

# Оценка качества и устойчивости к криоконсервации эмбрионов коз в зависимости от стадии развития

*П.В. Аксёнова, к.б.н., Северо-Кавказский зональный НИВИ РАСХН; А-М.М. Айбазов, д.с.-х.н., профессор, Ставропольский НИИЖК РАСХН; М.С. Сеитов, д.б.н., профессор, Оренбургский ГАУ*

Эффективность трансплантации зависит от комплекса факторов, в том числе в значительной степени от корректной оценки качества извлечённых эмбрионов. Критерии объективной оценки жизнеспособности эмбрионов ещё недостаточно разработаны [6]. В существующих методах оценки эмбрионов (в основном это касается эмбрионов человека, мышей и кроликов) большое значение придаётся морфологической дифференциации.

Одним из эффективных приёмов биотехнологии воспроизводства, направленных на сохранение генофонда высокоценных животных, является метод криоконсервации гамет. Технология замораживания спермиев различных животных достаточно хорошо разработана и успешно применяется в науке и практике животноводства, в том числе и в

международных экспериментах, созданы криобанки спермы [1–3]. Что касается криоконсервации эмбрионов, то этот метод не нашёл широкого применения в России из-за низкой выживаемости и приживляемости дефростированных зигот.

Преимущество криохранилища (банка) эмбрионов перед банком половых клеток заключается в том, что эмбрион представляет собой особь, пусть и состоящую из небольшого количества клеток. После размораживания его достаточно пересадить самкам-реципиентам, чтобы родилось потомство. За рубежом криоконсервация эмбрионов применяется уже несколько десятилетий (в основном в скотоводстве), однако до сих пор ещё нельзя однозначно трактовать её как собственно технологию, слишком вариабельны результаты и велик процент брака [7]. В России предпринимались попытки криоконсервировать эмбрионы крупного рогатого скота, однако они не нашли широкого применения.

Впервые попытки замораживания эмбрионов у коз были предприняты нами в 2011 г. [4]. При работе

с определённым видом животных вдобавок к общепринятым методам криоконсервации зародышей и гамет появляется необходимость разрабатывать целый пакет репродуктивных технологий, наиболее подходящий именно для этого вида.

**Объекты и методика исследования.** Исследования проводили на опытной станции Ставропольского НИИЖК Россельхозакадемии. В конце полового сезона, в декабре, были отобраны козы – доноры и реципиенты. У коз-доноров индуцировали полиовуляцию по оригинальной схеме: для синхронизации полового цикла в качестве пролонгаторов лютеиновой фазы использовали ушные импланты «Крестар» (действующее вещество норгестамет); для её прерывания и стимуляции оогенеза – «Фоллигон» в дозе 500 ед. и «Оваген» в общей дозе 8 мл. Синхронность овулирования созревших фолликулов обеспечивали применением «Хоруллона» – 300 ед.

В качестве среды для культивирования использовали собственную среду для криоконсервации эмбрионов коз [5]. Отмывку оттаянных ооцитов/эмбрионов после криопротектора и их дальнейшее культивирование осуществляли в той же среде. В качестве криопротектора применяли глицерин.

Для замораживания отбирали оплодотворённые ооциты, эмбрионы на стадии двух, четырёх и более бластомер, а также эмбрионы, достигшие стадии морулы. После эквilibрации гамет помещали в пайеты (соломинки) для замораживания спермы. Соломинки после фасовки в них гамет запаивали ультразвуком, используя для этого линию по криоконсервации IMV (Франция). Оттаивание пайет проводили в водяной бане при 40°C.

**Результаты исследования.** В первом эксперименте сравнили два метода криоконсервации:

- контролируемой медленной криоконсервации (после эквilibрирования эмбрионов в глицериновых растворах разной концентрации);
- ускоренной криоконсервации (в режиме: от +4 до -5°C со скоростью 4°C/мин, от -5 до -110°C

со скоростью 25°C/мин, от -110 до -140°C со скоростью 35°C/мин).

Результаты эксперимента отражены в таблице 1.

В результате замораживания первым способом 8 из 10 ооцитов и 5 из 10 эмбрионов после дефростации подверглись необратимой деструкции.

При ускоренном замораживании в предложенном нами режиме из 7 ооцитов и 6 эмбрионов необратимой деструкции подверглись 2 ооцита. Остальные ооциты и эмбрионы в течение 4–6 ч. после оттаивания восстановили свою форму и объём, однако при дальнейшем культивировании погибали в течение 1–2 суток.

В следующем эксперименте определяли устойчивость эмбрионов к криоконсервации в зависимости от их стадии развития. С учётом предыдущего опыта применили ускоренный метод криоконсервации.

Результаты эксперимента представлены в таблице 2.

По таблице видно, что восстановление формы и размера происходило у 100% ооцитов, в то время как все 6–8-бластомерные зародыши погибли. Через 48 час. культивирования лишь 60% ооцитов и 50% 2–4-бластомерных эмбрионов остались жизнеспособными.

В эксперименте отмечен интересный факт, требующий своего объяснения, – эмбрионы на стадии морулы снова приобретали способность переносить глубокое замораживание.

В основу оценки качества эмбрионов коз была положена общепринятая классификация эмбрионов по качеству:

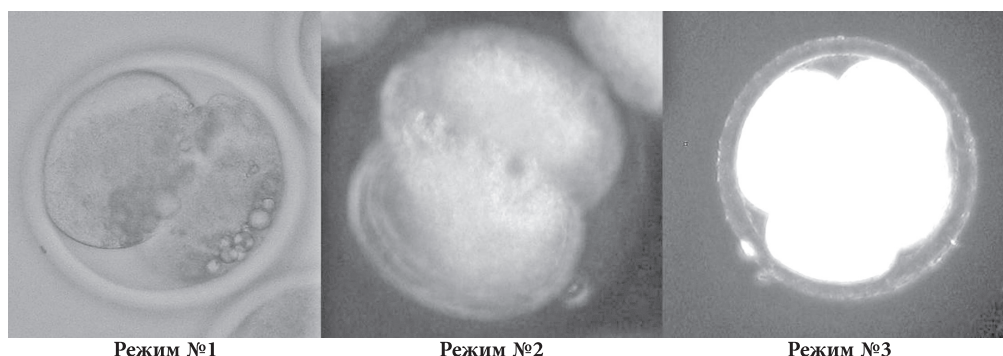
1-й день развития. Оценивается наличие признаков оплодотворения и качество зигот. Наличие в яйцеклетке 2 пронуклеусов (PN) и 2 полярных тел (PB) указывает на нормальное развитие процесса оплодотворения. Отмечают: размер и симметричность пронуклеусов, число, количество, равномерность и распределение нуклеолей, включения цитоплазмы.

1. Результаты криоконсервации эмбрионов коз при медленном и ускоренном режимах

Время культивирования после дефростации	Медленная криоконсервация		Ускоренная криоконсервация	
	оплодотв. ооциты (n=10)	2–4-бласт. эмбрионы (n=10)	оплодотв. ооциты (n=7)	2–4-бласт. эмбрионы (n=6)
Восстановление формы и размера, шт/%	2/20	5/50	5/71,4	6/100
Через 24 ч., шт/%	0/0	0/0	2/28,5	1/16,7
Через 48 ч., шт/%	0/0	0/0	0/0	0/0

2. Результаты криоконсервации эмбрионов разного возраста

Время культивирования после дефростации	Стадия развития и выживаемость эмбрионов				
	оплодотв. ооциты (n=5)	2-бласт. эмбрионы (n=4)	4-бласт. эмбрионы (n=4)	6–8-бласт. эмбрионы (n=2)	морулы (n=3)
Восстановление формы и размера, шт/%	5/100	3/75	3/75	0/0	2/66,6
Через 24 ч., шт/%	5/100	3/75	2/50	–	1/33,3
Через 48 ч., шт/%	3/60	2/50	2/50	–	1/33,3



Режим №1

Режим №2

Режим №3

Рис. – Различные фазовые режимы микроскопии

2-й день развития. На 2-е сутки после слияния генетического материала сперматозоида и яйцеклетки происходит первое дробление. Отмечают степень фрагментации, форму и относительные размеры бластомеров:

тип А – эмбрион отличного качества без ануклеарных (безъядерных) фрагментов (4А);

тип В – эмбрион хорошего качества с содержанием ануклеарных фрагментов до 20% (4В);

тип С – эмбрион удовлетворительного качества с содержанием ануклеарных фрагментов от 21 до 50% (4С);

тип D – эмбрион неудовлетворительного качества с содержанием ануклеарных фрагментов более 50% (4D).

3-й день развития. Эмбрион состоит из 6–8 бластомеров.

4-й день развития. Эмбрион состоит из 10–14 бластомеров, межклеточные контакты уплотняются и поверхность эмбриона сглаживается (процесс компактизации) – стадия морулы.

Наряду с общепринятой классификацией эмбрионов по качеству нами предлагается:

1) учитывать видовые особенности эмбрионов коз/оплодотворённой яйцеклетки до слияния пронуклеусов;

2) новый способ микроскопии эмбриона/оплодотворённой яйцеклетки до слияния пронуклеусов;

3) функциональную диагностику жизнеспособности эмбриона/ оплодотворённой яйцеклетки до слияния пронуклеусов.

В процессе экспериментов были установлены следующие видовые особенности в морфологии эмбрионов коз:

– яйцеклетка и ранний эмбрион покрыты обильным слоем внутриклеточного жира. Для объективной оценки и работы с клетками необходимо их обязательное центрифугирование;

– мужской и женский пронуклеусы в оплодотворённой яйцеклетке козы одного размера, ядрышки при световой микроскопии, как правило, не различимы.

Для того чтобы удостовериться в жизнеспособности эмбрионов, рекомендуем трёхрежимное микроскопическое обследование при различных фазовых режимах микроскопа (рис.).

Режим № 1 позволяет увидеть эмбрион в проходящем свете. При этом различимы бластомеры, оолема и жировые капли под оолеммой. Режим № 2 – тёмный фон при зелёном светофильтре – скрывает мембраны. Здесь хорошо видны плотность и однородность клеточной массы, вакуолизация (если есть), различные дефекты бластомер. Режим № 3 показывает целостность и дефекты клеточных мембран.

Заключительным этапом исследования критериев оценки качества эмбрионов мы рекомендуем культивирование эмбриона/оплодотворённой яйцеклетки в инкубаторе в 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 суток при 39°C. Если эмбрион продолжает развитие, он считается пригодным для криоконсервации.

Таким образом, в результате экспериментов были установлены дополнительные критерии оценки качества эмбрионов коз, доказана принципиальная возможность обратимого анабиоза гамет коз после криоконсервации при сверхнизких температурах (-196°C) и определены оптимальные параметры режима криоконсервации. Наилучшая устойчивость к криоконсервации была отмечена у ооцитов и 2–4 бластомерных эмбрионов, а также у морул.

### Литература

1. Айбазов М.М., Аксенова П.В., Ашурбегов К.К. и др. К вопросу о сохранении генофонда и биологической полноценности криоконсервированной спермы // Животноводство и кормопроизводство: сб. науч. тр. Вып. 4. Ставрополь: СНИИЖК, Россельхозакадемия, 2011. С. 24–29.
2. Аксенова П.В. Научные основы интенсификации воспроизводства коз: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Новочеркасск: СКЗНИВИ, 2012. 51 с.
3. Малмаков Н.И., Сейтпан К., Хамзин К.П. и др. Результаты ягнения после внутриматочного осеменения овец замороженной-оттаянной спермой, импортированной из Новой Зеландии и США // Сборник научных трудов СНИИЖК. Ставрополь, 2012. Вып. 5. С. 59–62.
4. Отчёт о НИР. ГНУ СНИИЖК Россельхозакадемии. Ставрополь, 2011. 12 с.
5. Патент на изобретение «Среда для культивирования доимплантационных эмбрионов коз in vitro» / П.В. Аксенова, А-М.М. Айбазов (РФ). № 2396344. Заявка 2008152992. Приоритет 31 августа 2008 г. Зарегистрировано в Госреестре изобретений РФ 10 августа 2010 г. 2 с.
6. M. Ludwig, S. Al-Hasani, R. Feiberbaum e.a. Newer aspects of cryopreservation of oocytes and embryos in assisted reproduction and future perspectives / Ludwig M., Al-Hasani S., Feiberbaum R., Diedrich K. // Hum Reprod. 1999, 1. P. 162–85.
7. Stecher, P. Väderzwalmen, I. Riedler, N. Zech, H. Zech / Vitrification of human embryos on height stage of development // Institute fur Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, Austria.- 1999. V. 11. N 1. P. 104.