

И.И.Будевич, член-корреспондент ААН РБ, доктор сельскохозяйственных наук, профессор

А.И.Будевич, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

Белорусский НИИ животноводства

А.А.Козел, аспирант

Гродненский государственный аграрный университет

УДК 619:615.356:636.22/28:611.013

Эффективность использования витамина В₆ в технологии криоконсервирования эмбрионов крупного рогатого скота

Было исследовано влияние витамина В₆, введенного в криозащитные среды, на сохранность и приживляемость эмбрионов крупного рогатого скота после оттаивания. Добавление витамина в криопротекторную среду на основе глицерина позволило повысить сохранность зародышей в опыте на 7,5% (97,5 против 90,6) и приживляемость на 5,2% (51,4 против 46,2) по сравнению с контрольной группой эмбрионов, замороженных без витамина. Введение витамина в защитную среду с этиленгликолем не выявило существенных различий в сохранности размораживаемых зигот в опыте и контроле (95,0 и 95,2% соответственно), однако способствовало увеличению процента приживляемости зародышей в опыте на 5,4% по сравнению с контролем (54,1 и 48,7 соответственно). Таким образом, использование витамина В₆ в составе криопротекторных сред оказывает положительное влияние на повышение криорезистентности и приживляемости эмбрионов крупного рогатого скота.

The article studies the influence of vitamin B₆, input in cryoprotective mediums, on the safety and frequency of implantation of bovine embryos after thawing. Introduction of the vitamin in cryoprotective medium on the basis of glycerin has allowed increasing the safety of the germs in the experiment by 7.5% (97.5 vs 90.6) and the frequency of implantation by 5.25 (51.4 vs 46.2) in comparison with the control group of embryos, frozen without the vitamin. Introduction of the vitamin into cryoprotector of ethylene glycol has not revealed essential differences in the safety of defrosted zygotes in experiment and control groups (95.0% and 95.2% accordingly). However, it ensured the increase of the percentage of the frequency of implantation of the germ by 5.4% in the experimental group (54.1% and 48.7%). Consequently, the usage of vitamin B₆ in composition with cryoprotective mediums renders positive influence on rising cryoresistancy of implantation of bovine embryos.

В настоящее время все большее значение приобретают биотехнологические методы размножения крупного рогатого скота, из которых технология трансплантации зародышей нашла свое применение в племенных хозяйствах республики для ускоренного получения потомков от выдающихся животных.

В условиях практического применения метода пересадки эмбрионов при отсутствии животных-реципиентов необходимо сохранение высококонцентрированного биоматериала вне организма матери в замороженном состоянии. Это достигается путем использования ряда технологических приемов и применением криопротекторных сред для защиты клеток зародыша от повреждений при сверхнизких температурах.

Разработанная технология криоконсервирования эмбрионов позволяет получать в условиях республики до 80-90% жизнеспособных эмбрионов после оттаивания и 45-48%-ную приживляемость после их пересадки. В то же время потеря части биоматериала ведет к снижению эффективности и удорожанию всей технологии, что тормозит использование метода в селекционно-племенной работе по улучшению стада крупного рогатого скота.

Известно, что в процессе криоконсервирования эмбрионы оказываются в неадекватных средовых и температурных условиях и подвергаются воздействию различных неблагоприятных факторов. При замораживании и оттаивании зачастую происходят процессы, разрушающие клетку на молекулярном уровне, обусловленные потерей воды, повышением концентрации солей, структурными изменениями мембранных липидов, накоплением токсических продуктов перекисного окисления липидов [2]. Это вызывает нарушение проницаемости клеточных мембран, снижает активность многих растворимых и мембраносвязанных ферментов, ослабляет электрон-транспортную систему митохондрий, и эмбрион не в состоянии точно регулировать осмотическое равновесие между внутриклеточной и внешней средой [1]. Зародыш подвергается осмотическому шоку, что снижает его жизнеспособность. Более того, разрушение клеточных мембран при замораживании-оттаивании ведет к существенному повышению концентрации высокоактивных гидролаз

в цитоплазме, которые оказывают лизирующее действие на внутриклеточные структуры [7, 8].

В связи с этим необходим поиск новых и совершенствование существующих защитных сред в технологии криоконсервации зародышей с использованием в растворах криопротекторов биологически активных веществ, способствующих активации биохимических процессов и сохранению целостности мембран в размораживаемых зиготах.

Как известно, важными активаторами клеточного метаболизма являются витамины, находящиеся в живых клетках в свободных, фосфорсвязанных формах, а также связанные с транспортными белками.

Одним из витаминов, участвующих в регуляции целого ряда биохимических процессов в животной клетке, является B_6 (пиридоксин), осуществляющий свои функции в активных формах в виде пиридоксаль-5 фосфата и пиридоксамин-5 фосфата [5]. Превращаясь в коэнзимную форму, витамин входит в состав ферментов, участвующих в метаболизме целого ряда заменимых и незаменимых аминокислот, регулирует обмен белков, жиров, углеводов, некоторых гормонов, биогенных аминов и других биологически активных соединений. В плазме крови основным его транспортным белком является сывороточный альбумин [3, 6]. Было установлено, что B_6 в составе криопротекторов не теряет своей активности после глубокого замораживания [4].

Целью исследований явилось изучение влияния комплексного использования различных криопротекторов с витамином B_6 на сохранность и приживляемость замороженно-оттаянных эмбрионов крупного рогатого скота.

Исследования проводились в племенном заводе «Корсичы» Гродненской области в период 1999–2000 гг. Донорами служили коровы черно-пестрой породы продуктивностью 7500-9500 кг молока, жирностью 3,7-3,9%, живой массой 550-600 кг, реципиентами — черно-пестрые телки случного возраста живой массой 380-400 кг.

Извлечение эмбрионов, их оценку и пересадку проводили согласно методическим рекомендациям БелНИИЖ (1996 г.).

Эмбрионы опытных групп насыщались одноступенчато криозащитными средами: 10%-ным раство-

Таблица 1. Сохранность и приживляемость замороженно-оттаянных эмбрионов при использовании комплекса 10%-ного раствора глицерина и пиридоксина

Показатели	10%-ный раствор глицерина + B_6 (опыт)				10%-ный раствор глицерина (контроль)			
	стадия развития				стадия развития			
	морула поздняя	бластоциста ранняя	бластоциста поздняя	всево	морула поздняя	бластоциста ранняя	бластоциста поздняя	всево
Заморожено эмбрионов, п	9	15	16	40	10	11	11	32
Оттаяно эмбрионов, п	9	15	16	40	10	11	11	32
Сохранность, п-%	9-100,0	15-100,0	15-94,0	39-97,5	8-80,0	11-100,0	10-91,0	29-90,6
Количество пересадок, п	8	14	15	37	7	9	10	26
Приживляемость, п-%	4-50,0	7-50,0	8-53,3	19-51,4	3-42,9	4-44,4	5-50,0	12-46,2

Таблица 2. Сохранность и приживляемость замороженно-оттаянных эмбрионов при использовании комплекса 1,5М-го раствора этиленгликоля и пиридоксина

Показатели	1,5М-й раствор этиленгликоля+В ₆ (опыт)				1,5М-й раствор этиленгликоля (контроль)			
	стадия развития				стадия развития			
	морула поздняя	бластоциста ранняя	бластоциста поздняя	всево	морула поздняя	бластоциста ранняя	бластоциста поздняя	всево
Заморожено эмбрионов, п	13	13	14	40	12	16	14	42
Оттаяно эмбрионов, п	13	13	14	40	12	16	14	42
Сохранность, п-%	12-92,3	12-92,3	14-100,0	38-95,0	11-91,7	15-93,8	14-100,0	40-95,2
Количество пересадок, п	12	11	14	37	10	15	12	37
Приживляемость, п-%	6-50,0	6-54,6	8-57,1	20-54,1	5-50,0	7-46,7	6-50,0	18-48,7

ром глицерина и 1,5М-м раствором этиленгликоля с введенным в их состав витамином В₆. В контрольные группы вошли эмбрионы, замороженные в тех же криопротекторах без витамина. Замораживание всех групп зародышей проводили на программном замораживателе ЭМБИ-К со скоростью 0,3 °С/мин с переносом биоматериала после окончания цикла в жидкий азот. Оттаивание эмбрионов осуществлялось в водяной бане при температуре 36 °С в течение 10-12 секунд. Удаление защитных сред и отмывка зародышей проводились по общепринятой методике.

В таблице 1 представлены результаты исследований по сохранности и приживляемости эмбрионов, замороженных в комплексной среде глицерина с витамином.

Из данных таблицы видно, что в среднем показатель сохранности эмбрионов опытной группы был выше по сравнению с зародышами в контроле (97,5 против 90,6%). Разница по жизнеспособности (сохранности) поздних морул составила 20% в пользу эмбрионов, замороженных с использованием в криопротекторном растворе витамина В₆. Применение пиридоксина повлияло и на приживляемость замороженно-оттаянных зародышей: средний показатель стельности реципиентов в опыте на 5,2% превосходит аналогичный показатель в контроле.

Таким образом, введение витамина В₆ в 10%-ный раствор глицерина позволило повысить эффективность технологии криоконсервирования эмбрионов крупного рогатого скота.

Во второй серии опытов проводилось исследование по совместному использованию 1,5М-го раствора этиленгликоля и пиридоксина при замораживании эмбрионального материала (табл. 2).

Данные таблицы свидетельствуют о высокой сохранности замороженно-оттаянных зародышей в среднем как в опытной, так и в контрольной группах эмбрионов (95,0 и 95,2% соответственно). Однако наблюдались существенные различия по приживляемости эмбрионов на стадиях ранней и поздней бластоцисты с применением в криопротекторе В₆ и без его использования. Разница по вышеуказанным возрастным группам зародышей составила 7,9 и 7,1% соответственно в пользу комплексного криопротектора. Использование 1,5М-

го раствора этиленгликоля с пиридоксином позволило получить стельность после пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов у 54,1% реципиентов, в контроле этот показатель был ниже на 5,4%, что свидетельствует о высокой эффективности применения композиции защитной среды и витамина В₆ в технологии глубокой заморозки эмбрионов.

Таким образом, использование витамина В₆ в технологии криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота способствует повышению защитных свойств криопротекторов, сохранности и приживляемости размораживаемых зародышей. Данные научных экспериментов можно объяснить тем, что с проникновением витамина В₆ в клетки эмбрионов, включением его в биохимические процессы активизируется жизнедеятельность клеток зародышей и усиливаются регенерационные процессы на молекулярном уровне.

Литература

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 256 с.
2. Белоус А.М., Гордиенко Е.М., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. – Москва: Высшая школа, 1987. – С. 26-29.
3. Березов Т.Г., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. – Москва: Медицина, 1989. – 435 с.
4. Козел А.А. Сохранность тиамина и пиридоксина в составе сред для криоконсервации эмбрионов после глубокого замораживания // Наука — производству: Тез. докл. 4-й междунар. научно-производ. конф., посвящ. 50-летию ГГАУ (г. Гродно, 2001, май). – Гродно. – 2001. – С. 110-113.
5. Колотилова А.И., Глушаков Е.Н. Витамины. – Ленинград: Университеты, 1976. – 256 с.
6. Халмуралов А.Г., Тоцкий В.Н., Чаговец Р.В. Мембранный транспорт коферментных витаминов и коферментов. – Киев: Наук. думка, 1982. – 280 с.
7. Barret A.J. Lysosomal enzymes. // Lysosomes. A laboratory Hand Book. Ed. Dingle J.T. North. – Holland, Amsterdam. – 1972. – P. 46-135.
8. Larrson K. Current research on the deep freezing of boar sperm // World Rev. Anim. Prod. – 1978. – V. 14. – P. 59-64.