

ным кормлением и использованием скота, комфортным его содержанием, где средние показатели удоев составляют 8-10 тыс. кг молока за 305 дней лактации. Импортные животные обладают высоким генетическим потенциалом молочной продуктивности (более 10000 кг) молока.

#### Литература

1. Республиканская программа по племенному делу в животноводстве на 2007-2010 годы. – Жодино, 2008. – 475 с.
2. Прохоренко, П. Н. Современные методы генетики и селекции в животноводстве / П. Н. Прохоренко // Материалы международной научной конференции. – СПб, 2007. – С. 3-5.
3. Прохоренко, П. Н. Интенсификация молочного скотоводства на основе использования голштинской породы / П. Н. Прохоренко // Бюллетень ГНУ «ВНИИ генетики и разведения с.-х. животных». – СПб, 2012. – Вып. 151. – С. 3-6.
4. Селекционно-генетические методы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных : сб. науч. тр. / Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. науч.-исслед. ин-т генетики и разведения с.-х. животных ; редкол. : П. Н. Прохоренко (отв. ред.) [и др.]. – СПб, 2004. – 239 с.
5. Климов, Н. Н. Характеристика коров различных генотипов и линий по показателям пожизненной продуктивности в зависимости от причин их выбытия из стада / Н. Н. Климов, Т. М. Василец // Бюллетень ГНУ «ВНИИ генетики и разведения с.-х. животных». – СПб, 2012. – Вып. 151. – С. 14-16

Поступила 26.03.2013 г.

УДК 636.2.034:612.02

Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, А.И. ГАНДЖА, В.П. СИМОНЕНКО,  
О.П. КУРАК., Н.В. ЖУРИНА, М.А. КОВАЛЬЧУК

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МНОГОАТОМНЫХ СПИРТОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ ЭМБРИОНОВ КОРОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ВНЕ ОРГАНИЗМА

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук  
Беларуси по животноводству»

**Введение.** Проведение селекционного процесса в современных условиях невозможно без широкого использования биотехнологии, в том числе ее главных направлений – клеточной и геномной инженерии, криобиологии. Технология получения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма открывает новые возможности интенсификации процессов воспроизведения высокоценных генотипов животных, способствующих ускорению селекции и сохранению генетических ресурсов в

Республике Беларусь. Реализация этих возможностей сдерживается рядом причин, из-за которых большая часть потенциального запаса нереализованного генетического материала яйцеклеток высокопродуктивных коров не используется в селекционном процессе. Для решения этого вопроса необходима разработка способов длительного хранения биологического материала в глубоководном состоянии. В этом плане перспективным направлением является криоконсервирование ооцитов и ранних зародышей, полученных вне организма, что позволит создать банк генетического материала высокоценных животных и осуществлять их транспортировку на дальние расстояния. Глубокое замораживание в жидком азоте является на современном этапе одним из приоритетных методов сохранения генетических ресурсов [1, 2]. Однако, несмотря на значительные успехи криобиологии эффективность криоконсервации ооцитов и эмбрионов коров, полученных вне организма, не столь результативна. В настоящее время продолжается поиск наиболее эффективных криопротекторов, определяются их приемлемые концентрации, режимы замораживания и оттаивания, оптимальная стадия развития эмбрионов при криоконсервировании. В практике криоконсервирования ранних зародышей крупного рогатого скота, полученных методом суперовуляции фолликулов, используют криопротекторы на основе многоатомных спиртов: глицерина, этиленгликоля, пропандиола [3]. Однако их использование при криоконсервировании эмбрионов, полученных вне организма, требует проведения дополнительных исследований.

В связи с вышесказанным, целью наших исследований явилось изучение эффективности криоконсервирования ранних эмбрионов коров, полученных вне организма, с использованием многоатомных спиртов.

**Материал и методика исследований.** Исследования проведены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» в 2012 году. Яичники получали на Минском мясокомбинате, доставляли в лабораторию в растворе Хенкса. Для выделения ооцитов овариальную ткань иссекали лезвием безопасной бритвы. Созревание ооцитов их оплодотворение и культивирование ранних зародышей проводили в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора при  $38,5\text{ }^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  по общепринятым методикам [4].

Для защиты эмбрионов от криоповреждений использовали проникающие криопротекторы на основе многоатомных спиртов: 1,4М глицерин и 1,5М этиленгликоль (EMCARE, minitube) или приготовленные в лаборатории с использованием одного из криофилактиков фирмы SIGMA (глицерин, этиленгликоль, пропандиол или ДМСО). Базовой

средой для приготовления криопротекторов служила среда ТС-199 с 20% фетальной сыворотки (SIGMA). Замораживали преимплантационные эмбрионы в пайетках с использованием программного замораживателя CryoLogic CL-8800i. Оттаивание проводили путем погружения пайетки на 10 сек в водяную баню 38 °С после предварительной выдержки на воздухе 10 сек. Сохранность замороженно-оттаянных эмбрионов определяли по нарушению межклеточных связей, целостности и деформации оболочки под микроскопом при увеличении в 56 раз.

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

**Результаты эксперимента и их обсуждение.** Сохранность деконсервированных преимплантационных эмбрионов коров, замороженных в 1,4М глицерине, представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Сохранность деконсервированных эмбрионов коров, полученных вне организма и замороженных в 1,4М глицерине

| № п/п        | Крио-протектор      | Стадия замораживания | n          | Состояние эмбрионов |                |                       |                |
|--------------|---------------------|----------------------|------------|---------------------|----------------|-----------------------|----------------|
|              |                     |                      |            | после оттаивания    |                | после культивирования |                |
|              |                     |                      |            | распад, n-%         | хорошие, n-%   | распад, n-%           | хорошие, n-%   |
| 1            | 1,4М гл. (Sigma)    | Mo I                 | 6          | 6–100,0             | –              | –                     | –              |
|              |                     | Mo II                | 5          | 3–60,0              | 1–20,0         | 1–20,0                | –              |
|              |                     | Bl I                 | 20         | 12–60,0             | 2–10,0         | 4–20,0                | 2–10,0         |
|              |                     | Bl II                | 25         | 6–24,0              | 7–28,0         | 5–26,3                | 5–26,3         |
|              |                     | <b>Всего</b>         | <b>56</b>  | <b>27–48,2</b>      | <b>10–17,9</b> | <b>10–17,9</b>        | <b>7–12,5</b>  |
| 2            | 1,4М гл. (EMCA RE)  | Mo I                 | 7          | 6–85,7              | –              | 1–14,3                | –              |
|              |                     | Mo II                | 12         | 2–16,6              | 4–33,3         | 3–25,0                | 2–16,6         |
|              |                     | Bl I                 | 8          | –                   | –              | 2–25,0                | 2–25,0         |
|              |                     | Bl II                | 14         | 2–14,3              | 4–28,6         | 3–21,4                | 3–21,4         |
|              |                     | <b>Всего</b>         | <b>41</b>  | <b>10–24,4</b>      | <b>8–19,5</b>  | <b>9–21,9</b>         | <b>7–17,1</b>  |
| 3            | 1,4М гл. (minitube) | Mo I                 | 8          | 4–50,0              | –              | 2–25,0                | –              |
|              |                     | Mo II                | 10         | 5–50,0              | 2–20,0         | 1–10,0                | 1–10,0         |
|              |                     | Bl I                 | 14         | 5–35,7              | 2–14,3         | 1–7,1                 | 2–14,3         |
|              |                     | Bl II                | 19         | 2–10,5              | 5–26,3         | 4–21,1                | 4–21,1         |
|              |                     | <b>Всего</b>         | <b>51</b>  | <b>16–31,4</b>      | <b>9–17,6</b>  | <b>8–15,7</b>         | <b>7–13,7</b>  |
| <b>Итого</b> |                     |                      | <b>148</b> | <b>53–35,8</b>      | <b>27–18,2</b> | <b>27–18,2</b>        | <b>21–14,2</b> |

Всего заморожено 148 зародышей, из них 48 морул и 100 бластоцист. По результатам проведенных исследований установлено, что морулы обладают более низкой криорезистентностью по сравнению с

бластоцистами. Так, 100 % ранних морул, замороженных в 1,4М глицерине собственного приготовления с использованием компонентов SIGMA, после проведения процедуры оттаивания и выведения криофиликтика распалось. Ранние морулы, полученные вне организма и замороженные в 1,4М глицерине фирмы «EMCARE» и «minitube», обладали лучшей криорезистентностью: 85,7 и 50,0 % клеток распалось, 14,3 и 50,0 % оценены как «условно годные», хорошего качества клеток не наблюдалось. Несколько лучшей толерантностью к низким температурам обладали поздние морулы. После оттаивания 60,0 % морул, замороженных в 1,4М глицерине (SIGMA), распалось, 20,0 % оказалось «условно-годными» и 20,0 % – хорошего качества. После культивирования «условно годных» и «хороших» 20,0 % морул распалось и 20,0 % «перешло» в категорию «условно годных». В двух остальных группах после оттаивания наблюдалась следующая картина: 16,6 и 50,0 % морул распалось, 50,0 и 30,0 % оценены как «условно годные», 33,3 и 20,0 % – как «хорошие». После культивирования замороженно-оттаянных хорошего и удовлетворительного качества 25,0 и 10,0 % распалось, 50,0 и 30,0 % клеток признаны «условно годными» и 16,6 и 10,0 % – «хорошими». Из 42 ранних бластоцист, замороженных в 1,4М глицерине, 60,0 % клеток первой группы оказались неудовлетворительного качества, 30,0 % – удовлетворительного и признаны «условно годными», 20,0 % бластоцист – хорошего качества, после их культивирования 26,3 % распалось, 10,0 % оценены как «условно годные» и 10,0 % как «хорошие». Следует отметить, что при использовании 1,4М глицерина («EMCARE») после оттаивания ранних бластоцист распада не наблюдалось, и 100 % клеток оценены «условно годными». После их культивирования 25,0 % бластоцист распалось, 50,0 % оказались «условно годными», 25,0 % – хорошего качества. Замораживание-оттаивание ранних бластоцист в 1,4М глицерине («minitube») позволило получить 50,0 % «условно годных» и 14,3 % «хороших» клеток, 35,7 % распалось. После культивирования 42,9 % сохранились как «условно годные» и 14,3 % как «хорошие». Наилучшей криорезистентностью обладали поздние бластоцисты. После их оттаивания 48,0-63,2 % зародышей оценены «условно годными» и 26,3-28,0 % – «хорошими». В процессе культивирования 21,1-26,3 % эмбрионов не сохранили жизнеспособность, 42,9-47,4 % признаны удовлетворительного качества и 21,1-26,3 % – хорошего. В среднем жизнеспособность преимплантационных эмбрионов после оттаивания выглядит следующим образом: 35,8 % – распад, 45,9 % – «условно годные», 18,2 – «хорошие», после культивирования двух последних групп получено 32,4% «условно годных» и 14,2 % «хороших».

Таким образом, криоконсервирование преимплантационных эм-

брионов коров, полученных вне организма, с использованием 1,4М глицерина и программного замораживателя обеспечивает сохранность 18,2 % зародышей после оттаивания, из них 14,2 % продолжают свое развитие.

Изучена жизнеспособность преимплантационных эмбрионов коров, полученных вне организма и замороженных в растворе 1,5М этиленгликоля (таблица 2).

Таблица 2 – Сохранность деконсервированных эмбрионов коров, полученных вне организма и замороженных в 1,5М этиленгликоле

| № п/п        | Криопротектор           | Стадия замораживания | Количество, n | Состояние эмбрионов |                |                       |               |
|--------------|-------------------------|----------------------|---------------|---------------------|----------------|-----------------------|---------------|
|              |                         |                      |               | после оттаивания    |                | после культивирования |               |
|              |                         |                      |               | распад, n-%         | хорошие, n-%   | распад, n-%           | хорошие, n-%  |
| 1            | 1,5М эт.гл. (Sigma)     | Mo I                 | 7             | 6–85,7              | –              | 1–14,3                | –             |
|              |                         | Mo II                | 6             | 2–33,3              | 1–16,7         | 3–50,0                | –             |
|              |                         | BI I                 | 18            | 12–66,7             | 3–16,6         | 4–22,2                | –             |
|              |                         | BI II                | 21            | 8–38,1              | 1–4,8          | 5–23,8                | 2–9,5         |
| <b>Всего</b> |                         |                      | <b>52</b>     | <b>28–53,8</b>      | <b>5–9,6</b>   | <b>13–25,0</b>        | <b>2–3,8</b>  |
| 2            | 1,5М эт.гл. (EMC ARE)   | Mo I                 | 8             | 6–75,0              | –              | –                     | –             |
|              |                         | Mo II                | 11            | 8–72,7              | 2–18,2         | 3–27,3                | –             |
|              |                         | BI I                 | 14            | 1–7,1               | 1–7,1          | 4–28,6                | 2–14,3        |
|              |                         | BI II                | 20            | 4–20,0              | 6–30,0         | 3–15,0                | 4–20,0        |
| <b>Всего</b> |                         |                      | <b>53</b>     | <b>19–35,8</b>      | <b>9–17,0</b>  | <b>7–13,2</b>         | <b>6–11,3</b> |
| 3            | 1,5М эт.гл. (minit ube) | Mo I                 | 10            | 10-100,0            | –              | –                     | –             |
|              |                         | Mo II                | 12            | 8–66,7              | –              | 4–33,3                | –             |
|              |                         | BI I                 | 19            | 9–47,4              | 5–26,3         | 2–10,5                | 3–15,8        |
|              |                         | BI II                | 17            | 6–35,3              | 5–29,4         | 2–11,8                | 3–17,6        |
| <b>Всего</b> |                         |                      | <b>58</b>     | <b>33–56,9</b>      | <b>10–17,2</b> | <b>8–13,8</b>         | <b>6–10,3</b> |
| <b>Итого</b> |                         |                      | <b>163</b>    | <b>80–49,1</b>      | <b>24–14,7</b> | <b>28–17,2</b>        | <b>14–8,6</b> |

Всего заморожено и оттаяно 163 эмбриона, из них 54 морулы и 109 бластоцист. По результатам проведенных экспериментов, как и в опытах с 1,4М глицерином, отмечено, что морулы обладают более низкой криорезистентностью по сравнению с бластоцистами. Так, во всех трех опытных группах ранние морулы после оттаивания погибли, распалось 75,0-100 % клеток, зарегистрированы как «условно годные» 14,5-25,0% морул, которые при культивировании остановились в развитии. Несколько лучше сложилась ситуация с поздними морулами, 33,3 % зародышей на данной стадии развития, замороженных в криопротекторе собственного приготовления, распалось после оттаивания, 50,0 % клеток оценены «условно годными» и 16,7 % «хорошими», после

культивирования этих двух категорий клеток 50,0 % морул остановилось в развитии, а 16,7 % оценены как «условно годные». В опытах с готовыми растворами фирм «EMCARE» и «minitube» 72,7 и 66,7 % морул распалось, «условно-годных» получено 9,1 и 33,3 %, «хороших» – 18,2 % только с растворами «EMCARE». Морул хорошего качества после процедуры замораживания-оттаивания с этиленгликолем «minitube» не отмечено, а все морулы, оцененные как «условно годные», в дальнейшем после культивирования распались. Следует отметить, что после использования 1,5М этиленгликоля фирмы «EMCARE» только 7,1 % ранних бластоцист и 20,0 % поздних подверглось распаду, 85,7 и 50,0 % зарегистрированы «условно годными», «хороших» клеток получено 7,1 и 30,0 %, соответственно. Из 13 ранних и 16 поздних бластоцист удовлетворительного и хорошего качества, поставленных на культивирование, распалось 28,6 и 15,0 % клеток, получено удовлетворительного качества – 50,0 и 45,0 %, «хороших» клеток – 14,3 и 20,0 %, соответственно. Всего при использовании криопротектора данной фирмы получено 30,2 % «условно годных» и 11,3 % «хороших» деконсервированных бластоцист после культивирования. Использование готового криопротектора фирмы «minitube» позволило получить после оттаивания 26,3 % ранних и 35,3 % поздних бластоцист удовлетворительного качества, 26,3 и 29,4 % – хорошего, 47,4 и 35,3 % зародышей распалось, соответственно. После культивирования сомнительных по качеству зародышей («условно годных») и «хороших» часть эмбрионов распалась – 10,5 и 11,8 %, 26,3 и 35,3 % от всех замороженно-оттаянных бластоцист оценены как «условно годные», 15,8 и 17,6 % – как хорошего качества. В целом использование криопротектора данной фирмы на основе этиленгликоля способствовало сохранению жизнеспособности 11,3 % замороженно-оттаянных бластоцист.

Таким образом, применение 1,5М этиленгликоля при криоконсервировании преимплантационных зародышей коров, полученных вне организма, с использованием программного замораживателя способствует сохранению жизнеспособности 9,5-20,0 % бластоцист.

Результаты исследований сохранности деконсервированных преимплантационных эмбрионов коров, замороженных в композиционных криопротекторах, представлены в таблице 3. С помощью композиционных криофилактиков заморожено 58 эмбриона, из них 20 морул и 38 бластоцист. Результаты экспериментов, как и в предыдущих опытах, показали, что морулы обладают более низкой толерантностью к низким температурам по сравнению с бластоцистами. Так, 100 % ранних морул, замороженных в 20% этиленгликоле совместно с 10% ДМСО, после проведения процедуры оттаивания и выведения криофи-

лактика распалось. Ранние морулы, полученные вне организма и замороженные в среде, содержащей 25 % глицерина и 25 % пропандиола, обладали аналогичной криорезистентностью: 80,0 % клеток распалось, 20,0 % оценены как «условно годные», хорошего качества клеток не наблюдалось.

Таблица 3 – Сохранность ранних эмбрионов коров, полученных вне организма и замороженных с использованием композиционных криопротекторов

| № п/п        | Криопротекторы              | Стадия замораживания | Количество, n | Состояние эмбрионов |               |                       |               |
|--------------|-----------------------------|----------------------|---------------|---------------------|---------------|-----------------------|---------------|
|              |                             |                      |               | после оттаивания    |               | после культивирования |               |
|              |                             |                      |               | распад, n-%         | хорошие, n-%  | распад, n-%           | хорошие, n-%  |
| 1            | 20% эт.гл.<br>10% ДМСО      | Mo I                 | 4             | 4-100,0             | –             | –                     | –             |
|              |                             | Mo II                | 4             | 3-75,0              | –             | 1-25,0                | –             |
|              |                             | VI I                 | 9             | 5-55,6              | 2-22,2        | 3-33,3                | 1-11,1        |
|              |                             | VI II                | 12            | 6-50,0              | 3-25,0        | 3-25,0                | 3-25,0        |
| <b>Всего</b> |                             |                      | <b>29</b>     | <b>18-62,1</b>      | <b>5-17,2</b> | <b>7-24,1</b>         | <b>4-13,8</b> |
| 2            | 25% гл.<br>+ 25% пропандиол | Mo I                 | 5             | 4-80,0              | –             | 1-20,0                | –             |
|              |                             | Mo II                | 7             | 7-100,0             | –             | –                     | –             |
|              |                             | VI I                 | 8             | 4-50,0              | 2-25,0        | 3-37,5                | 1-12,5        |
|              |                             | VI II                | 9             | 3-33,3              | 2-22,2        | 2-22,2                | 2-22,2        |
| <b>Всего</b> |                             |                      | <b>29</b>     | <b>18-62,1</b>      | <b>4-13,8</b> | <b>6-20,7</b>         | <b>3-10,3</b> |
| <b>Итого</b> |                             |                      | <b>58</b>     | <b>36-62,1</b>      | <b>9-15,5</b> | <b>13-22,4</b>        | <b>7-12,1</b> |

Несколько лучшей толерантностью к низким температурам в композиционных криопротекторах обладали поздние морулы. После оттаивания от 33,3 до 100 % морул распалось, от 25,0 до 50,0 % оказались «условно годными» и 16,7 % хорошего качества. После культивирования «условно годных» и «хороших» 25,0-33,3 % морул распалось и 33,3 % «перешло» в категорию «условно годных», «хороших» морул не получено. Из 27 ранних бластоцист, замороженных в композиционных криопротекторах, 55,6 % клеток первой группы (насыщение в 20% этиленгликоле + 10% ДМСО) оказались неудовлетворительного качества, 22,2 % – удовлетворительного и признаны «условно-годными», 22,2 % бластоцист – хорошего качества, после культивирования «условно годных» и «хороших» 33,3 % распалось, 11,1 % оценены как «хорошие». Следует отметить, что при использовании 25% глицерина и 25 % пропандиола для криоконсервирования ранних бластоцист распад после их оттаивания наблюдался у 50,0 % зародышей, 25,0 % клеток оценены «условно годными» и 25,0 % «хорошего»

качества. После культивирования эмбрионов «удовлетворительного» и «хорошего» качества по 22,2 % ранних бластоцист распалось, оказались «условно годными» и «хорошего» качества. Наилучшей криорезистентностью, как и в предыдущих опытах, обладали поздние бластоцисты. После их оттаивания 33,3-50,0 % эмбрионов распалось, 25,0% зародышей оценены «условно годными» и 22,2-25,0 % – «хорошими». В процессе культивирования 22,2-25,0 % бластоцист не сохранили жизнеспособность, 22,2 % признаны удовлетворительного качества и 22,2-25,0 % – хорошего. В среднем жизнеспособность преимплантационных эмбрионов после оттаивания выглядит следующим образом: 62,1 % распад, 22,4 % – «условно годные», 15,5 % – «хорошие», после культивирования двух последних групп получено 12,1 % «хороших» преимплантационных эмбрионов.

Таким образом, криоконсервирование преимплантационных эмбрионов коров, полученных вне организма, с использованием композиционных криопротекторов и программного замораживателя обеспечивает сохранность 15,5 % зародышей после оттаивания, из них 12,1 % были способны продолжить свое развитие.

**Заключение.** Использование многоатомных спиртов в технологии криоконсервирования ранних зародышей, полученных вне организма, обеспечивает сохранность преимплантационных эмбрионов после оттаивания на уровне 14,7-18,2 %.

#### Литература

1. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве / под ред. М. В. Зубец, В. П. Буркат. – Киев, 1999. – 722 с.
2. Голубец, Л. В. Биотехнологические аспекты репродукции животных / Л. В. Голубец. – Барановичи, 2001. – 127 с.
3. Криоконсервирование эмбрионов крупного рогатого скота : методические рекомендации / И. И. Будевич [и др.]. – Жодино, 2004. – 12 с.
4. Усовершенствованная технология получения ранних зародышей вне организма для ускоренного размножения и сохранения высокоценных животных в скотоводстве : методические рекомендации / А. И. Ганджа [и др.]. – Жодино, 2011. – 35 с.

Поступила 21.02.2013 г.