

УДК 636.1: 591.391

Л.Ф. ЛЕБЕДЕВА, Н.В. СИДОРОВА

ГНУ Всероссийский НИИ коневодства

ВИТРИФИКАЦИЯ КАК ЭТАП ТЕХНОЛОГИИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ ЛОШАДЕЙ

С целью разработки метода криоконсервации 8-дневных бластоцист лошадей апробирован метод витрификации с использованием молочно-желточной среды (МЖС) и криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО). Культивирование и пересадка эмбрионов кобылам-реципиентам не дали положительного результата.

Эмбрион, витрификация, криопротектор

История трансплантации эмбрионов в коневодстве насчитывает более 30 лет. В России, а именно в стенах ВНИИ коневодства, такими исследованиями начали заниматься в 1976 г. Группа под руководством доктора биологических наук С.Г. Лебедева добилась успеха, и в 1982 г. в России родился первый жеребенок-трансплантат Алмаз, полученный нехирургическим методом.

Успехи биотехнологических исследований последних десятилетий нашли свое отражение и в коневодстве. В 1972 г. была осуществлена межвидовая хирургическая пересадка между кобылами и ослицами [3], позже получены однойцовые жеребята методом деления ранних эмбрионов на части [4]. В 1982 г. японские исследователи объявили о рождении первого в мире жеребенка после пересадки замороженного эмбриона [6]. В 90-х годах прошлого века появились сообщения об удачных попытках нехирургического извлечения и искусственного оплодотворения ооцитов лошадей с последующим культивированием и пересадкой их реципиентам [5]. В последних публикациях можно найти

© Л.Ф. Лебедева, Н.В. Сидорова, 2006

Розведення і генетика тварин. 2006. Вип. 40.

информацию о пересадке ядер фетальных клеток и соматических клеток взрослых особей в энуклеированные ооциты лошадей с дальнейшим их развитием в культуре до стадии бластоцисты [10].

Вместе с тем исследователи, работающие с лошадьми, единодушны в том, что этот вид животных не терпит простой экстраполяции технологий, отработанных, например, на крупном рогатом скоте. Видоспецифические особенности гормональной регуляции половой функции у кобыл усложняют разработку для самок этого вида эффективного метода суперовуляции, который позволяет значительно интенсифицировать исследования. Сюда же следует отнести эволюционно закрепленное одноплодие лошадей. Механизм уничтожения многоплодной беременности начинает работать у кобыл еще на стадии фолликулогенеза.

Вторым фактором, осложняющим работу с эмбрионами лошадей, является то, что, выходя из яйцевода в матку (5–6-й день после овуляции), они почти сразу же теряют оболочку *zona pellucida* и остаются покрытыми так называемой капсулой. Эта физиологическая особенность суживает возможности исследователей, поскольку большинство биотехнологических приемов предусматривает работу с эмбрионами до стадии денудации (сбрасывания *zona pellucida*), а нехирургическая методика получения зародышей позволяет извлекать их только после выхода из яйцевода в матку. Структурные изменения в эмбрионе лошади после денудации заметно меняют его чувствительность к воздействию различных факторов в процессе экспериментов, что заставляет исследователей искать новые подходы к преодолению уже, казалось, решенных проблем.

Наконец, видоспецифические особенности половой цикличности и протекания ранних стадий эмбриогенеза у лошадей также накладывают отпечаток на развитие и результативность научных исследований. Среди положительных моментов можно отметить возможность извлечения ооцитов из фолликулов жеребых кобыл для биотехнологических экспериментов. Среди отрицательных — длительность эструса, сезонность половой цикличности и высокий уровень эмбриональных потерь в предимплантационный период.

Несмотря на то, что замораживание и экспорт эмбрионов стали общей частью индустрии эмбриотрансплантации крупного рогатого скота, в коневодстве эта технология не столь популярна и имеет невысокую результативность.

Опыт зарубежных коллег указывает, что для замораживания наиболее пригодны эмбрионы на стадии ранней бластоцисты и бластоцисты с интактной *zona pellucida*, диаметр которых не должен превышать 250–260 мкм [8]. При соблюдении этих условий в поэтапном программируемом режиме замораживания с использованием 10% глицерина в среде авторам удалось получить зажеребляемость на уровне 39% (для ранних бластоцист — 62%, для бластоцист — 10%).

Более поздние работы были посвящены как подбору новых криопротекторов, так и режимов замораживания. Наиболее перспективным в настоящее время считается метод витрификации, то есть ультрабыстрого замораживания путем прямого погружения соломинки с эмбрионом в жидкий азот. Он не требует дорогостоящего оборудования и значительно ускоряет и упрощает процесс криоконсервирования. Высокая скорость охлаждения (и оттаивания) позволяет избежать образования губительных для клеток эмбриона кристаллов вне- и внутриклеточного льда и предотвратить осмотический шок. Однако метод предполагает увеличение содержания криопротектора (до 40%) в криозащитной среде, что повышает ее токсичность для эмбриона. Имеются сведения об успешном замораживании методом витрификации эмбрионов крупного рогатого скота и свиней [1, 9]. В медицине также получены положительные результаты при витрификации бластоцист человека [2]. Единичные публикации в научных изданиях посвящены витрификации эмбрионов лошади. В одной из них [10] сообщается о получении двух беременностей в пяти пересадках витрифицированных эмбрионов. Во всех перечисленных источниках речь идет об эмбрионах на стадии морулы и ранней бластоцисты.

Технология трансплантации эмбрионов лошадей, разработанная во ВНИИ коневодства, предполагает работу с 8-дневными бластоцистами диаметром ~1 мм, что позволяет обходиться без этапа фильтрации промывной жидкости и микроскопа. Эм-

брионы этого возраста хорошо приживляются в матке реципиента и в течение 1–2 суток сохраняют жизнеспособность в молочно-желточной культуральной среде [Лебедев С.Г., Лебедева Л.Ф. Авт свид. №1497215 от 1.04.1989 г.]. Однако отсутствие надежного и эффективного способа длительного сохранения эмбрионов на этой стадии развития существенно ограничивает возможности метода трансплантации и сдерживает широкое внедрение его в практику.

В настоящее время перед сотрудниками отдела физиологии ВНИИК поставлена задача разработать метод криоконсервирования 8-дневных бластоцист лошади, который бы последовательно встраивался в отработанную технологию трансплантации эмбрионов лошадей. Для этого предложено было использовать метод витрификации, а также ранее разработанную в нашей лаборатории культуральную молочно-желточную среду в качестве витрификационной, а диметилсульфоксид (ДМСО) — в качестве криопротектора.

Программа научных исследований нашей группы включала на первом этапе выявление оптимальной концентрации криопротектора в витрификационной среде на основе морфологической характеристики размороженных эмбрионов и окрашивания их витальным красителем голубой Эванса. На втором этапе исследований определяли уровень приживляемости оттаянных эмбрионов после нехирургической пересадки их кобылам-реципиентам.

Материал и методика исследований. Опыты проводили на 2–3-летних кобылах кумысной фермы ВНИИК, условия кормления и содержания которых соответствовали зоотехническим нормам.

Эмбрионы извлекали из матки кобыл нехирургическим методом на 8-й день после овуляции, измеряли, оценивали по морфологическим признакам и помещали в культуральную молочно-желточную среду (МЖС) на 10 мин для адаптации. Затем эмбрионы насыщали криопротектором ДМСО, поэтапно повышая его концентрацию в МЖС-среде до 0,25М (I группа), 0,5М (II), 1,0М (III), 1,5М (IV) ДМСО. Соответственно было сформировано 4 опытные группы (с криопротектором) и одна

контрольная (без криопротектора). Время эквilibрации эмбрионов в средах с ДМСО на каждом этапе составляло 10 мин. Затем каждый эмбрион с малым количеством витрификационной среды заправляли в соломинку для трансплантации, закрывая его между двумя пузырьками воздуха. Оставшееся пространство в соломинке заполняли раствором 0,5% сахарозы и закупоривали с противоположной стороны стеклянным шариком. Соломинку помещали в штатив открытым концом вверх и опускали в жидкий азот.

Через сутки хранения соломинку извлекали из азота, выдерживали 8–10 с на воздухе и 20 с в воде (37°C), оставляя открытый конец соломинки над поверхностью воды. Содержимое соломинки выпускали в часовое стекло. Криопротектор выводили путем ступенчатого снижения его концентрации в среде с эмбрионом (по 10 мин на каждом этапе). Затем эмбрион отмывали от МЖС-среды в ФБС Дюльбекко, оценивали его качество, фотографировали с помощью микрофотонасадки МФН-11 и пересаживали в свежую МЖС-среду для дальнейшего культивирования. Через 24 ч культивирования при 37°C эмбрион отмывали от культуральной среды в ФБС Дюльбекко и оценивали по морфологическим признакам.

Окрашивание оттаянных эмбрионов проводили с помощью красителя голубой Эванса в концентрации 0,005% на базе ФБС Дюльбекко в течение 5–7 мин. Оценивали степень проникновения витального красителя под капсулу и в клетки зародыша.

Пересадку эмбрионов кобылам-реципиентам проводили хирургическим методом на 7-й день после овуляции по технологии, утвержденной во ВНИИ коневодства [Лебедев С.Г., 1994].

Результаты исследований. Из 10 эмбрионов, подвергнутых витрификации в среде с разным содержанием криопротектора ДМСО, наивысшую морфологическую оценку после размораживания имели эмбрионы в среде с самой низкой концентрацией ДМСО (0,25М) или вообще без криопротектора (контроль). Эти результаты были несколько неожиданными и не согласовывались с имеющимися в литературе данными: 24-часовое культивирование всех оттаянных эмбрионов в МЖС-среде закончилось их гибелью.

На следующем этапе экспериментов в двух опытных группах эмбрионов, витрифицированных в среде без криопротектора (опыт 1, n=4) или с 0,25М ДМСО (опыт 2, n=4), после размораживания сочли пригодными для пересадки лишь по 2 эмбриона. Все четыре пересадки оказались безуспешными. В то же время в двух контрольных пересадках свежеизвлеченных эмбрионов синхронизированным по фазе полового цикла реципиентам была установлена жеребость.

Тем не менее, неожиданные результаты, полученные нами на первом этапе исследований, были затем подкреплены результатом витального окрашивания. Краситель голубой Эванса слегка проникал в пространство под оболочкой бластоцист (0,25М ДМСО, n=2), но клетки трофо- и эмбриобласта оставались неокрашенными, что свидетельствует о жизнеспособности клеток эмбрионов. В пользу оптимистического прогноза говорит также дополнительный тест на жизнеспособность эмбрионов, который обеспечивает МЖС-среда: погибшие эмбрионы в ней тонут, а живые всплывают к поверхности. Размороженные зародыши лучших вариантов всплывали в МЖС-среде.

Продолжение экспериментов с привлечением более широкого материала позволит судить о достоверности полученных результатов и определить дальнейшие шаги в решении поставленной задачи. На сегодня нами апробирован только один криопротектор, одна витрификационная среда и один режим замораживания 8-дневных бластоцист лошадей. Наличие в размороженных эмбрионах живых клеток позволяет надеяться, что при оптимальном подборе основных компонентов среды и условий проведения процедуры витрификации количество сохранивших жизнеспособность клеток будет достаточным для того, чтобы эмбрион выжил в матке реципиента.

Выводы. 1. Морфологическая оценка замороженных методом витрификации 8-дневных эмбрионов лошадей снижается по мере увеличения концентрации криопротектора диметилсульфоксида в составе молочно-желточной витрификационной среды.

2. Оценка жизнеспособности 8-дневных витрифицированных эмбрионов лошади с помощью окрашивания витальным

красителем голубой Эванса (0,005%) подтверждает наличие живых клеток в размороженных эмбрионах.

1. Федюшкин А.Ф. Усовершенствование технологии криоконсервирования эмбрионов крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. — Дубровицы: ВИЖ, 1991. — 23 с.

2. Роды после ЭКО с переносом витрифицированных эмбрионов (описание случая) / Р.А. Шафеи, И.С. Кривохарченко, В.В. Заева и др. // Проблемы репродукции. — 2003. — № 2.

3. Allen W.R., Rowson L.E.A. Transfer of ova between Horses and Donkeys // 7-th Congr. Anim. Reprod. And Artif. Insem. — München, 1972. — V. 1. — P. 484–487.

4. Allen W.R., Rashed R.Z. Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation // J. Reprod Fertil. — 1984. — V. 71. — N 2. — P. 607–613.

5. Cochran R., Meintjes M. et al. Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares // J. of Equine veterinary Science. — 1998. — N 18, (11). — P. 736–740.

6. Experiments in the freezing and storage of equine embryos / Y. Yamamoto, N. Oguri, Y. Tsutsumi, Y. Hachinohe // J. Reprod. Fert. Suppl. — 1982. — V. 32. — P. 399–403.

7. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification // S. Hochi, T. Fujimoto, J. Braun, N. Oguri // Theriogenology. — 1994. — N 42. — P. 483–488.

8. Slade N.P., Takeda T. et al. A new procedure for the cryopreservation of Equine embryos // Theriogenology. — 1985. — V. 24, N 1. — P. 45–58.

9. Vajta G., Holm P. et al. Vitrification of porcine embryos using Open Pulled Straw (OPS) method // Acta Vet. Scand. — 1997. — V. 38. — P. 349–352.

10. Xihe Li, Lee H.-A. Morris, Allen W.R. In vitro development of horse oocytes reconstructed with the nuclei of fetal and adult cells // Biol. of Reprod. — 2002. — V. 66. — P. 1288–1292.

ВІТРИФІКАЦІЯ ЯК ЕТАП ТЕХНОЛОГІЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕМБРІОНІВ КОНЕЙ. Л.Ф. Лебедева, Н.В. Сидорова

З метою розробки методу криоконсервування 8-денних бластоцист коней апробовано метод вітрифікації із застосуванням молочно-жовткового середовища (МЖС) і криопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО). Культивування і пересадження вітрифікованих ембріонів кобилам-реципієнтам не дали позитивного результату.

VITRIFICATION AS A STAGE IN HORSE EMBRYO TRANSFER TECHNOLOGY. L. Lebedeva, N. Sidorova

To develop a new method of cryoconservation of 8 days old horse blastocysts it was approbated the vitrification method using milk-yolk medium (MYM) and dimethylsulphoxide (DMSO) as a cryoprotector. Culture and transfer of vitrified embryos to recipient mares had no positive results.

УДК 591.3:636.2

Л.В. МАДІСОН*

Національний аграрний університет

Є.Є. ЗАБЛУДОВСЬКИЙ**

Інститут розведення і генетики тварин УААН

**РЕЗУЛЬТАТИВНІСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ
ЕМБРІОНІВ І ТРИВАЛІСТЬ ЕМБРІОНАЛЬНОГО
РОЗВИТКУ ТЕЛЯТ-ЕМБРІОТРАНСПЛАНТАТІВ
ПОРОДИ АБЕРДИН-АНГУС**

На прикладі телят-ембріотрансплантатів породи абердин-ангус показано, що найбільшу частку мінливості ознаки тривалості ембріонального періоду визначають умови зовнішнього середовища, які опосередковані організмом реципієнта. Встановлено, що порода реципієнта незначною мірою впливала на приживлюваність ембріонів.

Трансплантація ембріонів, тривалість ембріогенезу, приживлюваність, реципієнт, велика рогата худоба

На сьогодні немає єдиної думки щодо співвідношення внеску спадкових і неспадкових чинників у мінливість ознаки тривалості

* Науковий консультант — доктор сільськогосподарських наук В.І. Шеремета.

** Науковий керівник — доктор сільськогосподарських наук Б.Є. Подоба.

© Л.В. Мадісон, Є.Є. Заблудовський, 2006

Розведення і генетика тварин. 2006. Вип. 40.