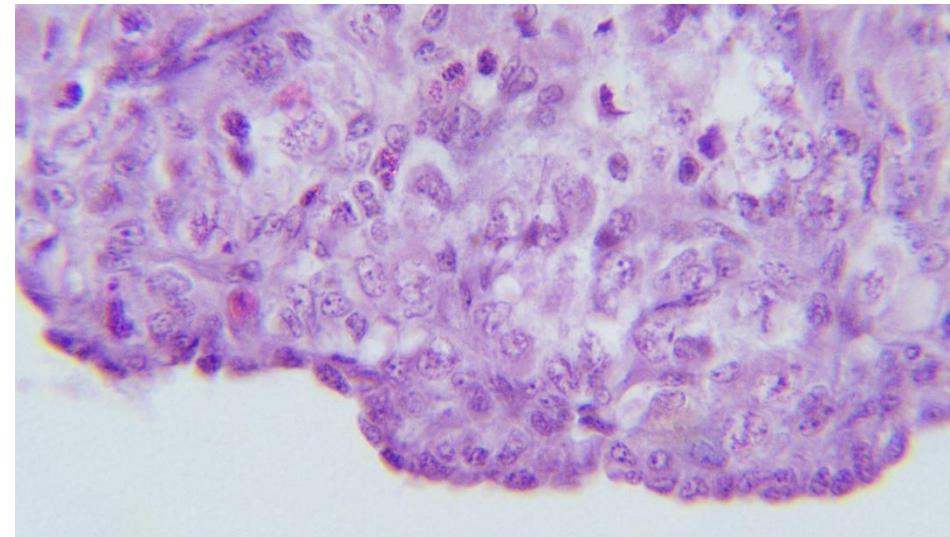
Примечание: ab p \leq 0,01; cd p \leq 0,001

Таблица 1. Состав криопротекторной среды для замораживания яичников суточных цыплят.

I этап		
Компонент	Количество на 5 мл DPBS	
	Среда А	Среда Б
DMSO	0,375 мкл	0,375 мкл
EG	0,375 мкл	0,375 мкл
FBS	1 мл	1 мл
Сахароза	0,5 М	0,5 М
Инозитол	-	0,5 М
II этап		
	Среда А	Среда Б
DMSO	0,75 мкл	0,75 мкл
EG	0,75 мкл	0,75 мкл
Сахароза	0,5 М	0,5 М
Инозитол	-	0,5 М

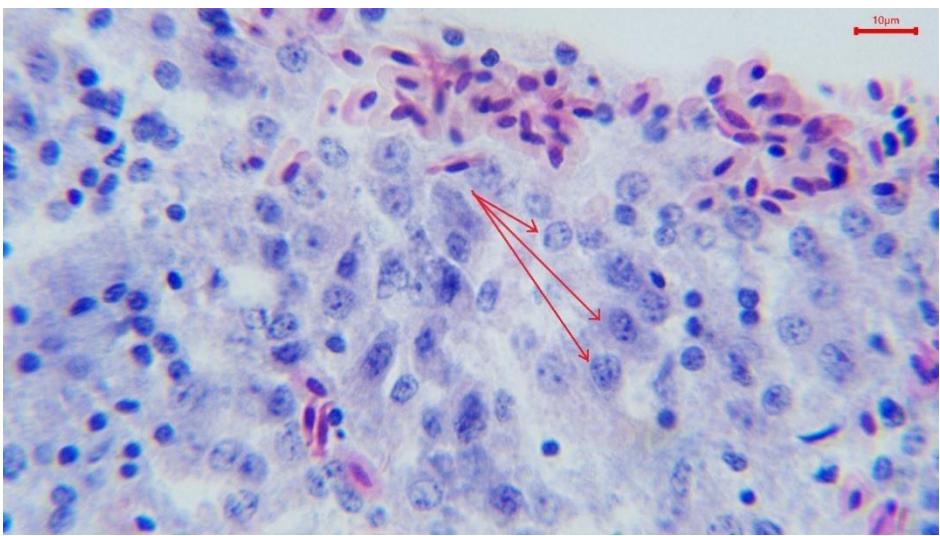


А

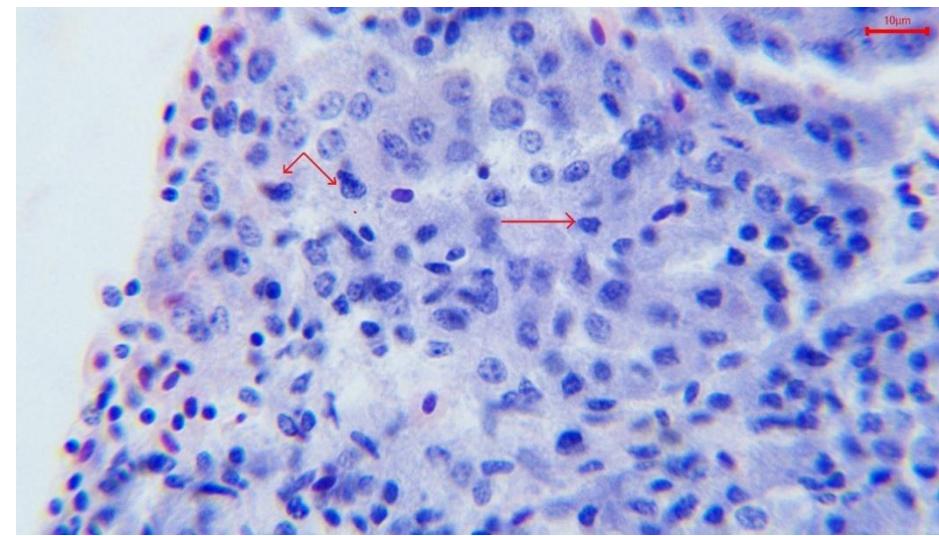


Б

Рисунок 2. Фрагмент гистологического препарата нативного яичника суточного цыпленка (мозговой слой, увеличение x 400 (а), x1000 oil (б)).

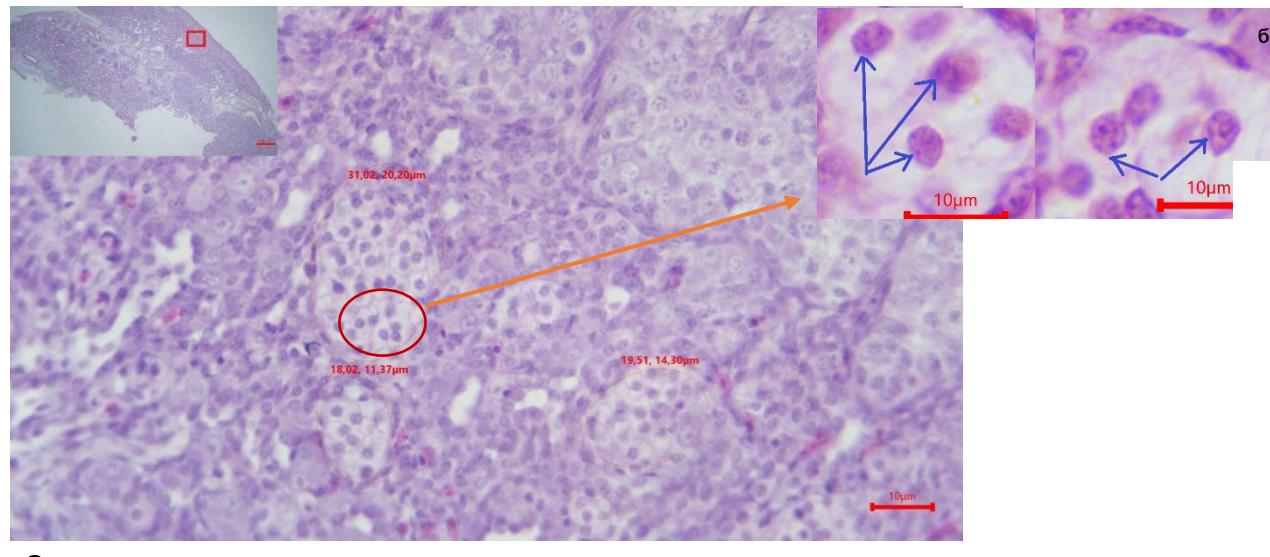


А



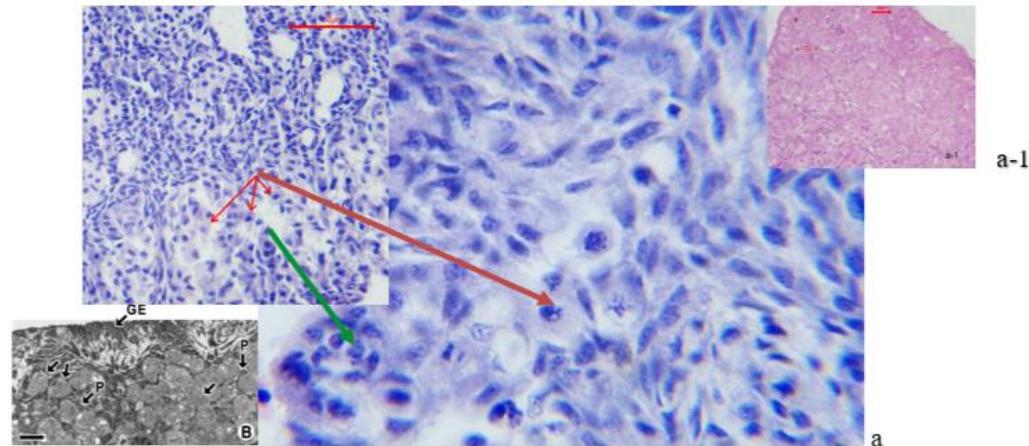
Б

Рисунок 3. Фрагмент гистологического препарата оттаянного яичника суточного цыпленка – Среда Б (корковый слой, увеличение x1000 oil). а) «→» оогонии, сохранившие целостность; б в) «→» оогонии состояния деградации.

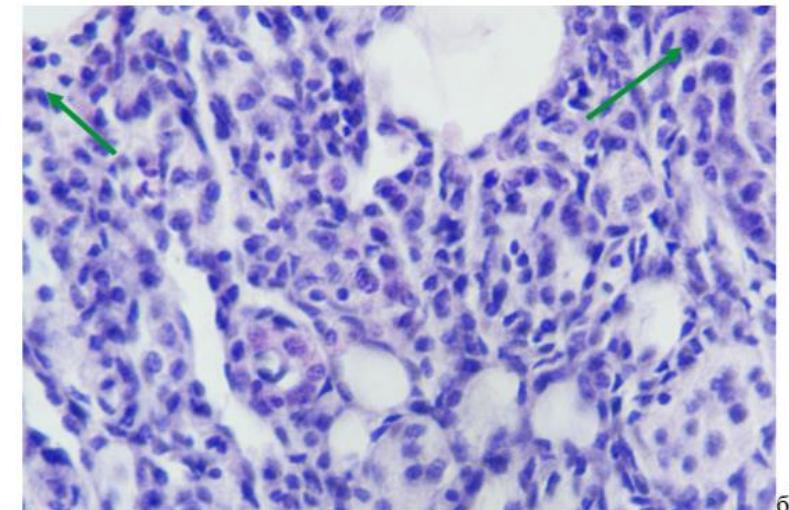


a

Рисунок 4. Фрагмент гистологического препарата нативного яичника суточного цыпленка (мозговой слой, увеличение x 400 (а), x1000 oil (б)).



a-1



б

Рисунок 5. Фрагмент гистологического препарата оттянутого яичника суточного цыпленка – Среда А (корковый слой, увеличение x1000 oil). а) «→ красные» оогонии, сохранившие целостность; а-1) фрагмент препарата нативного яичника (корковый слой, увеличение x40); б) «→ зелёные» оогонии в состоянии деградации (ч/б фото масштаб 10 мкм, процитировано González-Morán M.G. . 2011 doi: 10.1002/ar.21364).

Раздел 3. Разработка плана хирургической подсадки донорского яичника реципиенту: дозировка препаратов (обезболивание, седация), оперативный доступ, оперативный прием, оперативный выход.

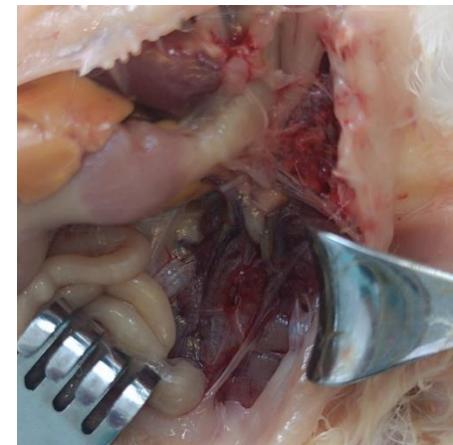
План хирургической операции:

- Оперативный доступ.**

Для создания свободного хирургического прохода к яичникам реципиента был определен возраст цыпленка не менее 5 суток жизни, что связано с наличием значительного объема остаточного желтка ($m=4,5-4,8\text{ г}$)

- Оперативный прием (хирургическая техника)**

- для проникновения в брюшную полость проводят срединную лапаротомию, желудочно-кишечный тракт смещают в сторону, таким образом, чтобы получить доступ к собственным половым железам реципиента (рис.6 а,б);
- при ортопопной трансплантации донорской ткани яичника реципиенту проводят тщательное рассечение, а затем удаление поверхности коркового слоя яичника реципиента с использованием микрохирургического инструмента;
- донорский яичник фиксируют в естественном положении с помощью специального хирургического клея, что позволяет внешнюю поверхность коркового слоя донорского органа оставить полностью свободной (рис. 6в), и его расположение максимально соответствует физиологической норме.
- Оперативный выход (комплекс мероприятий по восстановлению целостности тканей, повреждённых во время осуществления оперативного доступа).**
- хирургические разрезы закрываются, и принимаются соответствующие меры для минимизации риска осложнений.



Б

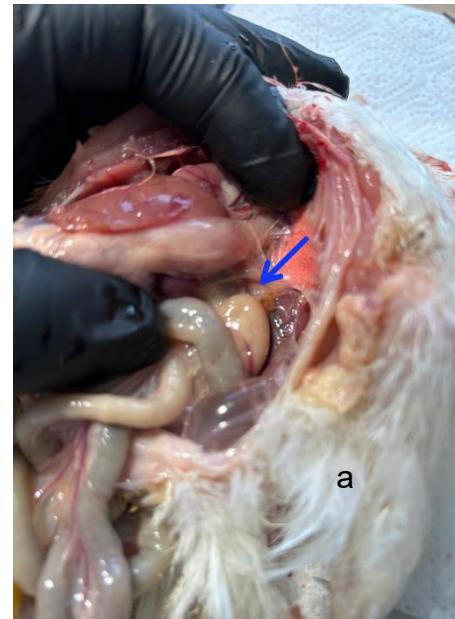
Рисунок 6. Этапы хирургической операции по трансплантации донорского яичника: а) фиксация 7-суточного цыпленка на операционном поле; б) проведение рассечения для обеспечения доступа к яичнику; в) результат экспериментальной трансплантации донорского яичника на брюшную стенку реципиента.

Раздел 5. Разработка и апробация протокола подготовки эмбрионов-реципиентов (стерилизация).

В ходе исследования было проведено 5 повторов по оценке влияния бусульфана на формирования тканей яичников и состояния фолликулов цыплят в возрасте 10 суток жизни (рис. 7).



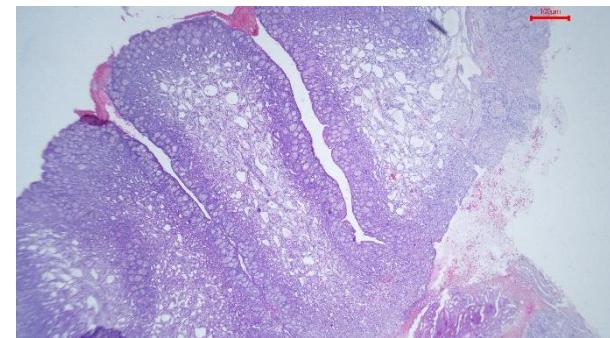
А



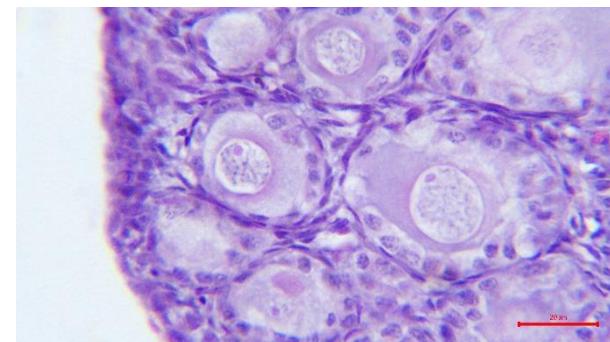
Б

Рисунок 7. а) инкубирование яиц после инъекции бусульфана в возрасте эмбриона 24 и 48 часов; б) иллюстрация развития яичников цыплят, полученных после инъекции бусульфана (→ обозначенrudиментированный яичник).

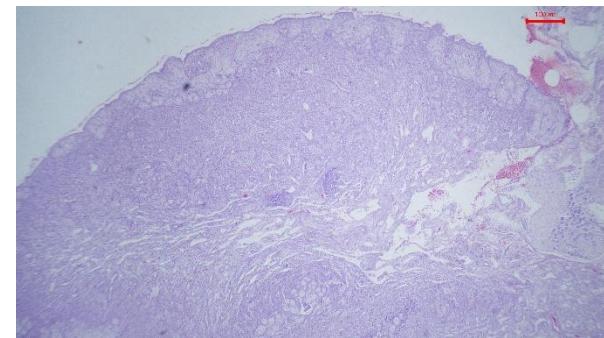
Исследование показало, что бусульфан (доза – 75 мкг) вызывал нарушение эмбрионального развития у более 70% наблюдавшихся эмбрионов, что проявлялось в ранней эмбриональной гибели (34,6%), гибели на поздних сроках (15,7%), а также в нарушениях развития внутренних органов, половой системы в том числе.



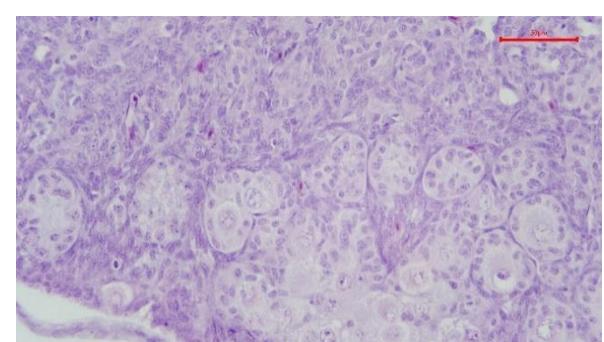
А



Б



В



Г

Рисунок 8. Фрагмент микрофотографии гистологических препаратов яичников в возрасте 10 суток: а-б – нормальное развитие (контроль); в-г – после инъекции бусульфана (опыт).

При оценке развития яичников цыплят в возрасте 10-11 суток были получены следующие результаты (табл. 3): выявлено достоверное изменение размера коркового слоя яичника в сторону его снижения на 23,9% ($p \leq 0,001$), количество фолликулов в состоянии морфологической целостности в поле зрения снижалось на 53,5% ($p \leq 0,001$). Также были отмечены изменения размера фолликулов по отношению к контролю на 14,1% ($p \leq 0,001$).

Таблица 3. Показатели оценки гистологических препаратов нативных яичников и после обработки бусульфаном по количественному и качественному составу клеток цыплят в возрасте 10 и 11 суток (n=10) (mean \pm se).

Яичник	Толщина коркового слоя, мкм	Кол-во фолликулов в корковом слое (в п.з.), шт.	Размер фолликулов в корковом слое, мкм
нативный	123,09 \pm 8,50 ^a	11,8 \pm 1,06 ^a	58,51 \pm 3,02 ^a
после инъекции бусульфана	93,72 \pm 9,25 ^b	5,60 \pm 1,16 ^b	50,28 \pm 2,97 ^b

Примечание: ab $p \leq 0,001$

При оценке развития яичников цыплят в возрасте 10-11 суток были получены следующие результаты (табл. 3): выявлено достоверное изменение размера коркового слоя яичника в сторону его снижения на 23,9% ($p \leq 0,001$), количество фолликулов в состоянии морфологической целостности в поле зрения снижалось на 53,5% ($p \leq 0,001$). Также были отмечены изменения размера фолликулов по отношению к контролю на 14,1% ($p \leq 0,001$).

Таблица 3. Показатели оценки гистологических препаратов нативных яичников и после обработки бусульфаном по количественному и качественному составу клеток цыплят в возрасте 10 и 11 суток (n=10) (mean \pm se).

Яичник	Толщина коркового слоя, мкм	Кол-во фолликулов в корковом слое (в п.з.), шт.	Размер фолликулов в корковом слое, мкм
нативный	123,09 \pm 8,50 ^a	11,8 \pm 1,06 ^a	58,51 \pm 3,02 ^a
после инъекции бусульфана	93,72 \pm 9,25 ^b	5,60 \pm 1,16 ^b	50,28 \pm 2,97 ^b

Примечание: ab $p \leq 0,001$

Очевидно, что поставленные цели по подготовки цыплят-реципиентов для последующей трансплантации с яичников достигнуты, однако, уровень выживаемость эмбрионов и жизнеспособность цыплят-реципиентов подвергает сомнению целесообразности использования данного метода стерилизации. Поскольку остается открытым вопрос их яичной продуктивности во взрослом возрасте, что, собственно, является основной целью планируемой последующей трансплантации.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!