



АКУШЕРСТВО, ГИНЕКОЛОГИЯ

УДК 636.2:612.64.089

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Ю.А. Якубец¹, А.С. Дешко¹, Л.В. Голубец¹, И.С. Кысса, Н.И. Целуева²

¹ - УО «Гродненский государственный аграрный университет», ² - ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур»

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

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

РЕФЕРАТ



Возможность длительного хранения зародышей при низких температурах позволило 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. В статье представлены результаты исследований по изучению эффективности криоконсервации эмбрионов, полученных *in vitro* с использованием стандартных методов криоконсервации, используемых для замораживания эмбрионов *in vivo*.

Оттаивание эмбрионов проводилось в соответствии с поставленными задачами: определить уровень сохранности эмбрионов *in vitro* при криоконсервации в этиленгликоле и глицерине. При криоконсервации учитывались стадия развития и качество эмбрионов.

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 тоже 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, по сравнению с эмбрионами хорошего качества.

ВВЕДЕНИЕ

Первая успешная криоконсервация эмбрионов млекопитающих была проведена Whitingham et. al. в 1972 году [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 длительного хранения зародышей при низких температурах позволило 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, используемых 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, направленные 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-кумулясных 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 ТСМ 199, для культивирования ранних зародышей - ТСМ 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; 3,6М (моль) и глицерин в концентрации 10% и 1,4М. Оттаивание эмбрионов проводилось в соответствии с поставленными задачами: определить уровень сохранности эмбрионов *in vitro* при криоконсервации в этиленгликоле и глицерине. При криоконсервации учитывались стадия развития и качество эмбрионов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА 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 концентраци-

ях. Результаты, полученные в ходе исследований представлены в таблицах 1 и 2.

Из анализа приведенных в таблице 1 данных видно, что более высокие результаты по сохранности получены при использовании этиленгликоля в концентрации 1,5 и 1,8М. 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 3,6М, но в целом сохранность оказалась на достаточно низком уровне по сравнению с заморозкой эмбрионов, полученных в результате гормональной стимуляции суперовуляции, и сохранность которых, как правило, составляет в пределах 100%.

Что касается эффективности криоконсервации эмбрионов в зависимости от стадии их развития и качества (табл. 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, 13,0% поздних бластоцист и 25,0% экспандированных. Поздние бластоцисты лучше всего сохранялись в 1,8М этиленгликоле (62,5%), а экспандированные в 1,5М (66,7%).

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.

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-ступеньчатом насыщении и выведении и 4-ступеньчатом насыщении и 3-ступеньчатом 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 сохранивших жизнеспособность, свое качество после оттаивания сохранили 15,8% поздних бластоцист, 12,0% экспандированных, 5,9% эмбрионов отличного качества и 40,0% эмбрионов хорошего

Таблица 1
Эффективность криоконсервации эмбрионов *in vitro* в этиленгликоле

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

Таблица 2

Эффективность криоконсервации эмбрионов в этиленгликоле в зависимости от стадии развития и качества

Крио-протектор	Стадия развития	Качество	Заморожено эмбрионов	Оттаяно эмбрионов	Сохранили жизнеспособность, п-%	из них сохранило качество, п-%
1,5М 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
1,8М 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
3,6М 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
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 том числе	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	

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-ступеньчатое	1-ступеньчатое	24	24	13	54,2
1,4М-а	1-ступеньчатое	3-ступеньчатое	22	22	11	50,0
1,4М-в	4-ступеньчатое	3-ступеньчатое	25	25	17	68,0

качества. Остальные эмбрионы свое качество после оттаивания снижали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, как показал анализ полученных результатов, более высокая сохранность эмбрионов эффективность установлена при использовании в качестве криопротектора раствора этиленгликоля в концентрации 1,5 и 1,8М. Уровень сохранности эмбрионов после оттаивания при этом, составил 59,6-62,1%. Установлена наибольшая 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 (1,4М глицерин).

Yu.A. Yakubets¹, A.S. Deshko¹, L.V. Golubets¹, I.S. Kyssa¹. Efficiency of cryopreservation of embryos obtained in vitro culture. 1 - EI «Grodno State Agrarian University», N.I. Tselueva², 2 - Federal scientific center for bast crops Tver

ABSTRACT

The possibility of long-term storage of embryos at low temperatures made it possible to significantly reduce the cost, simplify

and increase the efficiency of using the world's best genetic resources by importing and exporting not animals, but embryos, served as a prerequisite for the creation and preservation of the gene pool of rare and endangered breeds, and introduced a planning element to the work on transplantation.

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.

Thawing of embryos was carried out in accordance with the tasks set: to determine the level of preservation of embryos in vitro during cryopreservation in ethylene glycol and glycerin. During cryopreservation, the stage of development and the quality of embryos were taken into account. 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

Таблица 4

Эффективность криоконсервации эмбрионов в глицерине в зависимости от стадии развития и качества

Крио-протектор	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 1,4М-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 1,4М-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 том числе	отличных	58	58	34-58,6	2-5,9
хороших		30	30	10-33,3	4-40,0	

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.

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. Martino, M. The genetics of chilling sensitivity of bovine oocytes cooled to non physiological temperatures / M. Martino, J. Roland, A. Nakagawa, S. Leibo // Theriogenology. – 1995. - Vol. 43. - P. 272-289.
4. Pollard, J.W. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo produced bovine embryos / J.W. Pollard, S.P. Leibo // Theriogenology. – 1993. - Vol. 30. - P. 287-317.
5. Sudano, M.J. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification / M.J. Sudano, D.M. Paschoal, S. Rascado Tda, L.C. Magalhães, L.F. Crocomo // 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.

ИНФОРМАЦИЯ

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятий при заразных и незаразных болезнях животных и птиц.

Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.

**Тел/факс (812) 365-69-35,
Моб. тел.: 8(911) 176-81-53, 8(911) 913-85-49,
e-mail: 3656935@gmail.com**