

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ОТОГРЕВАНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ПОЛУЧЕННЫХ IN VITRO, НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВИТРИФИКАЦИИ В ТРИАЦЕТАТЦЕЛЛЮЛОЗНОМ ПОЛОМ ВОЛОКНЕ

Маленко Г.П., Корниенко Е.В., Романова А.Б., Косовский Г.Ю.  
ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий», г. Москва, Россия

**Введение.** Ежегодно в мире получают сотни тысяч эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* (*in vitro* production, IVP). При этом в отличие от эмбрионов, полученных *in vivo*, лишь незначительная часть IVP эмбрионов подвергается криоконсервации (Blondin, 2015), основная же часть трансплантируется непосредственно после их получения. Вследствие этого подготовленные реципиенты и/или эмбрионы часто используются нерационально (Pontes et al., 2011). Основной причиной, по которой IVP эмбрионы крупного рогатого скота на практике не подвергаются криоконсервации, является низкая эффективность программируемого замораживания этих эмбрионов (Blondin, 2015).

Альтернативой программируемому замораживанию для IVP эмбрионов крупного рогатого скота может служить метод витрификации. При витрификации, помимо устранения риска образования кристаллов льда в криоконсервируемом объекте, уменьшаются и холодовые повреждения таких внутриклеточных структур ооцитов и эмбрионов, как цитоскелет, мембраны органелл или липидные капли, за счет сверхвысокой скорости прохождения через критическую температурную зону в интервале от +15 до -5 °С. В результате витрификация оказывается более щадящим и, соответственно, более эффективным методом криоконсервации, по сравнению с медленным программируемым замораживанием, таких криочувствительных объектов, как ооциты млекопитающих, эмбрионы свиньи, IVP эмбрионы крупного рогатого скота.

Современные методы витрификации с доказанной высокой эффективностью основываются на принципе охлаждения минимального объема (*minimum volume cooling*; MVC), когда при общем объеме не более 0,1 мкл объект охлаждается и отогревается с ультравысокой скоростью. Метод MVC успешно соблюдается при витрификации 1–2 ооцитов или эмбрионов на носителях открытого типа, например, Cryotop (Kitasato Supply Co., Япония). В настоящее время витрификация является основным методом криоконсервации ооцитов и эмбрионов в системе вспомогательных репродуктивных технологий человека, но несмотря на всю перспективность ввиду некоторых технол.

Matsunari et al. (2012) был предложен метод групповой витрификации эмбрионов млекопитающих в триацетатцеллюлозном полом волокне (*hollow fiber vitrification*, HFV), который оказался эффективен для криоконсервации таких криочувствительных объектов, как полученные *in vivo* и *in vitro* эмбрионы свиньи. Метод HFV позволяет существенно упростить и стандартизировать процедуры обработки эмбрионов в растворах витрификации и отогревания с соблюдением принципа охлаждения в минимальном объеме (Matsunari et al., 2012). Дальнейшее упрощение процедуры, например, за счет снижения температуры отогревания эмбрионов до комнатной (22–24 °С), в сочетании с удобным и простым в изготовлении устройством витрификации на основе полого волокна может сделать HFV метод более перспективным при внедрении в практику сельского хозяйства, чем другие методики витрификации.

**Целью** данной работы являлось изучение влияния температуры раствора отогревания (22–24 °С или 39 °С) на эффективность витрификации в триацетатцеллюлозных полых волокнах IVP эмбрионов крупного рогатого скота в возрасте семи суток.

**Материалы и методы исследований.** В работе, кроме оговоренных случа-

ев, были использованы реактивы фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Ооциты выделяли из антральных фолликулов яичников крупного рогатого скота, полученных на мясокомбинате. Ооциты с равномерно гранулированной ооплазмой, окруженные многослойным кумулюсом (КОК), инкубировали в среде M-199, с добавлением пирувата натрия, L-глутамина, L-цистеина, хорионического гонадотропина, ФСГ, эстрадиола-17 $\beta$  и 10% фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота (ФСК), в течение 22–23 часов в атмосфере с 7% CO<sub>2</sub> при температуре 38,5°C. После созревания КОК переносили в среду оплодотворения TALP-Fert. Сперматозоиды для оплодотворения выделяли из криоконсервированного семени быка по методу swim-up. Через 18–20 часов после начала оплодотворения предполагаемые зиготы освобождали от клеток кумулюса и переносили в среду SOF. Культивирование эмбрионов проводили при температуре 38,5°C в атмосфере 5,6% CO<sub>2</sub>, 5,7% O<sub>2</sub>, 88,7% N<sub>2</sub>. День проведения IVF считали нулевым. В возрасте 7 дней оценивали развитие эмбрионов. В эксперименте использовали морфологически нормальные эмбрионы, достигшие стадии развития бластоцисты.

В качестве носителя использовали отрезок триацетатцеллюлозного полого волокна (внутренний диаметр 200 мкм, наружный диаметр 230 мкм, величина пор 7 нм; Nipro, Japan), присоединенный к коническому кончику стеклянного капилляра. Витрификацию эмбрионов проводили в соответствии с методом, предложенным Kuwayama et al. (2005). Отобранные бластоцисты инкубировали в двух сменах среды TALP-HEPES с 20% ФСК (TH20) в течение 10 минут. Затем бластоцисты переносили в раствор эквilibрации, содержащий 7,5% этилен гликоля (ЭГ) и 7,5% диметилсульфоксида (ДМСО), и помещали в устройство для витрификации группами по 5–10 эмбрионов. Общее время инкубации в растворе эквilibрации составляло 5 минут. Затем полое волокно, содержавшее бластоцисты, переносили в раствор витрификации, содержащий 0,5 М сахарозы, 15% ЭГ и 15% ДМСО, и инкубировали в течение 60 секунд, после чего волокно погружали в жидкий азот.

При отогревании одной группы эмбрионов полое волокно переносили из жидкого азота в раствор отогревания комнатной температуры (22–24°C), содержащий 1 М сахарозы. Кончик стеклянного капилляра отламывали, а волокно с эмбрионами инкубировали в течение 60 секунд. Затем полое волокно последовательно инкубировали в растворе разбавления с 0,5 М сахарозы и двух сменах TH20. В последнем растворе бластоцисты выгружали из полого волокна. Вторую группу отогревали при 39°C, а затем проводили через ту же последовательность растворов. Затем эмбрионы переносили в среду SOF и культивировали в течение 72 часов. Уровень восстановления эмбрионами исходного объема регистрировали через 24 ч. и выхода эмбрионов из блестящей оболочки регистрировали через 24 ч. после отогревания, уровень выхода эмбрионов из блестящей оболочки - через 72 часа. Результаты представлены в виде среднего процента восстановившихся эмбрионов или вышедших бластоцист от числа витрифицированных бластоцист  $\pm$  стандартное отклонение. В оценке полученных результатов использовался t-критерий Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение.** Для предотвращения криоповреждений эмбрионов млекопитающих при витрификации высокая скорость отогревания является более важным условием, чем скорость охлаждения (Seki and Mazur, 2008; Mazur and Seki, 2011). Для достижения максимально высокой скорости отогревания в большинстве случаев носитель с витрифицированными эмбрионами непосредственно из жидкого азота перемещается в раствор отогревания, температура которого составляет 37–39°C, обычно не превышая температуру тела конкретного вида животных. Однако при использовании носителей открытого типа, позволяющих соблюдать принцип MVC, скорость нагревания витрифицированного образца объемом 0,1 мкл составляет 117500°C/мин при температуре раствора отогревания 23°C (Mazur and Seki, 2011). Такая скорость в данных условиях позволяет нивелировать отрицательные эффекты рекристаллизации и получить высокий уровень выживания ооцитов мыши вне зависимости от скорости охлаждения образца (Mazur and Seki, 2011). В свою очередь, объем раствора, содержащего эмбрионы, внутри полого волокна (0,02–0,04 мкл) также позволяет соблюсти принцип MVC. Кроме того,

считается, что особенности строения самого волокна (триацетатцеллюлозная стенка толщиной 15 мкм, наличие пор, позволяющих жидкому азоту контактировать с образцом) обеспечивает высокую скорость охлаждения и нагревания образца, сопоставимую со скоростью, получаемой на носителях открытого типа (Matsunari et al., 2012).

Нами были проведены сравнительные эксперименты по отогреванию витрифицированных в полном волокне групп эмбрионов крупного рогатого скота в растворах при комнатной температуре (22–24°C) и при 39°C. Через 24 часа культивирования после отогревания в растворе при температуре 22–24 или 39°C восстановило свой объем 82,65±11,62% эмбрионов (159/191; 14 повторов) и 88,73±5,99% эмбрионов (64/73; 7 повторов) соответственно. Уровень вылупления через 72 часа культивирования составил 53,77±22,37% после отогревания при 22–24°C и 64,74±12,74% при 39°C. Статистически достоверных различий между экспериментальными группами по этим показателям не выявлено. При этом отогревание при 22–24°C может способствовать снижению зависящего от температуры цитотоксического воздействия криопротекторов, концентрация которых высока как в витрифицированных эмбрионах, так и в окружающем их растворе. Отогревание витрифицированных эмбрионов при комнатной температуре более технологично при практическом использовании данной технологии, например, в условиях животноводческих комплексов.

**Выводы.** Для отогревания витрифицированных blastocyst может быть использован раствор при комнатной температуре (22–24°C). Такая температура отогревания может способствовать снижению зависящего от температуры цитотоксического воздействия криопротекторов, концентрация которых после витрификации высока и в клетках эмбриона, и в окружающем их растворе. При этом отогревание витрифицированных эмбрионов при комнатной температуре более технологично.

*Литература.* 1. Blondin P. Status of embryo production in the world. *Anim Reprod* 2015;12:356–358. 2. Matsunari H., Maehara M., Nakano K., Ikezawa Y., Hagiwara Y., Sasayama N., Shirasu A., Ohta H., Takahashi M., Nagashima H. Hollow fiber vitrification: A novel method for vitrifying multiple embryos in a single device. *J.Reprod Dev* 2012;58:599–608. 3. Mazur P., Seki S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to –196°C at 95 to 70,000°C/min and warmed at 610 to 118,000°C/min: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*. 2011 ; 62 : 1–7. 4. Pontes J. H., Melo Sterza F. A., Basso A. C., Ferreira C. R., Sanches B. V., Rubin K. C., Seneda M M Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011 ; 75 : 1640 – 1646. 5. Seki S., Mazur P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice *Biol. Reprod.* 2008 ; 79 : 727 – 737.

УДК 644.3-012.2:621.12

## САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВОДЫ ДЛЯ ПОЕНИЯ ЖИВОТНЫХ НА МОЛОЧНОЙ ФЕРМЕ

**Назаренко С.Н.**

*Сумский национальный аграрный университет, г. Сумы, Украина*

**Введение.** Вода для организма животного является постоянной средой, в которой происходят все обменные процессы. Содержание воды в организме животных составляет 60-70%.

Она участвует в почти всех биохимических реакциях, которые происходят в организме, поскольку лишь в водной среде осуществляются процессы ассимиляции, диссимиляции, диффузии, осмоса. Там же происходят окисление, гидролиз и другие реакции обмена веществ. Вода в клетках и тканях выступает как разбавитель и растворитель питательных веществ и продуктов обмена. В ней осуществля-