

УДК 636.2:612.64.089

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ
IN VITRO, ПОЛУЧЕННЫХ В СИСТЕМЕ
ТРАНСВАГИНАЛЬНОЙ АСПИРАЦИИ ООЦИТОВ**

**А. С. Дешко, В. К. Пестис, Л. В. Голубец, И. С. Кысса,
Ю. А. Якубец, А. А. Сехин, В. Н. Сурмач, Д. Н. Харитоник,
В. И. Белевич**

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,
г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.ru)

***Ключевые слова:** криоконсервация, криопротектор, глицерин, этиленгликоль, сохранность, выживаемость, бластоциста, качество.*

***Аннотация.** В статье представлены результаты исследований по изучению эффективности криоконсервации эмбрионов, полученных in vitro с использованием стандартных методов криоконсервации, используемых для замораживания эмбрионов in vivo. Как показал анализ полученных данных, криоконсервация эмбрионов, полученных in vitro по традиционным методикам, значительно снижает жизнеспособность зародышей после оттаивания по сравнению с эмбрионами in vivo. Так, при использовании в качестве криопротектора глицерина сохранность зародышей в целом составила 54,2-68,0 %, при использовании этиленгликоля – 56,6-62,1 %, в то же время эмбрионы in vivo, как показывает практика, остаются пригодными для пересадки после оттаивания в 98-100 % случаев. При использовании этиленгликоля сохранность эмбрионов отличного качества составила 56,9 %, а хорошего – 55,5 %. Поздние бластоцисты сохранились в 53,5 % случаев, а экспандированные в 60,0 %. При использовании глицерина сохранность эмбрионов на стадии поздней бластоцисты оказалась на 4,7 п. п. выше, по сравнению с бластоцистами экспандированными, а эмбрионы отличного качества показали сохранность на 25,3 п.п. выше, чем эмбрионы хорошего качества.*

**EFFICIENCY OF CRYOPRESERVATION OF EMBRYOS IN
VITRO OBTAINED IN THE SYSTEM OF TRANSVAGINAL
OOCTE ASPIRATION**

**A. S. Deshko, V. K. Pestis, L. V. Golubets, I. S. Kyssa, Yu. A. Yakubets,
A. A. Sekhin, V. N. Surmach, D. N. Haritonik, V. I. Belevich**

EU «Grodno state agrarian university»
Grodno, Republic of Belarus (Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28
Tereshkova st.; e-mail: ggau@ggau.by)

***Key words:** cryopreservation, cryoprotector, glycerin, ethylene glycol, safety, survival, blastocyst, quality.*

Summary. *The article presents the results of research on the effectiveness of cryopreservation of embryos obtained in vitro using standard cryopreservation methods used for freezing embryos in vivo. According to the analysis of the obtained data, cryopreservation of embryos obtained in vitro using traditional methods significantly reduces the viability of embryos after thawing compared to in vivo embryos. Thus, when using glycerol as a cryoprotector, the safety of embryos in General was 54,2-68,0 %, when using ethylene glycol 56,6-62,1 %, while in vivo embryos, as practice shows, remain suitable for transplantation after thawing in 98-100 % of cases. When using ethylene glycol, the safety of embryos of excellent quality was 56,9 %, and good 55,5 %. Late blastocysts were preserved in 53,5 % of cases, and expanded blastocysts in 60.0 %. When using glycerol, the safety of embryos at the late blastocyst stage was 4,7 PP. higher in comparison with expanded blastocysts, and embryos of excellent quality showed preservation by 25,3 p. p. higher, compared with embryos of good quality.*

(Поступила в редакцию 01.06.2020 г.)

Введение. Первая успешная криоконсервация эмбрионов млекопитающих была проведена Whitingham et. al. в 1972 г. [6]. С тех пор заморозка зародышей стала неотъемлемой составляющей технологии трансплантации эмбрионов, полученных как с использованием гормональной стимуляции суперовуляции (in vivo), так и полученных в культуре in vitro.

Возможность долговременного хранения зародышей при низких температурах позволила значительно удешевить, упростить и повысить эффективность использования лучших мировых генетических ресурсов за счет импорта-экспорта не животных, а эмбрионов, послужила предпосылкой создания и сохранения генофонда редких и исчезающих пород, внесла в работу по трансплантации элемент планирования [1].

Однако эффективность метода по-прежнему во многом определяется визуальной оценкой морфологического состояния их отдельных структур, использующихся криопротекторов и криочувствительностью самих клеток. Как показали научные исследования и практический опыт, эмбрионы, полученные в культуре in vitro при использовании обычных методов криоконсервации, показали более высокую чувствительность к снижению температуры и снижали выживаемость после оттаивания по сравнению со своими аналогами in vivo. Pollard J. W. и Leibo S. P. [4] отмечают, что эмбрионы in vitro не способны выдержать процесс криоконсервации также хорошо, как эмбрионы in vivo. Как позднее было установлено, причиной этому является избыточное накопление липидов в структурах клетки в процессе культивирования вне организма, которые нарушают процесс кристаллизации в процессе замораживания, что и приводит к необратимым повреждениям и гибели клетки [3, 5]. В связи с изложенным выше, исследования, направ-

ленные на повышение сохранности и выживаемости эмбрионов *in vitro* в процессе их криоконсервации и последующего оттаивания, должны лежать в области физико-химических процессов происходящих в структурах клетки на протяжении этого периода [2, 3].

Цель работы – изучить выживаемость эмбрионов после криоконсервации с учетом их стадии развития и качества, а также используемых криопротекторов и способа оттаивания.

Материал и методика исследований. Трансвагинальная пункция фолликулов проводилась с использованием ультразвуковой системы Aloka SSD 500. Локализацию ооцит-кумулюсных комплексов проводили с помощью эмбрионального фильтра «EMCON», поиск и оценку качества полученных ооцитов осуществляли под микроскопом «Olympus» при 16- и 90-кратном увеличении, соответственно. В качестве основной питательной среды для созревания ооцитов использовали TCM 199, для культивирования ранних зародышей – TCM 199 и SOF с добавлением бикарбоната и пирувата натрия, а также гентамицина. В качестве средовых факторов служили эстральная и фетальная сыворотка в концентрации 15 %, а также фолликулостимулирующие гормоны. Подготовку спермы к оплодотворению проводили с использованием методик Swim Up и градиента Перколл. Криоконсервацию эмбрионов проводили с использованием этиленгликоля в концентрации 1,5; 1,8; 3,6 М (моль) и глицерин в концентрации 10 % и 1,4 М. Оттаивание эмбрионов проводилось в соответствии с поставленными задачами. При криоконсервации учитывались стадия развития и качество эмбрионов.

Результаты исследований и их обсуждение. В своих исследованиях мы изучали возможность криоконсервации blastocyst, полученных *in vitro* по традиционным методикам с использованием программного замораживателя. В качестве криопротекторов служили этиленгликоль и глицерин в разных концентрациях. Результаты, полученные в ходе исследований, представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Эффективность криоконсервации эмбрионов *in vitro* в этиленгликоле

Концентрация этиленгликоля	Заморожено эмбрионов	Оттаяно эмбрионов	Сохранило жизнеспособность	Уровень сохранности
1,5 М	27	27	16	59,6
1,8 М	29	29	18	62,1
3,6 М	27	27	13	48,1
ИТОГО	83	83	47	56,6

Из анализа приведенных в таблице 1 данных видно, что более высокие результаты по сохранности получены при использовании этиленгликоля в концентрации 1,5 и 1,8 М. Сохранность клеток при этом

составила 59,6 и 62,1 % соответственно, что на 11,5 и 14,0 п. п. выше по сравнению с концентрацией криопротектора 3,6 М, но в целом сохранность оказалась на достаточно низком уровне по сравнению с заморозкой эмбрионов, полученных в результате гормональной стимуляции суперовуляции, сохранность которых, как правило, составляет в пределах 100 %.

Что касается эффективности криоконсервации эмбрионов в зависимости от стадии их развития и качества (таблица 2), здесь следует отметить то, что в целом сохранность эмбрионов отличного качества составила 56,9 %, а хорошего – 55,5 %. Поздние бластоцисты сохранились в 53,5 % случаев, а экспандированные – в 60,0 %. При этом свое качество после оттаивания сохранили 8,1 % отличных эмбрионов, 60,0 % хорошего качества, 13,0 % поздних бластоцист и 25,0 % экспандированных. Поздние бластоцисты лучше всего сохранялись в 1,8 М этиленгликоле (62,5 %), а экспандированные – в 1,5М (66,7 %).

Таблица 2 – Эффективность криоконсервации эмбрионов в этиленгликоле в зависимости от стадии развития и качества

Криопротектор	Стадия развития	Качество	Заморожено эмбрионов	Оттаяно эмбрионов	Сохранили жизнеспособность, п-%	из них сохранило качество, п-%
1	2	3	4	5	6	7
1,5 М этиленгликоль	Бластоциста поздняя	отл.	14	14	8-57,1	0
		хор.	1	1	0	0
	Итого		15	15	8-53,3	0
	Бластоциста экспандированная	отл.	7	7	4-57,1	0
хор.		5	5	4-80,0	3	
Итого		12	12	8-66,7	3-37,5	
ИТОГО			27	27	16-59,5	3-18,7
1,8 М этиленгликоль	Бластоциста поздняя	отл.	14	14	8-57,1	2
		хор.	2	2	2-100	0
	Итого		16	16	10-62,5	2-20,0
	Бластоциста экспандированная	отл.	11	11	7-63,6	0
		хор.	2	2	1-50,0	0
Итого		13	13	8-61,5	0	
ИТОГО			29	29	18-62,1	2-11,1
3,6 М этиленгликоль	Бластоциста поздняя	отл.	7	7	4-57,1	0
		хор.	5	5	1-20,0	1
	Итого		12	12	5-41,7	1-20,0
	Бластоциста экспандированная	отл.	12	12	6-50,0	1
		хор.	3	3	2-66,7	2
Итого		15	15	8-53,3	3-37,5	
ИТОГО			27	27	13-48,1	4-57,1

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	
ВСЕГО	Бластоциста поздняя	отл.	35	35	20	2	
		хор.	8	8	3	1	
	Итого			43	43	23-53,5	3-13,0
	Бластоциста экспандированная	отл.	30	30	17	1	
		хор.	10	10	7	5	
	Итого			40	40	24-60,0	6-25,0
	Эмбрионов всего			83	83	47-56,6	9-19,1
	В т. ч.		отличных	65	65	37-56,9	3-8,1
			хороших	18	18	10-55,5	6-60,0
Бл II			43	43	23-53,5	3-13,0	
Бл III			40	40	24-60,0	6-25,0	

При использовании глицерина, как правило, насыщение им эмбрионов, проводится в одну или четыре ступени, с повышением концентрации, а выведение в три ступени, с понижением концентрации. В своих исследованиях по криоконсервации эмбрионов, полученных в культуре *in vitro*, мы дополнительно использовали одномоментное насыщение и одномоментное удаление криопротектора.

Результаты исследований по изучению эффективности криоконсервации эмбрионов *in vitro* в глицерине представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Эффективность криоконсервации эмбрионов *in vitro* в глицерине

Концентрация глицерина	Насыщение криопротектором	Удаление криопротектора	Заморожено эмбрионов	Оттаяно эмбрионов	Сохранило жизнеспособность	Уровень сохранности
10 %	1-ступенчатое	1-ступенчатое	24	24	13	54,2
1,4 М-а	1-ступенчатое	3-ступенчатое	22	22	11	50,0
1,4 М-в	4-ступенчатое	3-ступенчатое	25	25	17	68,0

Как показывают представленные данные таблицы 3, сохранность оказалась несколько ниже у эмбрионов, насыщение криопротектором которых проходило в одну ступень, а его выведение в три: 50,0 % против 54,2 и 68,0 %, при 1-ступенчатом насыщении и выведении и 4-ступенчатом насыщении и 3-ступенчатом удалении соответственно.

Эффективность криоконсервации эмбрионов в глицерине в зависимости от стадии развития и качества представлена в таблице 4.

Из данных таблицы 4 видно, что эффективность криоконсервации эмбрионов на стадии поздней бластоцисты оказалась на 4,7 п. п. выше по сравнению с бластоцистами экспандированными, а эмбрионы отличного качества показали сохранность на 25,3 п. п. выше по сравнению с эмбрионами хорошего качества. При этом из сохранившихся жиз-

неспособность свое качество после оттаивания сохранили 15,8 % поздних бластоцист, 12,0 % экспандированных, 5,9 % эмбрионов отличного качества и 40,0 % эмбрионов хорошего качества. Остальные эмбрионы свое качество после оттаивания снижали.

Таблица 4 – Эффективность криоконсервации эмбрионов в глицерине в зависимости от стадии развития и качества

Криопротектор	Стадия развития	Качество	Заморожено эмбрионов	Оттаяно эмбрионов	Сохранили жизнеспособность, п-%	из них сохранило качество, п-%
Глицерин 10 %	Бластоциста поздняя	отл.	7	7	5	0
		хор.	4	4	1	1
	Итого		11	11	6-54,5	1-16,7
	Бластоциста экспандированная	отл.	12	12	7	1
		хор.	1	1	0	0
Итого		13	13	7-53,8	1-14,3	
ИТОГО			24	24	13-54,2	2-15,4
Глицерин 1,4 М-а	Бластоциста поздняя	отл.	12	12	5	0
		хор.	1	1	0	0
	Итого		13	13	5-38,5	0
	Бластоциста экспандированная	отл.	7	7	4	0
		хор.	2	2	2	2
Итого		9	9	6-66,7	2-33,3	
ИТОГО			22	22	11-50,0	2-18,2
Глицерин 1,4 М-в	Бластоциста поздняя	отл.	10	10	7	1
		хор.	2	2	1	1
	Итого		12	12	8-66,7	2-25,0
	Бластоциста экспандированная	отл.	10	10	6	0
		хор.	3	3	3	2
Итого		13	13	9-69,2	2-22,2	
ИТОГО			25	25	17-68,0	4-23,5
ВСЕГО	Бластоциста поздняя	отл.	29	29	17	1
		хор.	7	7	2	2
	Итого		36	36	19-52,8	3-15,8
	Бластоциста экспандированная	отл.	29	29	17	1
		хор.	23	23	8	2
	Итого		35	52	25-48,1	3-12,0
	Эмбрионов всего		71	71	44-62,0	6-13,6
	В т. ч.	отличных	58	58	34-58,6	2-5,9
хороших		30	30	10-33,3	4-40,0	

Заключение. Таким образом, как показал анализ полученных результатов, установлена более высокая эффективность этиленгликоля в концентрации 1,5 и 1,8 М. Уровень сохранности эмбрионов после оттаивания составил 59,6-62,1 %. Установлена более высокая эффективность криоконсервации эмбрионов при четырехэтапном насыщении и

трехэтапном удалении глицерина. Уровень сохранности при таком режиме насыщения и удаления криопротектора превышал уровень сохранности при использовании одномоментного насыщения и удаления криопротектора на 13,8 п. п. (10 % глицерин) и на 18,0 п. п. при использовании одномоментного насыщения и трехэтапного удаления (1,4 М глицерин).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hasler, J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle / J. F. Hasler // *Reprod. Sci.* – 2003. Vol. 15. – P. 245-264.
2. Leibo, S. One-step-methods for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos / S. Leibo // *Theriogenology.* – 1984. – Vol. 21. – P. 767-790.
3. The genetics of chilling sausetivity of bovine oocytes cooled to non physiological temperatures / M. Martino [et. al.] // *Theriogenology.* – 1995. – Vol. 43. – P. 272-289.
4. Pollard, J. W. Comparative cryobiology ofin vitro and in vivo produced bovine embryos / J. W. Pollard, S. P. Leibo // *Theriogenology.* – 1993. – Vol. 30. – P. 287-317.
5. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification / M. J. Sudano [et. al.] // *Theriogenology.* – 2011. – Vol. 75. – P. 1211-1220.
6. Whitingham, D. G. Survival of mouse embryo frozen to -1960C and -2960C / D. G. Whitingham, S. P. Leibo, P. Mazur // *Science.* – 1972. – Vol. 178. – P. 411-414.

УДК 636.2.034

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНА LTF В СЕЛЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

О. А. Епишко, В. В. Пешко, А. А. Ситько, Н. Н. Пешко

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,
г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: valik-11@mail.ru)

Ключевые слова: ген лактоферрина, молочная продуктивность, соматические клетки, крупный рогатый скот.

Аннотация. В популяции коров белорусской черно-пестрой породы, установлен полиморфизм гена лактоферрина (LTF). Выявлены генотипы LTF^{AA} и LTF^{AB}. Определена частота встречаемости аллелей и генотипов по гену лактоферрина. Изучена молочная продуктивность коров с различными генотипами по гену лактоферрина. Установлено положительное влияние аллеля LTF^A и генотипа LTF^{AA} на показатели молочной продуктивности у коров.