

ВЛИЯНИЕ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКИХ КЛЕТОК НА ПРИЖИВЛЯЕМОСТЬ ЭМБРИОНОВ ПРИ СОВМЕСТНОЙ ПЕРЕСАДКЕ ТЕЛКАМ-РЕЦИПИЕНТАМ

Н.И. Сергев, А.И.Абилов
ГНУ ВНИИЖ Россельхозакадемии

Изложены результаты исследований влияния замораживания и оттаивания на жизнеспособность эмбрионов путем добавления трофобластических клеток к эмбриону при пересадке. Предполагается, что клетки трофобласта вырабатывают протеин, который обеспечивает между 14-16 днями быстрый рост трофобластической ткани в этот период.

Ключевые слова: телка-реципиент, трофобластические клетки, эмбрион, эмбриотрансплантация.

Практическая эмбриотрансплантация широко использует криоконсервирование. Разработаны упрощенные методы замораживания и оттаивания эмбрионов, позволяющие их пересаживать в условиях ферм. Однако пересадка эмбрионов, подвергавшихся культивированию или замораживанию, приводит к снижению жизнеспособности и повышению смертности по сравнению с пересадкой свежеполученных эмбрионов.

Гистологические исследования показали, что 28 % эмбриональных клеток и 22, 9 % трофобластических клеток дегенерируют после замораживания и оттаивания. После пересадки эмбрионов в матку реципиента сохранение функционального желтого тела непосредственно зависит от интенсивности эмбриональных сигналов, посылаемых в яичник. Процент стельности выше после двойной пересадки, в сравнении с одной или после пересадки половинки эмбриона. Это подтверждает, что интенсивность и качество эмбриональных сигналов важны для сохранения стельности.

Биологические взаимодействия, так называемые сигналы между эмбрионом, маткой и яичниками, связаны с числом и качеством пересаживаемых клеток эмбрионов. Коммерческие пересадки эмбрионов крупного рогатого скота ставят цель улучшить генетический потенциал. Но здесь возможна пересадка двух эмбрионов и получение двоен, что связано с риском возникновения фримартинизма. Пересадка трофобластических клеток совместно с эмбрионом снижает потери жизнеспособности, вызванную глубоким замораживанием.

Целью исследования явилось определение возможности снижения негативного влияния замораживания и оттаивания на жизнеспособность эмбрионов путем добавления трофобластических клеток к эмбриону при пересадке.

Материалы и методы исследований. Работа выполнена в отделе биологии воспроизводства и трансплантации эмбрионов с.-х. животных ВИЖа с использованием коров черно-пестрой породы.

Эмбрионы и трофобластические клетки были получены от коров-доноров черно-пестрой породы. Эмбрионы замораживали в лаборатории, пересадки осуществляли телкам-реципиентам на ферме в течение двух месяцев.

Эмбрионы получали от коров с супер овуляцией, которую вызывали инъекцией гормона ФСГ в дозе, согласно рекомендуемой инструкции. Извлекали

эмбрионы не хирургическим методом на седьмой день после охоты и искусственного осеменения.

Рога матки промывали средой Дюльбекко с добавлением 0,2%-го сывороточного альбумина. После извлечения эмбрионы оценивали по морфологическим признакам. От каждого донора замораживали только нормальные, ранние и поздние бластоцисты хорошего и отличного качества. Для замораживания использовали общепринятый стандартный метод.

После эквilibрации в растворе 1,4 М глицерина каждый эмбрион помещали в отдельную пластиковую мини-соломинку, закрывали пластиковой пробкой, маркировали и помещали горизонтально в камеру программного замораживателя с жидким азотом. После охлаждения соломинок до -7°C со скоростью $0,5^{\circ}\text{C}$ в минуту; вызывали льдообразование и охлаждали соломинки медленно, со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}$ в минуту до -30°C , затем погружали в жидкий азот.

Эмбрионы хранили от одной недели до нескольких месяцев до оттаивания и пересадки.

Оттаивание эмбрионов было быстрое, которое достигалось путем погружения из жидкого азота в водяную баню при 37°C на одну минуту. Разбавление глицерина было одноступенчатое 0,25 % сахарозой.

В качестве трофобластических клеток использовали поздние четырнадцатидневные эмбрионы, которые делили на несколько фрагментов, затем культивировали в течение 24 часов при 38°C в 50 мл среды Дюльбекко в контролируемых газовых условиях (20 % кислорода, 5 % CO_2 , 75 % азота). Во время культивирования трофобластических клеток изменяли сферические везикулы. Эти трофобластические клетки замораживали и хранили в жидком азоте до пересадки.

При замораживании глицерин добавляли в три ступени (0,4 М; 0,8 М; 1,2 М). После эквilibрации несколько клеток помещали в 0,5мл соломинки (из-за большого их диаметра). Режим замораживания был таким же, что и при замораживании бластоцист. Оттаивание было быстрое.

Для разбавления использовали сахарозу. Клетки исследовали под бинокулярным микроскопом и оценивали по морфологическим показателям. И только неповрежденные сферические клетки использовали для пересадки.

В опыте использовали 20 телок черно-пестрой породы в качестве реципиентов. Синхронизацию охоты у телок вызывали двумя инъекциями простагландина (эструмат) в дозе по 500 мг. Телок-реципиентов, проявивших охоту, разделяли на две группы – опытную и контрольную. При этом проводили исследование степени синхронизации по наличию желтого тела в одном из яичников.

Бластоцисты от одних и тех же доноров после оттаивания равно разделяли на две группы реципиентов. Морфологическую оценку качества эмбрионов перед пересадкой не проводили. Пересадки осуществляли на седьмой день индуцированного цикла в одних и тех же условиях, на одной и той же ферме, с применением одной и той же технологии, нехирургическим методом с использованием модифицированного катетера Кассу.

В опытной группе использовали 10 телок. Каждому реципиенту пересаживали одну заморожено-оттаянную бластоцисту с двумя замороженно-оттаянными трофобластическими неповрежденными клетками. Размещали их в рог матки на стороне желтого тела в яичнике. Телкам контрольной группы

пересаживали только одну бластоцисту в рог матки на стороне желтого тела в яичнике.

После пересадки каждый реципиент опытной и контрольной группы два раза в день проверяли на наличие охоты. На 21 день брали кровь (10 мл) для раннего определения стельности по концентрации прогестерона. Реципиенты с уровнем прогестерона в плазме крови больше 1 нг/мл и отсутствием охоты на 1 день считались стельными.

Ректальные исследования каждого реципиента на стельность проводили на 45 и 60 дни стельности.

Результаты исследований. Результаты показали, что исходный уровень стельности на 21 день – 45 и 60 %, к 60 дню процент стельности снижается как в опытной, так и контрольной группах.

В опытной группе из 10 реципиентов стали стельными 6 телок (60 %). В контрольной группе из 10 стали стельными 4 реципиента (40 %). Более растянутые циклы были у телок опытной группы. Задержка повторного цикла охоты у нестельных реципиентов составила 32 дня, а в контрольной группе – 22,8 дня.

Эти продолжительные циклы у некоторых телок до 50 дней, которых признавали не стельными на 45 день, при ректальном исследовании, возможно, обусловлены развитием *in vivo* одного трофобластического пузырька.

Пересадка одной замороженной бластоцисты с трофобластическим пузырьком усиливает эмбриональные сигналы и 70 % реципиентов были стельными на 21 день, большинство их сохраняли стельность и на 45 день. Эта первоначальная стельность была схожа с результатами стельности от пересадки двух замороженных бластоцист и была очень схожа с результатами искусственного осеменения.

Уровень стельности не увеличивался после инъекции хорионического гонадотропина реципиентам после пересадки эмбрионов на 18-20 день и после искусственного осеменения.

Введение реципиентам прогестерона между 10 и 20 днями не способствовало повышению уровня стельности. Экзогенный прогестерон может вызывать регрессию желтого тела, даже после начала продукции простагландина в матке, или снижать секрецию гонадотропина.

В опытной группе смертность эмбрионов происходила в другое время (после 45 дня). В отличие от контрольной группы, потери эмбрионов в опыте происходили между 21 и 45 днями.

Добавление трофобластических клеток во время пересадки позволяет использовать заморожено-оттаянные бластоцисты с ограниченным числом живых клеток. Добавлением двух трофобластических пузырьков можно модифицировать соотношение эмбриональных дисков и трофобластических клеток, но при этом нельзя утверждать, что эти трофобластические везикулы положительно воздействуют и оказывают непосредственное влияние на эмбриональные клетки пересаженных бластоцист.

Трофобластические пузырьки способны удлиняться, расширяться даже если пересаженная бластоциста погибает, этим вероятно можно объяснить появление удлиненных циклов у нестельных реципиентов опытной группы. Однако трофобластические пузырьки приготовленные из поздних стадий эмбрионов (17-18 день) не эффективны для сохранения желтого тела, хотя больше везикул можно приготовить из одного эмбриона.

Наблюдения показали, что состояние секреторных клеток, полученных из эмбрионов после 16-18 дня и культивирования в среде и помещенных в матку циклических телок, удлиняет функция желтого тела. На этой стадии некоторые эмбриональные клеточные диски сравнивают с полными эмбриональными мембранами.

Вывод. Антилютеолитический или лютеотропный фактор, очевидно, имеет трофобластическое происхождение. Возраст трофобластических тканей не имеет большого значения, в то время как трофобластические пузырьки 14-дневных эмбрионов совершенно асинхронны с состоянием реципиента на 8-й день эстрального цикла. Необходимы дальнейшие исследования по определению специфических факторов, ответственных за сохранение желтого тела. Можно предположить, что клетки трофобласта вырабатывают протеин, который обеспечивает между 14-16 днями быстрый рост трофобластической ткани в этот период. Потери при глубоком замораживании связаны с частичным нарушением функциональной активности эмбриональных клеток.

ВПЛИВ ТРОФОБЛАСТИЧНИХ КЛІТИН НА ПРИЖИВЛЮВАНІСТЬ ЕМБРІОНІВ ПРИ СПІЛЬНОМУ ПЕРЕСАДЖЕННІ ТЕЛИЦЯМ-РЕЦИПІЄНТАМ

Н.І. Сергєєв, А.І. Абїлов, ДНУ ВНДІТ Россільгоспакадемії

Викладено результати досліджень впливу заморожування і відтавання на життєздатність ембріонів шляхом додавання трофобластичних клітин до ембріона при пересадженні. Передбачається, що клітини трофобласту виробляють протеїн, який забезпечує швидкий ріст трофобластичної тканини в цей період, між 14-16 добою.

Ключові слова: телиця-реципієнт, трофобластичні клітини, ембріон, ембріотрансплантація.

THE TROPHO-BLAST CELL IMPACT ON EMBRYO ADAPTABILITY THE SIMULTANEOUS HEIFER-RECIPIENT ET PROCEDURE

N. Sergev, A. Abilov , Russian agricultural academy

This article highlights the experimental research results of the freezing and thawing method impact on embryo viability. The tropho-blast cells were added by the embryo transplantation procedure. The above-mentioned cells proved to produce protein. Albumen procures healthy growth of the tropho-blast tissue during 14-16 days span.

Key words: heifer-recipient, tropho-blast cells, embryo, embryo transplantation (ET)