

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И  
РАЗВЕДЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ-ФИЛИАЛ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЖИВОТНОВОДСТВА-  
ВИЖ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Л.К. ЭРНСТА» (ВНИИГРЖ)

## **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

по экстраовариальной витрификации соматических и половых  
клеток фолликулов сельскохозяйственных животных для сохранения  
генофонда и создания криобанка ценных и исчезающих пород и видов

*От ооцита к эмбриону*

**Санкт-Петербург-Пушкин  
2022 г.**

УДК 612.622.089.67

К89

**Кузьмина, Т.И.** Методические рекомендации по экстраовариальной витрификации соматических и половых клеток фолликулов из яичников сельскохозяйственных животных для сохранения генофонда и создания криобанка ценных и исчезающих пород и видов / Т.И. Кузьмина, Н.А. Волкова. – Дубровицы, ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2022. – 48 с.

Рекомендации рассмотрены и утверждены на ученом совете ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства - ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», протокол №15 от 18 ноября 2021 года

Рекомендации могут быть использованы: сотрудниками НИЦ при проведении научных исследований (витрификация репродуктивного материала, клонирование, трансгенез, создание линий эмбриональных стволовых клеток), специалистами биотехцентров репродукции для практического применения клеточных технологий в репродукции млекопитающих, аспирантами и студентами сельскохозяйственных, ветеринарных, медицинских высших учебных заведений в учебном процессе при проведении лекционных и практических занятий по дисциплинам курса репродуктивной биотехнологии.

**ISBN 978-5-902483-70-0**

© ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2022 г.

© ВНИИГРЖ, 2022 г.

# СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ .....	6
1.1    Фундаментальные аспекты витрификации клеток животных .....	6
1.2    Структурно-функциональные особенности наночастиц высокодисперсного кремнезема, диметилглицеролата кремния и эффекты их воздействия на клетки животных.....	10
1.3    Материалы и методы. Структурно-логические схемы экспериментов .....	14
1.3.1    Протоколы витрификации ооцит-кумулясных комплексов.....	15
1.3.2    Методы оценки криорезистентности соматических и половых клеток.....	18
1.3.3    Показатели криорезистентности соматических и половых клеток животных при воздействии кремнийсодержащих соединений.....	20
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	31
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	34
1.    Список сокращений .....	34
2.    Список реагентов .....	35
3.    Приготовление сред и растворов.....	36
3.1    Прописи приготовления сред PBS.....	37
3.2    Приготовление среды для отмывания ооцитов .....	38
3.3    Среда для капситаии спермы (модифицированная среда Тироде без кальция) .....	38
3.4    Приготовление раствора для увеличения подвижности сперматозоидов (пенициллин-гипотаурин-эпинефрин, PHE) .....	39
3.5    Приготовление криопротекторных сред и сред для культивирования с использованием нВДК и ДМГК .....	40
3.6    Приготовление криопротекторных сред и сред для культивирования с использованием нВДК и ДМГК .....	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	44

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время биотехнологические подходы для решения проблем в воспроизводстве животных основываются на тандеме клеточных репродуктивных и геномных технологий. В задачи репродуктивных технологий входят контроль и регулирование репродуктивной функции (искусственное оплодотворение, получение сексированных и генотипированных эмбрионов, трансплантация и т.д.). Революционизирующей технологией получения генетически модифицированных животных, признанной научным сообществом в 2015 прорывом столетия, представляется технология редактирования генома с использованием системы CRISPR-Cas9 (Yum So-Young et al., 2018). Базовым методом вышеуказанных технологий является экстракорпоральное созревание донорских ооцитов. Всевозрастающий запрос наукоемких клеточных репродуктивных биотехнологий в наличии необходимого количества донорских ооцитов коров для получения нативных и реконструированных эмбрионов (клонированных и трансгенных) вызывает необходимость разработки эффективных методов криоконсервации женских гамет. Несмотря на значительные усилия криобиологов и эмбриотехнологов проблема криорезистентности ооцитов *Bos taurus* и *Sus scrofa domestica* далека от успешного разрешения (Paul A.K. et.al., 2018). Трудности в разработке эффективной технологии криоконсервации женских гамет, обусловлены целым рядом причин, связанных с особенностями строения ооцита, чувствительностью различных клеточных компартментов к воздействию сверхнизких температур, токсичностью криопротекторов (Katkov I.I. et.al., 2007). Витрификация - дешевый и быстрый метод криоконсервации при котором используются высокие концентрации криопротекторов и ультрабыстрый режим замораживания, способствующий предотвращению кристаллизации внутриклеточной воды, что снижает возможность криоповреждений интрацитоплазматических структур (Khalili M.A. et. al., 2017). Идентификация особенностей функционирования оргanelл девитрифицированных ооцитов при экстракорпоральном созревании

позволит подойти к решению проблемы криорезистентности женской гаметы в целом.

Оптимизация систем культивирования осуществляется их модернизацией путем введения биологически активных веществ, получаемых на основе различных химических элементов. Одним из таких веществ является кремний. Благодаря уникальным химическим и физическим свойствам, материалы на основе кремния и их оксиды (например, диоксид кремния) используются в различных отраслях промышленности, а также в медицине и биологии (Jaganathan H. et al., 2012). Кремний – структурный антиоксидант, блокирующий процессы перекисного и ферментативного окисления липидов. Диметилглицеролат кремния (ДМГК) и наночастицы высокодисперсного кремнезема (ВДК) являются примерами разработок активных субстанций на основе кремния. Диметилглицеролаты кремния, бесцветные водорастворимые прозрачные жидкости различной вязкости, которая регулируется избытком глицерина, обладающие антимикробной, противовоспалительной и регенерирующей активностью (Колчина А.Ф. и др., 2011; Хонина Т.Г. и др., 2008). За счет структуры гидрогеля, состоящего из кремнийорганических производных полиолов, гелеобразующей добавки (глицерина) и воды, ДМГК можно рассматривать как перспективный источник создания 3D-систем культивирования ооцитов. В свою очередь, ВДК проявляет высокую сорбционную емкость белков, обладает гидрофильностью, не оказывает аллергенного и токсического воздействия на клетки (Зюзюн А.Б. и др., 2015; Чуйко А.А., 2003). Ранее было выявлено положительное воздействие наночастиц ВДК в концентрации 0,001% на жизнеспособность девитрифицированных сперматозоидов быков (Настасієнко Н.С. и др., 2010), а также синхронизацию ядерно-цитоплазматического созревания ооцитов *in vitro*, формирование зигот и дробление эмбрионов свиней до стадии ранней морулы (Зюзюн А.Б. и др., 2015). В настоящих методических указаниях представлены данные о влиянии кремний содержащих соединений на функционирование гамет коров, в условиях сверхнизких температур и описаны протоколы витрификации ооцитов, этапы которых модернизированы путем

введения в среды для витрификации и дозревания ооцитов наночастиц высокодисперсного кремнезема и диметилглицеролата кремния.

**Рис. 1.** Схематическая иллюстрация кристаллизации и рекристаллизации клетки при различных скоростях замораживания

С технологической точки зрения, при витрификации клетки и ткани подвергаются воздействию высоких концентраций эндоцеллюлярных криопротекторов (этиленгликоль, диметилсульфоксид) и замораживанию