

А.И. БУДЕВИЧ, Ю.К. КИРИКОВИЧ, С.А. САПСАЛЁВ, С.В. КОЗЛОВ

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ (РЕЖИМОВ) ОТТАИВАНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КОЗ

*Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

В статье представлены результаты исследования жизнеспособности деконсервированных зародышей коз в зависимости от различных технологических режимов оттаивания, применяемых в технологии трансплантации мелкого рогатого скота. Установлено, что применение двухступенчатого режима оттаивания (последовательное нагревание пайетт на воздухе при температуре +20 °С в течение 10 секунд, а затем в водяной бане при +37 °С также 10 секунд) в отличие от одноступенчатого (оттаивание замороженных пайетт в водяной бане при температуре +37 °С в течение 10 секунд) позволяет увеличить число зародышей, сохранивших своё первоначальное отличное качество, на 19,3 п. п., 7,0 и 14,7 п. п., долю клеток отличного и хорошего качества – на 6,9 п. п., 6,8 и 11,4 п. п., выход пригодных к трансплантации эмбрионов – на 3,6 п. п., 6,5 и 19,3 п. п. при криоконсервации биоматериала коз в различных криопротекторах на основе глицерина, этиленгликоля и диметилсульфоксида соответственно.

Ключевые слова: коза, жизнеспособность, деконсервация, эмбрион, криофилактик.

A.I. BUDEVICH, Y.K. KIRIKOVICH, S.A. SAPSALEV, S.V. KOZLOV

EFFECT OF TECHNOLOGICAL PARAMETERS (MODES) OF THAWING ON THE VIABILITY OF DEPRESERVED GOAT EMBRYOS

*Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences
of Belarus for Animal Breeding, Zhodino, Republic of Belarus*

The article presents the results of the study of the viability of depreserved goat embryos depending on different technological modes of thawing used in the technology of transplantation of small ruminants. It has been established that the use of a two-stage thawing mode (successive heating of the straws in air at a temperature of +20 °C for 10 seconds, and then in a water bath at +37 °C also for 10 seconds), in contrast to a single-stage thawing mode (thawing of frozen straws in a water bath at +37 °C for 10 seconds), allows to increase the number of embryos that have retained their original excellent quality by 19.3 p.p., 7.0 and 14.7 p.p., the proportion of cells of

excellent and good quality - by 6.9 p.p., 6.8 and 11.4 p.p., the yield of embryos suitable for transplantation - by 3.6 p.p., 6.5 and 19.3 p.p. with cryopreservation of goat bio-material in various cryoprotectants based on glycerol, ethylene glycol and dimethyl sulfoxide, respectively.

Keywords: goat, viability, depreservation, embryo, cryoprotectant.

Введение. При низкотемпературной консервации выбор режима замораживания определяет подбор наиболее благоприятных для эмбрионов режимов оттаивания. Медленное замораживание до $-60-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ сопровождается более полной дегидратацией клеток, что препятствует образованию внутриклеточных кристаллов с последующим переходом биообъекта в твёрдое состояние. Данная методика охлаждения требует и медленного оттаивания со скоростью $4-12\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Режим быстрого замораживания (до $-35-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,3-0,6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ с последующим переносом в жидкий азот) подразумевает высокие скорости оттаивания (до $800\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). При таком методе замораживания полной дегидратации клеточных структур не происходит, и оттаивание в водяной бане при $36-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение нескольких секунд позволяет сохранять жизнеспособными до 90 % замораживаемых зародышей [1].

Ряд авторов в своих исследованиях предлагают использовать поэтапное оттаивание зародышей: на воздухе в течение 3-5 секунд с целью снижения частоты сколов зоны пеллюцида с последующим помещением пайетт в водяную баню с температурой $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 25-30 секунд. Соблюдение данных условий при трансплантации заморожено-оттаянных эмбрионов, полученных *in vivo*, позволяет констатировать беременность у крупного рогатого скота на уровне 60-70 % [2], 65-75 % у овец [3] и 60-70 % у коз [4], а полученных *in vitro* – 40-50 % [5], 25-35 % [6] и 30-40 % [7] соответственно.

А.М. Kose и Т. Tekeli оттаивание зародышей осуществляли при комнатной температуре в течение 10 с, а затем в водяной бане при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 с. По результатам исследования жизнеспособность эмбрионов через 24 ч, 48 и 72 ч составила 51,3 %, 20,5 и 15,4 % для морул и 64,5 %, 41,9 и 32,3 % для бластоцист, 78,6 %, 46,4 и 32,1 % для эмбрионов отличного и 35,5 %, 17,8 и 17,8 % для зародышей хорошего качества соответственно [8].

Р. Li и W.N. Cameron, применяя два способа оттаивания (быстрый – путём погружения соломинок в водяную баню при $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ примерно на 30 с и медленный – перемещая пайетты из жидкого азота в программируемое устройство, предварительно охлаждённое до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, с последующим нагревом до $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ при скорости $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$), установили, что сохранность эмбрионов после деконсервации возрастала по мере увеличения их стадии развития. Все бластоцисты пережили замораживание независимо от того, какой криопротектор использовался при

охлаждении и какой способ оттаивания для разморозки, тогда как 22 морулы, криоконсервированные в ДМСО, погибли, и только 12 из 63 морул (19,0 %), замороженные в глицерине, выжили после быстрого оттаивания [9].

В других исследованиях [10] жизнеспособность бластоцист криоконсервированных с использованием глицерина, этиленгликоля и диметилсульфоксида и быстрого метода оттаивания (погружения пайетт в водяную баню при 37 °С в течение 1 мин.), была значительно выше, чем морул (54,0 против 16,0 % (этиленгликоль), 41,0 против 9,0 % (диметилсульфоксид) и 9,0 против 2,0 % (глицерин) соответственно).

В соответствии с этим возникает необходимость в изучении жизнеспособности деконсервированных зародышей коз в зависимости от различных технологических режимов оттаивания, применяемых в технологии трансплантации мелкого рогатого скота.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в лаборатории воспроизводства, трансплантации эмбрионов и трансгенеза животных, на Биотехнологическом научно-экспериментальном производстве по трансгенезу животных РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». Объектом исследования служили эмбрионы на стадии развития морула-бластоциста, отличного и хорошего качества, полученные от клинически здоровых половозрелых трансгенных коз-доноров (несущие в геноме конструкцию ДНК (rhLf5 длиной 35013 bp, содержащая копию геномной последовательности лактоферрина человека под контролем бета-казеинового промотора коз, повтор из двух инсульторов бета-глобинового гена кур, нетранслируемые области), с содержанием рекомбинантного лактоферрина человека в молоке 3 г/л и выше, и нетрансгенных самок зааненской породы.

В качестве криозащитных сред применялись проникающие криофиллактики: диметилсульфоксид (Sigma, USA), этиленгликоль (IMV Technologies, France) и глицерин (EMCARE ICPbio Reproduction, USA). Разморозка зародышей осуществлялась двумя способами:

- оттаивание замороженных пайетт в водяной бане при температуре +37 °С в течение 10 секунд до полного исчезновения льда (скорость нагревания – до 1380 °С/мин.);

- оттаивание пайетт на воздухе при температуре +20 °С в течение 10 секунд, затем в водяной бане при +37 °С на 10 секунд (скорость нагревания – до 700 °С/мин).

После удаления защитных сред оттаянные эмбрионы культивировались в условиях инкубатора при концентрации CO₂ – 5 %, температуре 39 °С и максимальной влажности 95-98 % в течение 1 часа в чашках Петри под минеральным маслом в средах M-199 и KSOM,

сбалансированной по концентрации водородных ионов (рН 7,2-7,4) и осмолярности (280-300 мОсм/кг), с добавлением инактивированной эмбриональной сыворотки (10 % по объёму), BSA – 0,4 % и канамицина – 50 мкг/мл с последующей повторной визуальной оценкой их качества при 63-кратном увеличении микроскопа OPTON.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Влияние режима оттаивания на сохранность эмбрионов при их криоконсервировании в 1,5М глицерине представлена в таблице 1. Анализ представленных результатов исследований свидетельствует об увеличении доли эмбрионов отличного и хорошего качества, сохранивших свою жизнеспособность к дальнейшему использованию после их размораживания с применением ступенчатого режима оттаивания. Так, в контрольной и опытной группах данный показатель составил 76,2 и 79,2 % зародышей соответственно, в то время как использование для нагревания одноступенчатого режима при непосредственном помещении пайетт в водяную баню позволило получить 70,0 % эмбрионов отличного и хорошего качества. Первоначальное отличное качество после деконсервации сохранили 27,3 и 44,4 % клеток при использовании первого режима и 52,9 и 55,6 % зародышей – при применении второго режима в контрольных и опытных группах соответственно.

Таблица 1 – Результаты оценки качества деконсервированных эмбрионов при использовании различных режимов оттаивания при их криоконсервации в 1,5М растворе глицерина

Показатель		Режим оттаивания			
		10 сек. +37 °С		10 сек. +20 °С 10 сек. +37 °С	
		до заморозки	после оттаивания	до заморозки	после оттаивания
1	2	3	4	5	
контрольная группа					
Количество эмбрионов	n	14	14	21	21
	%	100,0	100,0	100,0	100,0
в том числе отличного качества	n	11	3	17	9
	%	78,6	21,4	81,0	42,9
хорошего качества	n	3	7	4	7
	%	21,4	50,0	19,0	33,3
Удовлетворительного качества	n		2		3
	%	-	14,3	-	14,3
Неудовлетворительного качества	n		2		2
	%	-	14,3	-	9,5

Продолжение таблицы 1

1		2	3	4	5
Пригодных к пересадке	n	14	12	21	19
	%	100,0	85,7	100,0	90,5
Средний балл		4,79±0,11	3,79± 0,26	4,81± 0,09	4,10± 0,22
Снижение качества после оттаивания, баллы		1,0		0,71	
опытная группа					
Количество эмбрионов	n	10	10	24	24
	%	100,0	100,0	100,0	100,0
в том числе отличного качества	n	9	4	18	10
	%	90,0	40,0	75,0	41,7
хорошего качества	n	1	3	6	9
	%	10,0	30,0	25,0	37,5
удовлетворительного качества	n		2		3
	%	-	20,0	-	12,5
неудовлетворительного качества	n		1		2
	%	-	10,0	-	8,3
пригодных к пересадке	n	10	9	24	22
	%	100,0	90,0	100,0	91,7
Средний балл		4,9± 0,1	4,08± 0,29	4,75± 0,09	4,13± 0,19
Снижение качества после оттаивания, баллы		0,82		0,62	

В таблице 2 приведены результаты эксперимента по жизнеспособности дефростированных зародышей, замороженных в 1,5М растворе этиленгликоля, в зависимости от режима оттаивания.

Таблица 2 – Результаты оценки качества замороженно-оттаянных эмбрионов при применении различных режимов оттаивания при их криоконсервации в 1,5М растворе этиленгликоля

Показатель	Режим оттаивания				
	10 сек. +37 °С		10 сек. +20 °С 10 сек. +37 °С		
	до заморозки	после оттаивания	до заморозки	после оттаивания	
1	2	3	4	5	
контрольная группа					
Количество эмбрионов	n	13	13	27	27
	%	100,0	100,0	100,0	100,0

Продолжение таблицы 2

1		2	3	4	5
в том числе отличного качества	n	9	6	20	14
	%	69,2	46,2	74,1	51,9
хорошего качества	n	4	6	7	11
	%	30,8	46,2	25,9	40,7
удовлетворительного качества	n				1
	%	-	-	-	3,7
неудовлетворительного качества	n		1		1
	%	-	7,7	-	3,7
пригодных к пересадке	n	13	12	27	26
	%	100,0	92,3	100,0	96,3
Средний балл		4,69± 0,13	4,38± 0,24	4,74± 0,09	4,41± 0,14
Снижение качества после оттаивания, баллы		0,31		0,33	
опытная группа					
Количество эмбрионов	n	20	20	11	11
	%	100,0	100,0	100,0	100,0
в том числе отличного качества	n	16	11	8	7
	%	80,0	55,0	72,7	63,6
хорошего качества	n	4	6	3	4
	%	20,0	30,0	27,3	36,4
удовлетворительного качества	n		1		
	%	-	5,0	-	-
неудовлетворительного качества	n		2		
	%	-	10,0	-	-
пригодных к пересадке	n	20	18	11	11
	%	100,0	90,0	100,0	100,0
Средний балл		4,8± 0,09	4,3± 0,22	4,73± 0,14	4,64± 0,15
Снижение качества после оттаивания, баллы		0,5		0,09	

Результаты проведённых экспериментов выявили увеличение уровня жизнеспособности размораживаемых зародышей, для консервации которых использован 1,5М раствор этиленгликоля с поэтапным его выведением во всех группах независимо от скорости оттаивания. После стереомикроскопической оценки морфологически пригодными к

трансплантации были признаны 96,3 и 100,0 % зародышей при двухступенчатом режиме оттаивания и 92,3 и 90,0 % клеток – при одноступенчатом в контрольных и опытных группах соответственно. Применение поэтапного нагревания пайетт позволило повысить выход отличных зародышей, сохранивших своё первоначальное состояние на 3,3 и 18,7 п. п. в контрольной и опытной группах, чем при использовании одноэтапного режима оттаивания. Высокий выход полноценных эмбрионов отличного и хорошего качества позволил добиться получения минимального количества непригодных зародышей, который в среднем для двухступенчатого режима оттаивания составил 3,7 % и одноступенчатого – 11,4 %.

Результаты регенерационной способности деконсервированных зародышей разными режимами оттаивания представлены в таблице 3.

Полученные данные указывают на значимое превосходство поэтапного нагревания пайетт над непосредственным переносом в водяную баню. Применение одноэтапного режима «водяная баня» позволило получить 80,0 и 76,9% жизнеспособных зародышей, пригодных к трансплантации, из которых 70,0 и 69,2% пришлось на долю клеток отличного и хорошего качества, в том числе свое отличное качество первоначально сохранили 42,9 и 55,6% зародышей в контрольной и опытной группах соответственно. В свою очередь, использование режима «воздух-водяная баня» позволило увеличить выход пригодных к аппликации зародышей до 95,5% и 100,0%, а также количество клеток отличного качества, сохранивших свою первоначальную оценку после криоконсервирования, до 66,7 и 63,2% в контрольной и опытной группах соответственно.

Таблица 3 – Результаты оценки качества оттаянных зародышей, криоконсервированных в 1,5М растворе диметилсульфоксида с различной скоростью оттаивания

Показатель		Режим оттаивания			
		10 сек. +37 °С		10 сек. +20 °С 10 сек. +37 °С	
		до заморозки	после оттаивания	до заморозки	после оттаивания
1	2	3	4	5	
контрольная группа					
Количество эмбрионов	n	10	10	22	22
	%	100,0	100,0	100,0	100,0
в том числе отличного качества	n	7	3	15	10
	%	70,0	30,0	68,2	45,5

Продолжение таблицы 3

1		2	3	4	5
хорошего качества	n	3	4	7	6
	%	30,0	40,0	31,8	27,3
удовлетворительного качества	n	-	1	-	5
	%		10,0		22,7
неудовлетворительного качества	n	-	2	-	1
	%		20,0		4,5
пригодных к пересадке	n	10	8	22	21
	%	100,0	80,0	100,0	95,5
Средний балл		4,7± 0,15	3,8± 0,36	4,68± 0,1	4,14± 0,2
Снижение качества после оттаивания, баллы		0,9		0,54	
опытная группа					
Количество эмбрионов	n	13	13	20	20
	%	100,0	100,0	100,0	100,0
в том числе отличного качества	n	9	5	19	12
	%	69,2	38,5	95,0	60,0
хорошего качества	n	4	4	1	6
	%	30,8	30,8	5,0	30,0
удовлетворительного качества	n	-	1	-	2
	%		7,7		10,0
неудовлетворительного качества	n	-	3	-	-
	%		23,1		-
пригодных к пересадке	n	13	10	20	20
	%	100,0	76,9	100,0	100,0
Средний балл		4,69± 0,13	3,69± 0,33	4,95± 0,05	4,05± 0,15
Снижение качества после оттаивания, баллы		1,0		0,9	

Заключение.

1. Установлено, что применение 1,5М раствора глицерина для криоконсервирования с последующим двухступенчатым оттаиванием зародышей, полученных от генно-модифицированных коз, в отличие от одноступенчатого позволяет увеличить выход пригодных к трансплантации зародышей на 4,7 и 1,7 п. п., долю эмбрионов отличного и хорошего качества – на 4,8 и 9,2 п. п., выход эмбрионов, восстановивших свое первоначальное отличное качество после оттаивания, – на 25,6 и 11,2 п.

п. в контрольных и опытных группах соответственно.

2. Использование поэтапного режима оттаивания зародышей, предварительно замороженных в криозащитной среде на основе 1,5М раствора этиленгликоля, позволили увеличить долю пригодных к пересадке клеток на 4,0 и 10,0 п. п., выход отличных эмбрионов, сохранивших свое первоначальное качество, – на 3,3 и 18,7 п. п. в контрольных и опытных группах соответственно, чем при использовании одноэтапного режима (непосредственное помещение в водяную баню).

3. Применение 1,5М раствора ДМСО с последующим оттаиваниям в режиме «воздух-водяная баня» в опытной группе позволило повысить количество пригодных к пересадке зародышей на 4,5 и 20,0 п. п. по сравнению с контрольными группами и на 23,1 п. п. в сравнении с опытной группой при соблюдении режима «водяная баня», выход клеток отличного и хорошего качества на 17,3-20,0 и 20,8 п. п. соответственно при стабильном получении 63,2 % эмбрионов отличного качества, сохранивших своё первоначальное развитие.

Литература

1. Эрнст, Л. К. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных / Л. К. Эрнст, Н. И. Сергеев. – Москва : ВО Агрпроммиздат, 1989. – 284 с.
2. Hasler, J. F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle / J. F. Hasler // *Theriogenology*. – 2001. – Vol. 56. – P. 1401-1415.
3. Shelton, J. N. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos / J. N. Shelton // *Theriogenology*. – 1992. – Vol. 37. – P. 713-721.
4. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos / F. Guignot [et al.] // *Theriogenology*. – 2006. – Vol. 66. – P. 1004-1011. – Also: Bouttier A., Baril G., Salvetti P., Pignon P., Beckers J.F., Touze J.L., Cognie J., Traldi A. S., Cognie Y., Mermillod P.
5. Hasler, J. F. The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine / J. F. Hasler // *J. Anim. Sci.* – 1998. – Vol. 76, Suppl. 3. – P. 52-74.
6. Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos / A. G. Martínez [et al.] // *Small Ruminant Research*. – 2006. – Vol. 63. – P. 288-296. – Also: Valcárcel A., Furnus C.C., de Matos D.G., Iorio G., de las Heras M.A.
7. Caprine offspring born from fresh and frozen-thawed in vitro-produced embryos / Y. Han [et al.] // *Veterinary Record*. – 2001. – Vol. 149. – P. 714-716. – Also: Meintjes M., Graff K., Denniston R., Zhang L., Ziomek C., Godke R.
8. Kose, A. M. In vitro culture of in vivo Saanen goat embryos by vitrification / A. M. Kose, T. Tekeli. // *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* – 2016. – Vol. 40. – P. 603-608.
9. Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development / R. Li [et al.] // *Reproduction, Fertility and Development*. – 1990. – Vol. 2(4). – P. 345-350. – Also: Li R, Cameron WN, Batt PA, Trounson AO.
10. Evaluation of cryopreservation techniques for goat embryos / F. Fiéni [et al.] // *Reproduction Nutrition Development*. – 1995. – Vol. 35(4). – P. 367-373. – Also: Beckers J., Buggin M., Bruyas J., Perrin J., Daubié M., Tainturier D.

Поступила 4.03.2022 г.