

УДК 636.2.082.4:591.564

РАСТВОРЫ ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ ПРИ ДЕКОНСЕРВИРОВАНИИ ВИТРИФИЦИРОВАННЫХ ЭМБРИОНОВ IN VITRO

**Д. М. Богданович, С. Н. Пайтеров, С. А. Сапсалева,
Ю. К. Кирикович**

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»
г. Жодино, Республика Беларусь (Республика Беларусь, г. Жодино,
ул. Фрунзе, 11)

Ключевые слова: глицерин, диметилсульфоксид, криопротектор, крио-
филактик, крупный рогатый скот, лабораторные мыши, сахароза, сохран-
ность, трансплантация эмбрионов, уровень дробления, эмбрион, этиленгли-
коль.

Аннотация. Применение комплекса высококонцентрированных крио-
протекторов, состоящего из растворов этиленгликоля, диметилсульфоксида
и сахарозы различных концентраций, при деконсервировании витрифициро-
ванных зародышей млекопитающих позволяет получить высокий уровень их
сохранности – 89,5 %, обеспечить способность к дальнейшему развитию
88,2 % эмбрионов и получить стельность реципиентов на уровне 31 %.

SOLUTIONS OF HIGH-CONCENTRATED CRYOPROTECTORS FOR DECONSERVATION OF VITRIFICATED EMBRYONS IN VITRO

D. M. Bogdanovich, S. N. Paitserau, S. A. Sapsalev, U. K. Kirikovich

RUE «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences
of Belarus on Animal husbandry»
Zhodino, Republic of Belarus (Republic of Belarus, Zhodino, 11 Frunze
Str.)

Key words: glycerol, dimethylsulfoxide, cryoprotectant, cryophylactic, cattle,
laboratory mice, sucrose, safety, embryotransfer, crushing level, embryo, eth-
yleneglycol.

Summary. The use of the complex of highly concentrated cryoprotectants,
consisting of solutions of ethyleneglycol, dimethylsulfoxide and sucrose of various
concentrations, in the deconservation of vitrified mammalian embryos makes it pos-
sible to obtain a high level of their safety – 89,5 %, ensure the ability to further de-
velopment of 88,2 % of embryos and obtain recipient pregnancy level of 31 %.

(Поступила в редакцию 28.05.2020 г.)

Введение. В современной науке не прекращается исследование взаимосвязи режимов оттаивания замороженных эмбрионов с их последующей приживляемостью. Так, в результате работы канадских исследователей [1] рекомендован 3-ступенчатый протокол оттаивания витрифицированных эмбрионов: используя набор Irvine scientific Vit kit-Thaw (производство США) зародыши помещаются в среду для оттаивания на 1 мин при 37 °С, затем в среду для растворения на 4 мин и в среду для промывки на 8 мин.

В работе других авторов [2] рекомендован 2-ступенчатый протокол оттаивания Менезо на основе 4-5 % раствора глицерина и 0,2-0,5М раствора сахарозы.

Эксперименты Franchesco Capodanno et al. [3] продемонстрировали эффективность 40-секундного оттаивания «на воздухе» с последующей 5-минутной выдержкой в 1М растворе пропандиола с 0,2М сахарозой.

Анализ исследований, проведенных в Австралии [4], демонстрирует преимущество использования технологии витрификации эмбрионов по сравнению с «медленной» заморозкой зародышей.

Исследования Rienzi et al. [5] также продемонстрировали эффективность применения сверхбыстрой заморозки по сравнению с традиционным способом.

Цель работы – изучить возможность применения различных комплексов высококонцентрированных криопротекторов в качестве сред для оттаивания витрифицированных эмбрионов крупного рогатого скота и мышей *in vitro*.

Материал и методика исследований.

На первом этапе исследований определяли оптимальные режимы оттаивания витрифицированных эмбрионов крупного рогатого скота и мышей с использованием растворов этиленгликоля, ДМСО и сахарозы. Эмбрионы I, II и III экспериментальных групп (n = 15-19) после извлечения из жидкого азота помещали последовательно в комплексы, состоящие из:

– для первой группы эмбрионов – ЭГ-20 % + ДМСО-20 % + сахароза 30 % в течение 1 мин, ЭГ-10 % + ДМСО-10 % + сахароза 30 % в течение 3 мин, Holding в течение 5 мин;

– для второй группы – ЭГ-15 % + ДМСО-15 % + сахароза 30 % в течение 1 мин, ЭГ-10 % + ДМСО-10 % + сахароза 30 % в течение 3 мин, Holding в течение 5 мин;

– для третьей группы – ЭГ-20 % + ДМСО-20 % + сахароза 30 % в течение 1 мин, ЭГ-15 % + ДМСО-15 % + сахароза 30 % в течение

3 мин, ЭГ-10 % + ДМСО-10 % + сахараза 30 % в течение 3 мин, Holding в течение 5 мин.

На следующем этапе исследований определяли оптимальные режимы оттаивания витрифицированных эмбрионов крупного рогатого скота и мышей с использованием растворов глицерина, ДМСО и сахаразы. Эмбрионы I, II и III экспериментальных групп (n = 17-19) после извлечения из жидкого азота помещали последовательно в комплексы, состоящие из:

– для первой группы эмбрионов – ГЛ-30 % + ДМСО-20 % + сахараза 30 % в течение 1 мин, ГЛ-10 % + ДМСО-10 % + сахараза 30 % в течение 3 мин, Holding в течение 5 мин;

– для второй группы – ГЛ-20 % + ДМСО-15 % + сахараза 30 % в течение 1 мин, ГЛ-10 % + ДМСО-10 % + сахараза 30 % в течение 3 мин, Holding в течение 5 мин;

– для третьей группы – ГЛ-30 % + ДМСО-20 % + сахараза 30 % в течение 1 мин, ГЛ-20 % + ДМСО-15 % + сахараза 30 % в течение 3 мин, ГЛ-10 % + ДМСО-10 % + сахараза 30 % в течение 3 мин, Holding в течение 5 мин.

На заключительном этапе исследований определяли оптимальные режимы оттаивания витрифицированных эмбрионов крупного рогатого скота и мышей с использованием растворов 1,2-пропандиола, ДМСО и сахаразы. Эмбрионы I, II и III экспериментальных групп (n = 17-19) после извлечения из жидкого азота помещали последовательно в комплексы, состоящие из:

– для первой группы эмбрионов – 1,2-PD-15 % + ДМСО-20 % + сахараза 30 % в течение 1 мин, 1,2-PD-5 % + ДМСО-10 % + сахараза 30 % в течение 3 мин, Holding в течение 5 мин;

– для второй группы – 1,2-PD-10 % + ДМСО-15 % + сахараза 30 % в течение 1 мин, 1,2-PD-5 % + ДМСО-10 % + сахараза 30 % в течение 3 мин, Holding в течение 5 мин;

– для третьей группы – 1,2-PD-15 % + ДМСО-20 % + сахараза 30 % в течение 1 мин, 1,2-PD-10 % + ДМСО-15 % + сахараза 30 % в течение 3 мин, 1,2-PD-5 % + ДМСО-10 % + сахараза 30 % в течение 3 мин, Holding в течение 5 мин.

Оттаивание витрифицированного эмбриоматериала проводили на подогреваемом столе при температуре +37 °С.

Сохранность деконсервированных зародышей оценивали по морфологическим признакам: целостности бластомеров и прозрачности их цитоплазмы. Жизнеспособность эмбрионов оценивали по их способности дробриться *in vitro* при культивировании в CO₂ инкубаторе.

Результаты исследований и их обсуждение.

Данные эффективности деконсервации витрифицированных эмбрионов с использованием этиленгликоля, ДМСО и сахарозы представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Эффективность деконсервации витрифицированных эмбрионов с использованием этиленгликоля, ДМСО и сахарозы

Показатели	Группы эмбрионов		
	I	II	III
Заморожено эмбрионов всего, п	15	17	19
из них эмбрионов мышей, п/%	8/100	10/100	11/100
из них эмбрионов коров, п/%	7/100	7/100	8/100
Оттаяно эмбрионов всего, п	15	17	19
из них эмбрионов мышей, п/%	8/100	10/100	11/100
из них эмбрионов коров, п/%	7/100	7/100	8/100
Сохранность после оттаивания, п/%	11/73,3 ± 11,42	13/76,5 ± 10,28	17/89,5 ± 7,09*
из них эмбрионов мышей, п/%	6/75,0	7/70,0	10/90,9
из них эмбрионов коров, п/%	5/71,4	6/85,7	7/87,5
Уровень дробления, п/%	7/63,6 ± 14,51	9/69,2 ± 12,80	15/88,2 ± 7,79**
из них эмбрионов мышей, п/%	4/66,7	5/71,4	9/90,0
из них эмбрионов коров, п/%	3/60,0	4/66,7	6/85,7

*Примечание – здесь и далее: * $P < 0,1$; ** $P < 0,01$*

Представленные в таблице 1 данные указывают на то, что применение в качестве среды для деконсервации зародышей комплекса 20%-го раствора этиленгликоля, 20%-го раствора диметилсульфоксида совместно с 30%-м раствором сахарозы и последующим переносом в комплекс этих же криофилактиков с меньшей концентрацией (ЭГ-15 % + ДМСО-15 % + сахароза 30 %) при дальнейшей экспозиции с концентрацией растворов ЭГ-10 % + ДМСО-10 % + сахароза 30 % (III опытная группа) позволяет в наибольшей степени, среди испытуемых разведений ЭГ и ДМСО, обеспечить сохранность эмбриоматериала после его оттаивания – 89,5 %, что на 16,2 и 13,0 п. п. выше по сравнению с I и II опытными группами ($P < 0,05$).

После культивирования жизнеспособного материала наибольший уровень дробления клеток достоверно был отмечен также в III опытной группе – 88,2 %, что на 24,6 п. п. выше по сравнению с I и 19,0 п. п. – со II группами эмбрионов ($P < 0,01$).

Данные эффективности деконсервации витрифицированных эмбрионов с использованием глицерина, ДМСО и сахарозы представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Эффективность деконсервации витрифицированных эмбрионов с использованием глицерина, ДМСО и сахарозы

Показатели	Группы эмбрионов		
	I	II	III
Заморожено эмбрионов всего, п	17	17	19
из них эмбрионов мышей, п/%	10/100	10/100	10/100
из них эмбрионов коров, п/%	7/100	7/100	9/100
Оттаяно эмбрионов всего, п	17	17	19
из них эмбрионов мышей, п/%	10/100	10/100	10/100
из них эмбрионов коров, п/%	7/100	7/100	9/100
Сохранность после оттаивания, п/ %	12/70,6±11,05	14/82,4±9,24	16/84,2±7,03*
из них эмбрионов мышей, п/%	7/70,0	8/80,0	8/88,9
из них эмбрионов коров, п/%	5/71,4	6/85,7	8/88,9
Уровень дробления, п/%	8/66,7±13,60	10/71,4±12,08	14/87,5±7,82*
из них эмбрионов мышей, п/%	5/71,4	6/75,0	7/87,5
из них эмбрионов коров, п/%	3/60,0	4/66,7	7/87,5

Результаты исследований (таблица 2) показывают, что применение в качестве среды для деконсервации зародышей комплекса 30%-го раствора глицерина, 20%-го раствора диметилсульфоксида и 20%-го раствора сахарозы с дальнейшей экспозицией в комплексе растворов (ГЛ-20 % + ДМСО-15 % + сахароза 30 %) и (ГЛ-10 % + ДМСО-10 % + сахароза 30 %) (III опытная группа) позволяет в наибольшей степени, среди испытуемых разведений глицерина и диметилсульфоксида, обеспечить сохранность эмбриоматериала после его оттаивания – 84,2 %, что на 13,6 и 1,8 п. п. выше по сравнению с I и II опытными группами ($P < 0,5$). Низкая концентрация криопротекторов в растворе для деконсервирования в первой опытной группе повлияла на снижение уровня сохранности зародышей после разморозки до 66,7 %.

Культивирования деконсервированного эмбриоматериала показало, что максимальный уровень дробления клеток достоверно ($P < 0,05$) отмечен в III опытной группе – 87,5 %, что на 20,8 п. п. выше по сравнению с I и 16,1 п. п. – со II группами эмбрионов.

Данные эффективности деконсервации витрифицированных с использованием 1,2-пропандиола, ДМСО и сахарозы эмбрионов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Эффективность деконсервации витрифицированных эмбрионов с использованием 1,2-пропандиола, ДМСО и сахарозы

Показатели	Группы эмбрионов			
	I	II	III	IV
1	2	3	4	4
Заморожено эмбрионов всего, п	17	18	19	19
из них эмбрионов мышей, п/%	10/100	10/100	10/100	10/100
из них эмбрионов коров, п/%	7/100	8/100	9/100	9/100
Оттаяно эмбрионов всего, п	17	18	19	19

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
из них эмбрионов мышей, п/%	10/100	10/100	10/100
из них эмбрионов коров, п/%	7/100	8/100	9/100
Сохранность после оттаивания, п/%	11/64,7 ± 11,59	14/77,8 ± 9,79	15/78,9 ± 8,37*
из них эмбрионов мышей, п/%	6/60,0	8/80,0	8/80,0
из них эмбрионов коров, п/%	5/71,4	6/75,0	7/77,8
Уровень дробления, п/%	7/63,6 ± 14,50	9/64,3 ± 12,80	13/86,7 ± 8,26*
из них эмбрионов мышей, п/%	4/66,7	5/62,5	7/87,5
из них эмбрионов коров, п/%	3/60,0	4/66,7	6/85,7

Анализ результатов исследований, представленных в таблице 3, позволяет отметить, что применение в качестве среды для деконсервации зародышей комплекса 15 %-го раствора 1,2-пропандиола, 20%-го раствора диметилсульфоксида совместно с 30%-м раствором сахарозы, последующее понижение концентрации указанных криофилактиков (1,2-PD-10 % + ДМСО-15 % + сахароза 30 %) и дальнейшая экспозиция в комплексе растворов (1,2-PD-5 % + ДМСО-10 % + сахароза 30 %) позволяет в наибольшей степени, среди испытываемых разведений 1,2-пропандиола и диметилсульфоксида, обеспечить сохранность эмбриоматериала после его оттаивания – 78,9 %, что на 14,2 и 1,1 п. п. выше по сравнению с I и II опытными группами ($P < 0,05$).

Установлено, что максимальный уровень дробления клеток, после культивирования эмбриоматериала, достоверно отмечен в III опытной группе – 86,7 %, что на 14,2 п. п. ($P < 0,05$) выше по сравнению с I и 22,4 п. п. – со II группами эмбрионов.

Выявлено также, что сохранность и уровень дробления исследуемого заморожено-оттаянного биоматериала мышей и крупного рогатого скота достоверно не различались между собой.

Результативность использования различных комплексов высококонцентрированных криопротекторов в качестве среды для деконсервации витрифицированных эмбрионов представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Эффективность трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота в зависимости от применения высококонцентрированных криопротекторов в качестве среды для деконсервации

Показатели	Группы зародышей		
	ЭГ + ДМСО + сахароза	ГЛ + ДМСО + сахароза	1,2-PD + ДМСО + сахароза
1	2	3	4
Заморожено зародышей, п	22	23	24
Оттаяно зародышей, п	22	23	24
Пригодных к пересадке в среднем по группе, п	13	14	13
Сохранность эмбрионов, %	59,1	60,9	54,2

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4
Пересажено реципиентам, n	13	14	13
Стельных реципиентов, n/%	4/30,8	4/28,5	3/23,1

Данные таблицы 4 позволяют сделать вывод, что применение в качестве среды для деконсервации комплекса криофилактиков 1,2-пропандиола, ДМСО и сахарозы позволило получить более низкую сохранность эмбрионов – 54,2 %. Сохранность эмбрионов, оттаивание которых проводили с использованием глицерина, ДМСО и сахарозы, составила 60,9 %, что незначительно отличалось от группы клеток, деконсервированных в смеси этиленгликоля, ДМСО и сахарозы – 59,1 %.

В то же время количество стельных реципиентов составило 30,8 % после пересадки им дефростированного с использованием комплекса ЭГ + ДМСО + сахароза эмбриоматериала, что на 2,3 и 7,7 п. п. выше по сравнению с результатами, полученными от комплексов ГЛ + ДМСО + сахароза и 1,2-PD + ДМСО + сахароза соответственно.

Таким образом, принимая во внимание, что сохранность эмбрионов при использовании комплексов ЭГ + ДМСО + сахароза и ГЛ + ДМСО + сахароза находилась на сравнительно одинаковом уровне, а число стельных реципиентов различалось на 2,3 п. п., можно предположить, что комплекс высококонцентрированных криопротекторов, состоящий из растворов этиленгликоля, диметилсульфоксида и сахарозы, применяемый в качестве среды для деконсервирования зародышей, замороженных методом витрификации, в отработанных нами концентрациях и с установленной экспозицией клеток, обладает наибольшими защитными свойствами по сравнению с другими комплексами и обеспечивает уровень стельности реципиентов на достаточно высоком уровне.

Заключение. Поэтапное выведение криозащитного комплекса по убывающей концентрации с добавлением 30 % сахарозы (ЭГ-20 % + ДМСО-20 % + сахароза – 1 мин; ЭГ-15 % + ДМСО-15 % + сахароза – 3 мин и ЭГ-10 % + ДМСО-10 % + сахароза – 3 мин) с последующим культивированием в поддерживающей среде holding в течение 5 мин при деконсервации витрифицированных зародышей млекопитающих позволяет повысить уровень их сохранности до 89,5 % и обеспечить способность к дальнейшему развитию 88,2 % эмбрионов в сравнении с другими сочетаниями высококонцентрированных криопротекторов.

Применение комплекса высококонцентрированных криопротекторов, состоящего из растворов этиленгликоля, диметилсульфоксида и сахарозы различных концентраций, при пересадке оттаянных витри-

фицированных эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* позволяет получить 30,8 % стельных реципиентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Prolonged culture of blastocysts after thawing as a tool for improving prediction of success / J. Haas [et.al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2018. – Vol. 35. – P. 2195-2199.
2. Improved outcome of frozen-thawed blastocyst transfer with Menezes's two-step thawing compared to the stepwise thawing protocol / J. Ding [et.al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2004. – Vol. 21, No. 6. – P. 203-210.
3. A monocentric analysis of the efficacy of extracellular cryoprotectants in unfrozen solutions for cleavage stage embryos / F. Capodanno [et al.] // Reproductive Biology and Endocrinology. – 2019. – Vol. 17. – P. 84.
4. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study / Z. Li [et.al.] // Human Reproduction. – 2014. – Vol. 29 (12). – P. 2794-801.
5. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance / L. Rienzi [et al.] // Human Reproduction Update. – 2017. – Vol. 23 (2). – P. 139-155.

УДК 636.2.084.1:636.087.6(476)

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОДУКТОВ ПЧЕЛОВОДСТВА В КОРМЛЕНИИ ТЕЛЯТ

Е. С. Высочина

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,

г. Гродно, ул. Терешковой, 28, e-mail: ggau@ggau.by)

Ключевые слова: телята, рационы, среднесуточные приросты, живая масса, морфо-биохимические показатели, иммунный статус, корм иммуностимулирующий «Апимик».

Аннотация. Использование корма иммуностимулирующего «Апимик» в рационе телят молочного периода способствует повышению среднесуточного прироста на 9,8 %, снижению затрат корма на 1 кг прироста живой массы на 8,9 % при сохранности телят – 100 %, активизации обмена веществ и повышению уровня естественной защиты организма молодняка.

Оценка экономической эффективности показала, что использование корма иммуностимулирующего «Апимик» при выращивании молодняка крупного рогатого скота способствует повышению уровня рентабельности на 4,45 п. п. по сравнению с контролем.