

УДК 636.2:612.64.089.67

## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

А.С. Дешко<sup>1</sup>, Л.В. Голубец<sup>1</sup>, И.С. Кысса<sup>2</sup>, Ю.А. Якубец<sup>2</sup>,  
М.В. Попов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – УО «Гродненский государственный аграрный университет»,  
г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>2</sup> – СООО «Бел-Симекс»,  
г. Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup> – Учебно-практический центр биотехнологий ОАО «Почапово»,  
г. Пинск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 12.08.2013 г.)

**Аннотация.** Исследования, представленные в данной статье, посвящены изучению влияния различных режимов криоконсервации на морфологию и приживляемость эмбрионов крупного рогатого скота, полученных в системе in vitro. Как показали результаты опытов, оптимальным режимом криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота, полученных в системе in vitro, является режим №2, где в качестве криопротектора выступает глицерин и протокол медленного замораживания эмбрионов № 1: охлаждение от +20°C до температуры -7°C со скоростью 2°C/мин.; сидинг -7°C; выдержка при -7°C в течение 5 минут; замораживание соломинок до температуры -37°C при скорости охлаждения 0,3°C/мин и перенос в жидкий азот. Данный режим позволяет получить достоверно высокое качество эмбрионов (4,1 балла,  $P < 0,05$ ) при индексе выживаемости 0,6, а также высокий процент приживляемости на уровне 60%.

**Summary.** The researches presented in the given article, are devoted to the study of the impact of various modes of cryopreservation on the morphology and engraftment of cattle embryos obtained in the in vitro system. As the results of ex-

*periments, the optimal regime of cryopreservation of cattle embryos obtained in the in vitro system is the mode №2, where as a cryoprotectant acts glycerin and protocol of slow freezing of embryos №1: cooling from +20°C to temperature -7°C at the rate of 2°C/min; siding -7°C; exposure at -7°C for 5 minutes; freezing straws to a temperature of 37°C with the cooling rate 0.3°C/min, and transfer in liquid nitrogen. This mode allows you to get a reliably high quality embryos (4,1, P<0.05) in the index of survival rate of 0.6, and also the high percentage of engraftment at the level of 60%.*

**Введение.** Разработка технологии получения эмбрионов *in vitro* открывает возможности получения значительно большего числа зародышей от животных с высоким генетическим потенциалом.

Одной из актуальных задач трансплантации является возможность длительного хранения криоконсервированных эмбрионов, что требует знания основных принципов криобиологии и совершенствования клинических и лабораторных подходов для успешной реализации программ криоконсервации [6, 11].

Криоконсервация эмбрионов является составной частью репродуктивных технологий, она позволяет длительное время сохранять генетический материал животных, а также проводить трансплантацию эмбрионов в строго определенные сроки, обеспечивая высокую выживаемость эмбрионов после оттаивания и, в конечном счете, беременность и живое потомство после пересадки эмбрионов реципиенту, что достигается благодаря тщательной разработке и изучению методик замораживания и оттаивания [10, 13].

Методика криоконсервации состоит в специальной обработке и подготовке эмбрионов криопротектором по специальной программе, затем пайета с замороженным эмбрионом помещается в жидкий азот и хранится при температуре минус 196 °С. при этом вся метаболическая активность клеток останавливается.

Хотя технология криоконсервации эмбрионов используется больше трех десятилетий, она все еще не позволяет получать положительных показателей (сохранность, приживляемость эмбрионов и др.) [1, 8, 12].

Эффективность криоконсервации зависит от многих показателей, включая стадию развития эмбрионов, их качество, происхождение эмбриона (полученный в естественных условиях – *in vivo*, или произведенный в пробирке – *in vitro*), от правильного выбора и использования криопротектора, а также температурного режима заморозки и оттаивания. Оптимизация всех этих условий позволит в дальнейшем увеличить выживание и потенциал, связанный с развитием эмбриона [2, 9].

Для успешного применения метода криоконсервации необходимо изучить влияние пенетрирующих криопротекторов (глицерин, этиленгликоль и др.) и температурных режимов на выживаемость и приживляемость эмбрионов.

Научной основой применения пенетрирующих криопротекторов является их способность проникать внутрь эмбрионов и защищать их от отрицательных факторов, присущих процессу криоконсервации.

**Цель работы:** изучить влияние различных режимов криоконсервации на морфологию и приживляемость эмбрионов крупного рогатого скота, полученных в системе *in vitro*.

**Материал и методика исследований.** Исследования по разработке метода криоконсервации эмбрионов, полученных в культуре *in vitro*, проводились на базе биотехнологического центра по репродукции сельскохозяйственных животных УО «Гродненский государственный аграрный университет», а также в учебно-практическом центре биотехнологий ОАО «Почапово» Пинского района Брестской области в 2010-2013 годах.

Яичники получали на конвейере Гродненского мясокомбината после убоя животного путем их отсекаания от матки с помощью ножиц. После этого они помещались в бытовой термос со средой Хенкса, Дюльбекко, ТС-199 или физраствором при температуре 32-36 °С. После доставки в лабораторию яичники 2-3 раза промывали солевым раствором (физраствор, Дюльбекко, Хенкса) и помещали в раствор или среду, аналогично той, в которой промывали. Выделение ооцитов проводили путем рассечения ткани яичников стерильным лезвием безопасной бритвы в чашке Петри (Ø90) в одном из перечисленных солевых буферов с добавлением 1% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 10 ед/мл гентамицина и 1 ед/мл гепарина. Затем проводили их поиск и морфологическую оценку качества под бинокулярным микроскопом «Olympus» при 16-90 кратном увеличении и помещали в CO<sub>2</sub> - инкубатор «Memmert» в питательной среде для дозревания клеток при температуре 37,8 °С с максимальной влажностью 98%. После 24-часового дозревания ооциты ставили на совместное инкубирование со сперматозоидами.

Оплодотворение проводили замороженно-оттаянной спермой. Подготовку к оплодотворению осуществляли по следующей методике. Дозу спермы в среде для капацитации ставили в термостат на 1 час для процесса «флотации». Суть этого метода заключается во всплытии фракции наиболее активных сперматозоидов в верхние слои. Надосадочную фракцию три раза отмывали в среде для капацитации путем центрифугирования при 3000 об./мин в течение 10 мин. Затем в среду до-

бавляли гепарин в концентрации 50 ед/мл и снова центрифугировали в том же режиме. После этого сперму дважды отмывали в среде для оплодотворения и в количестве  $1 \times 10^6$  сперматозоидов в 1 мл добавляли к ооцитам, находящимся к этому времени в среде для оплодотворения.

Совместная инкубация спермы и ооцитов продолжалась в течение 18-20 часов при температуре  $38,7^{\circ}\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  и максимальной влажности. После совместного инкубирования ооциты отмывали от сперматозоидов и в среде для созревания на монослое кумулюсных клеток снова помещали в  $\text{CO}_2$  - инкубатор на 7-9 дней (до получения пригодных для криоконсервации эмбрионов). Питательные среды для созревания, капацитации и оплодотворения были приготовлены по нашим методикам на основе реактивов фирмы «Sigma».

Для криоконсервирования использовались эмбрионы только отличного качества.

Для изучения влияния различных режимов криоконсервации на морфологию и приживляемость эмбрионов крупного рогатого скота, полученных в системе *in vitro*, было сформировано 4 группы эмбрионов (таблица 1).

Таблица 1 – Схема исследований использования режимов криоконсервации эмбрионов

Группа эмбрионов (режим)	Криопротектор	Протокол криоконсервации, №
1	Этиленгликоль	1
2	Глицерин	1
3	Этиленгликоль	2
4	Глицерин	2

В качестве криопротекторов использовали 10% глицерин и 1,5М этиленгликоль фирмы «Bovi Pro» (таблица 2).

Таблица 2 – Режим насыщения эмбрионов криопротекторами

Раствор	Концентрация	Время экспозиции, мин.
Глицерин 10%	1,4 М	10
Этиленгликоль 1,5М	1,5 М	10

В связи с поставленной целью исследований нами были разработаны и исследованы следующие протоколы медленного замораживания эмбрионов (рисунок 1):

**ПРОТОКОЛ № 1**

- Охлаждение от  $+20^{\circ}\text{C}$  до температуры  $-7^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .
- Точка кристаллизации достигается, когда соломинки охладятся до температуры  $-7^{\circ}\text{C}$ . происходит касание рамки замораживателя тех областей соломинок, где расположены эмбрионы.
- Выдержка при  $-7^{\circ}\text{C}$  в течение 5 минут.

- Замораживание соломинок до температуры  $-37^{\circ}\text{C}$  при скорости охлаждения  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ , после чего соломинки с замороженными эмбрионами переносятся в жидкий азот и хранятся в сосудах Дьюара до размораживания.

## 2 ПРОТОКОЛ №2

- Охлаждение от  $+25^{\circ}\text{C}$  до температуры  $-5,5^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$
- Точка кристаллизации достигается, когда соломинки охладятся до температуры  $-5,5^{\circ}\text{C}$ , происходит касание рамки замораживателя тех областей соломинок, где расположены эмбрионы.
- Выдержка при  $-5,5^{\circ}\text{C}$  в течение 5 минут
- Замораживание соломинок до температуры  $-32,5^{\circ}\text{C}$  при скорости охлаждения  $0,6^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ , после чего соломинки с замороженными эмбрионами переносятся в жидкий азот и хранятся в сосудах Дьюара до размораживания.

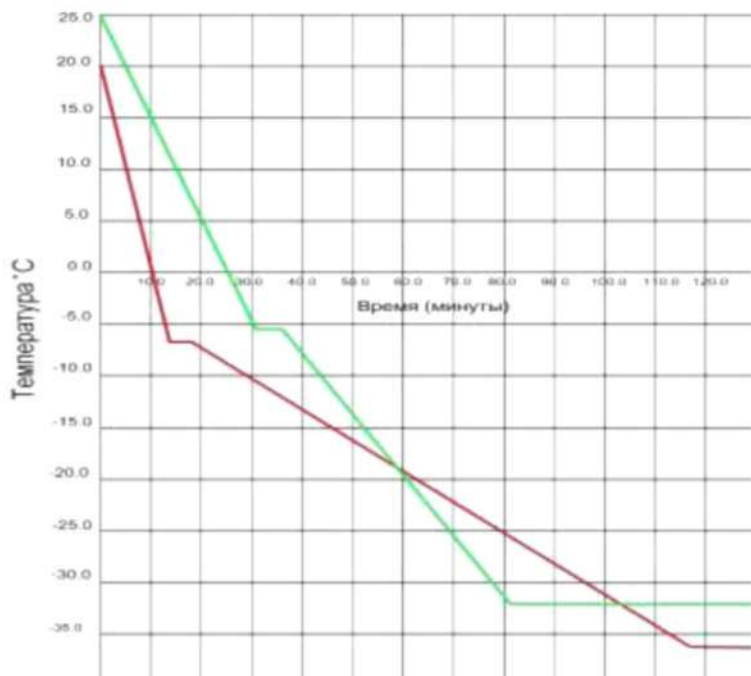


Рисунок 1 – Температурный график медленного замораживания эмбрионов

----- протокол №1; ----- протокол №2

В качестве реципиентов эмбрионов использовались клинически здоровые телки белорусской черно-пестрой породы живой массой 380-450 кг.

Биометрическую обработку полученного цифрового материала проводили согласно общепринятым методам вариационной статистики.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Условия культивирования являются важным фактором, влияющим на результат развития эмбрионов, а также на их выживаемость после криоконсервации. Чувствительность к охлаждению эмбриона зависит от стадии их развития. Эмбрионы на стадии развития бластоцисты более успешно замораживаются, чем эмбрионы, на более ранних стадиях дробления, возможно, из-за того что они уже прошли эмбриональную активацию генома [7]. Эмбрионы на более ранних стадиях более склонны к криоповреждениям [5], которые происходят из-за того, что они имеют меньше клеток, при повреждении которых вероятность выживания всего эмбриона заметно снижается. Другим не менее важным фактором является то, что эмбрионы в различных стадиях развития используют различные метаболические пути, которые влияют на их предрасположенность к криоповреждениям. Кроме того, эмбрионы, полученные *in vitro*, более чувствительны к криоповреждениям, чем эмбрионы, полученные *in vivo* [3, 4].

Основополагающими критериями эффективности программ замораживания являются: морфологическая интактность эмбрионов после оттаивания и их способность к дальнейшему дроблению *in vitro*.

Эмбрионы считаются выжившими, если 50% их бластомеров остаются интактными после оттаивания и удаления криопротекторов (индекс выживаемости 50%).

Индекс выживаемости определяется отношением числа выживших эмбрионов к числу всех замороженных/оттаянных эмбрионов и выражается в процентах.

Проведены исследования по изучению влияния различных режимов криоконсервации на качество эмбрионов, а также их выживаемость после разморозки. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Качество и выживаемость эмбрионов после разморозки в зависимости от использования режимов криоконсервации

ПОКАЗАТЕЛЬ	Группа			
	1 (n=15)	2 (n=15)	3 (n=15)	4 (n=15)
Качество при разморозке	3,0±0,45	4,1±0,19*	3,6±0,29	3,7±0,12
Индекс выживаемости	0,4±0,24	0,6±0,25	0,2±0,2	0,2±0,2

Как показывает анализ представленных в таблице 3 данных, более высокие результаты были получены при криоконсервации эмбрионов с использованием режима №2. При этом после разморозки эмбрионы второй группы имели достоверно высокое качество (4,1 балла,  $P < 0,05$ ). У эмбрионов первой группы качество после разморозки было самым низким и составило 3,0 балла. Наивысший индекс выживаемости также был у эмбрионов 2 группы и составил 0,6, что на 40 п.п. выше, чем у эмбрионов 3 и 4 групп.

Влияние режимов криоконсервации на приживляемость эмбрионов представлено на рисунке 2.

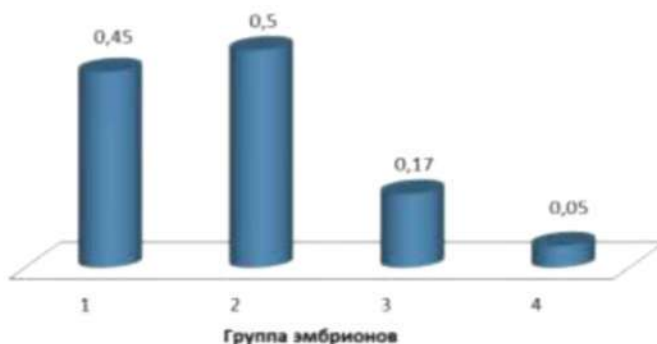


Рисунок 2 – Индекс приживляемости эмбрионов

Анализ представленных данных показывает, что более высокий процент приживляемости замороженно-оттаянных эмбрионов был получен при использовании режима №2 (50%) и режима №1 (45%). При использовании режимов №3 и №4 индекс приживляемости эмбрионов составил 0,17 и 0,05 соответственно, что является очень низким показателем.

**Заключение.** Таким образом, как показал анализ полученных результатов, оптимальным режимом криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота, полученных в системе *in vitro*, является режим № 2, где в качестве криопротектора выступает глицерин и протокол медленного замораживания эмбрионов № 1: охлаждение от  $+20^{\circ}\text{C}$  до температуры  $-7^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ; сидинг  $-7^{\circ}\text{C}$ ; выдержка при  $-7^{\circ}\text{C}$  в течение 5 минут; замораживание соломинок до температуры  $-37^{\circ}\text{C}$  при скорости охлаждения  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  и перенос в жидкий азот. Данный режим позволяет получить достоверно высокое качество эмбрионов (4,1 балла,  $P < 0,05$ ) при индексе выживаемости 0,6, а также высокий процент приживляемости на уровне 60%.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Campos-Chillon, LF. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos / LF. Campos-Chillon, [et. all.] // *Theriogenology*. 2006. – Vol.65. – P.1200-1214.
2. Dattena, M. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived / M. Dattena, [et. all.] // *Theriogenology*. 2004. – Vol.62. – P.481-93.
3. Guyader-Joly, C. Effect of lecithin on in vitro and in vivo survival of in vitro produced bovine blastocysts after cryopreservation / C. Guyader-Joly, [et. all.] // *Theriogenology*. 1999. – Vol.52. – P.1193-1202.
4. Hasler, JF. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results / JF. Hasler, [et. all.] // *Theriogenology*. 1995. – Vol. 43. – P.141-152.
5. Liebermann, J. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: Where are we now? / J. Liebermann, J. Dietl, P. Vanderzwalmen, MJ. Tucker // *Reprod. Biomed. Online*. 2003. – Vol.7. P. 623.
6. Martínez, AG. Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: A field trial. / AG. Martínez, GM. Brogliatti, A. Valcarcel // *Theriogenology*. 2002. – Vol.58. – P.963-72.
7. Menezo, Y. Cryopreservation of IVF embryos: Which stage? / Y. Menezo // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 2004. – Vol.113. – P. 28-32.
8. Nawroth, F. Cryopreservation in assisted reproductive technology: New trends. / F. Nawroth, [et. all.] // *Semin. Reprod. Med*. 2005. – Vol.23. P.325.
9. Nedambale, TL. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol / TL. Nedambale, F. Du, X. Yang, XC. Tian // *Anim. Reprod. Sci*. 2006. – Vol.93. – P. 61-75.
10. Seidel, GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation / GE. Seidel // *Theriogenology*. 2006. – Vol.65. – P.228-35.
11. Sommerfeld, V. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification / V. Sommerfeld, H. Niemann // *Cryobiology*. 1999. – Vol.38. – P. 95-105.
12. Tominaga, K. Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine in vitro produced 16-cell embryos / K. Tominaga, M. Shimizu, S. Ooyama, Y. Izaike // *Theriogenology*. 2000. – Vol.53. - P. 1669.
13. Vajta, G. Improving cryopreservation systems / G. Vajta, M. Kuwayama // *Theriogenology*. 2006. – Vol.65. - P.236.