

УДК 57.08:636:31

## АНАЛІЗ ВІДТВОРЮВАНOSTI РЕЗУЛЬТАТІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕМБРІОНІВ ТВАРИН

Л. В. Горбунов<sup>1</sup>  
М. Д. Безуглий<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут тваринництва НААН, Харків  
<sup>2</sup>Національна академія аграрних наук України, Київ

E-mail: [4glv@i.ua](mailto:4glv@i.ua)

Отримано 20.09.2011

Фундаментом розведення й селекції тварин є технології кріоконсервування генетичного матеріалу, запліднення сперміями та трансплантації ембріонів.

Проведено порівняльний аналіз, подано теоретичне узагальнення та нове рішення підвищення відтворюваності результатів експерименту на основі запропонованої математичної моделі оцінки нативного стану ембріонів корів та ефективності етапів їх кріоконсервування. Застосування моделі у багаті разів підвищує відтворюваність результатів і забезпечує можливість їх порівняння у разі використання різних способів заморожування ембріонів. Експериментальна перевірка запропонованої моделі показала, що використання узагальнених показників життєздатності та ефективності знижує розкид результатів до величини помилки їх визначення. Розрахункові значення узагальнених величин становили: для життєздатності ембріонів корови, яка залежить від фізіологічного стану їхніх донорів, —  $97,1 \pm 1,0\%$ , ефективності кріоконсервування —  $96,0 \pm 4,2\%$  і трансплантації —  $54,3 \pm 4,8\%$ .

Кількісний облік стану нативного біооб'єкта для визначення ефективності етапів різних способів заморожування значно підвищує відтворюваність результатів його кріоконсервування, що дає змогу істотно знизити обсяг біологічного матеріалу та витрати на проведення дослідів за умови отримання достовірного значення.

**Ключові слова:** відтворюваність, ефективність кріоконсервування, ембріони корів, збереженість, життєздатність.

Відтворюваність результатів кріобіологічного експерименту залежить від нативного стану біооб'єкта та ефективності його кріоконсервування. Загальноприйнятий спосіб усереднення значень збереження деконсервованих ембріонів тварин дає високий коефіцієнт варіації (до 100%), що пов'язано з великою кількістю повторів дослідів, значними витратами часу і матеріалів для одержання достовірного значення [1–6]. Відсутність обліку нативного стану біооб'єкта й особливостей застосовуваних способів кріоконсервування призводить до непорівнянності отриманих результатів, що є істотною перешкодою до проведення багатофакторного дослідження.

За оцінкою стану ембріонів корови ймовірність їх збереження упродовж культивування становить 49–97%, після заморожування–відтавання — 40–97% та розвитку в умовах *in vivo* — 10–80% [2–6]. Причинами високої варіабельності результатів є різна якість ембріонів, фізіологічний стан їхніх донорів, способи кріоконсервування і трансплантації зародків.

Нативний стан ембріонів миші та корови істотно впливає на показники їх збереження

і ефективності кріоконсервування [1, 5]. Апробація запропонованої математичної моделі [1] за результатами експерименту з вивчення розвитку деконсервованих ембріонів в умовах *in vitro*, які наведено в [5], дала високу збіжність обчислених та експериментально отриманих показників збереження деконсервованих ембріонів корови під час заморожування з низькими і високими швидкостями. Збереження нативних ембріонів корови змінюється від 70 до 100% і залежить від їхньої якості та фізіологічного стану донора (здорові — проблемні тварини). Ефективність різних способів кріоконсервування ембріонів корови варіює від 53 до 95% і залежить від стану біооб'єкта та особливостей застосовуваних технологій.

Вартість ембріона корови становить понад 1 500 гривень за одиницю, а необхідна кількість для одержання достовірного результату перевищує 30 одиниць. Тому для скорочення витрат потрібно підвищити відтворюваність результатів і забезпечити умови їх порівнянності. Для цього слід створити математичну модель, що описує показник приживлення деконсервованого ембріо-

на (розвиток в умовах *in vivo*) залежно від його нативного стану та ефективності засобів кріоконсервування. Отже, підвищення відтворюваності результатів кріоконсервування ембріонів корови є актуальним завданням, вирішення якого дає змогу проводити багатофакторне дослідження за малої кількості повторів досліду, що необхідно для наукового обґрунтування нових підходів до створення ефективних способів кріоконсервування.

Метою дослідження є підвищення відтворюваності та забезпечення порівнянності результатів кріоконсервування ембріонів корови на основі створення математичної моделі оцінки розвитку деконсервованого об'єкта в умовах *in vivo*.

### Матеріали і методи

Ембріони великої рогатої худоби одержували від корів чорно-рябої породи, у яких викликали суперовуляцію введенням 2 500–3 000 інтернаціональних одиниць гонадотропіну сироватки жеребних кобил (ГСЖК) на 10–11-й день статевого циклу, і через 48–56 год додавали дозу простагландину F<sub>2α</sub>. Осіменіння корів-донорів проводили трикратно подвійною дозою заморожено-відігрітої сперми. Одержували ембріони на 6–8-й день статевого циклу нехірургічним способом. Як промивне середовище використовували модифікований буфер Дюльбеко PBS у кількості 400–500 мл на один рік матки.

Усі маніпуляції з біооб'єктом — пошук, вимивання й підготовка до експериментів — виконували за загальноприйнятими методиками [6]. В експериментах використовували ембріони відмінної, доброї та задовільної якості. Якість ембріонів оцінювали морфологічно і за результатами їхнього розвитку в умовах *in vitro* та *in vivo* [4, 6]. Критеріями оцінки якості й стану ембріонів слугували наявність або відсутність видимих морфологічних дефектів відповідно до прийнятої класифікації та наявність потомства [4, 6]. Кріоконсервування ембріонів корови проводили на стадії їх розвитку від пізньої морули до експандованої бластоцисти.

Середовища для кріоконсервування ембріонів корови готували на основі розчину Дюльбеко з додаванням 10% -ї фетальної сироватки теляти. У разі використання повільних швидкостей заморожування як кріопротектор застосовували 1,2 моль/л розчин гліцеролу. Ембріони витримували в середовищі для кріоконсервування протя-

гом 10 хв за температури 20±2 °С. Для виведення кріопротектора після розморожування контейнерів використовували розчин цукрози з концентрацією 0,75 моль/л.

Заморожування ембріонів здійснювали в розробленому нами пристрої пасивним охолодженням термоблока в горловині посудин Дьюара X-34 (V = 35 л) [7, 8]. Як контейнер для заморожування біоматеріалу застосовували пластикові соломинки діаметром 2 мм (200 мкл). Ініціація кристалотворення в соломинках відбувалася за рахунок пророщування льоду на змочених стінках капіляра. Відтавання контейнерів з ембріонами проводили у водяному термостаті при 40 °С.

Для підвищення відтворюваності результатів кріоконсервування дослідження виконували з біооб'єктом однакової якості у кожній групі:

$$S_i = n/n_{io}, \quad (1)$$

де  $S_i$  — збереження придатного біооб'єкта  $i$ -ї якості (для ембріонів задовільне  $i = 1$ , добре  $i = 2$ , відмінне  $i = 3$ );

$n$  та  $n_{io}$  — кількість придатного біооб'єкта після кріоконсервування та початкова.

Для підвищення точності оцінки життєздатності ембріонів після кріоконсервування використовували формулу розрахунку середньозваженої величини їх нативного стану [1]:

$$V_i = \frac{1}{n_{io}} \sum_{j=1}^k V_{ij} \cdot n_j \quad (2)$$

де  $n_j$  — кількість ембріонів  $i$ -ї якості після кріоконсервування.

Життєздатність нативних ембріонів корів для заданої якості визначали аналітично [1]:

$$V_{io} = \frac{V_{ik} \cdot V_{id}}{V_{idk}}, \quad (3)$$

де:  $V_{ik}$ ,  $V_{id}$  та  $V_{idk}$  — життєздатність ембріонів  $i$ -ї якості після культивування в умовах *in vitro*, заморожування-відтавання, заморожування-відтавання та наступного культивування.

Для кількісного обліку нативного стану ембріонів та ефективності технологічних операцій застосовували формулу Баеса [1]:

$$V_i = V_{io} \cdot W_i, \quad (4)$$

де:  $V_i$  та  $V_{io}$  — життєздатність ембріона  $i$ -ї якості після виконання заданої процедури та нативна;  $W$  — ефективність технологічної операції, обчислена за зміною життє-

здатності біооб'єкта в ході виконання заданої процедури  $W_i = V_i/V_{io}$ .

Статистичний аналіз отриманих результатів виконували за допомогою параметричних методів [9] на основі застосування програм Microsoft Excel.

Основні критерії, що характеризують стан біооб'єкта та обраний етап кріоконсервування: збереження — придатність біологічного об'єкта до подальшого застосування, яка визначається за морфологічними показниками (1); приживлення — імовірність розвитку біологічного об'єкта в умовах *in vivo* (1); життєздатність — імовірність розвитку біологічного об'єкта в умовах *in vitro* (2); ефективність етапу кріоконсервування — величина, що характеризує, наскільки змінюється стан біооб'єкта в результаті виконання заданої операції (6); відтворюваність — розкид результатів, отриманих у разі використання заданого способу кріоконсервування; порівнянність — можливість зіставлення результатів, одержаних за вживання різних способів кріоконсервування (5, 6).

Показники збереженості, життєздатності та ефективності виражали в у.о., застосовуючи математичне моделювання, та у відсотках — для зручності зіставлення з даними літератури.

### Результати та обговорення

Імовірність отримання потомства залежить від життєздатності нативного ембріона, що зумовлено його якістю та фізіологічним станом донора  $V_{io}$ , ефективності методів кріоконсервування  $W_{id}$  і трансплантації  $W_{ip}$ . Величини  $V_{i1}$ ,  $W_{id}$  та  $W_{ip}$  заданої якості встановлювали за алгоритмом знаходження життєздатності нативного біооб'єкта  $V_{io}$  [1] — через розв'язування системи з трьох рівнянь (4), що виявляють їхній стан на різних етапах кріоконсервування: після трансплантації нативних ембріонів  $V_{ip} = V_{io}W_{ip}$ ; заморожування-відтавання  $V_{id} = V_{io}W_{id}$ ; заморожування-відтавання і трансплантації  $V_{idp} = V_{io}W_{id}W_{ip}$ .

З метою забезпечення умови порівнянності отриманих значень, запропоновано використовувати регресійні залежності (відображені поліномом другого ступеня) життєздатності нативного біооб'єкта  $V_{io} = V_o(i)$  та ефективності кріоконсервування  $W_i = W(i)$ . Для зручності роботи з отриманими функціями запропоновано виражати їх через узагальнені величини, які мають максимальну відтворюваність, що відповідає

найкращій якості досліджуваного біооб'єкта (при  $i = k$   $V_o = V_o(k)$ ,  $W = W(k)$ ). Використання узагальнених показників дає змогу виконувати кількісний облік різної якості біооб'єкта з точністю його встановлення. Для ембріонів тварин це ймовірно з точністю оцінки їх за морфологічними показниками до 0,5 бала. Необхідність цього перетворення пов'язана з тим, що середні величини не дають інформації про якість окремого біооб'єкта, тимчасом як узагальнені, в сукупності з емпірично отриманими функціями, відображають індивідуальні властивості заданої якості об'єкта. Це дозволяє виразити життєздатність різної якості біооб'єкта  $V_j$  на  $j$ -му етапі кріоконсервування через узагальнені величини:

$$V_j = V_o \prod_{j=1}^h W_j, \quad (5)$$

де:  $V_j$ ,  $V_o$  та  $W_j$  — узагальнені величини життєздатності біооб'єкта, які залежать від фізіологічного стану його донора та ефективності технологічних етапів.

Узагальнену ефективність заданого етапу кріоконсервування визначали як відношення узагальненої величини життєздатності біооб'єкта після виконання  $j$ -ї операції до її значення на попередньому  $j-1$  етапі:

$$W_j = V_j(k) / V_{j-1}(k). \quad (6)$$

Для перевірки запропонованої математичної моделі (5, 6) проаналізовано дані приживлення нативних і деконсервованих ембріонів корови задовільної, доброї та відмінної якості, одержаних нами в дослідних господарствах «Українка» (Харківська обл.) і «Охтирки» (Сумська обл.) [2, 3]. Експериментально отримані значення (рисунок) збереження деконсервованих ембріонів відрізняються на 58% і становлять: для відмінної якості —  $92,6 \pm 1,5\%$  ( $n = 324$ ) і задовільної —  $34,7 \pm 3,2\%$  ( $n = 331$ ). Показники приживлення для нативних і деконсервованих ембріонів: для відмінної якості —  $53,2 \pm 3,2$  і  $51,2 \pm 3,4\%$ , доброї —  $40,2 \pm 3,1$  і  $37,8 \pm 3,7\%$ , задовільної —  $21,6 \pm 5,9$  і  $19,1 \pm 6,2\%$ , відповідно. Розкид значень життєздатності ембріонів задовільної — відмінної якості становить на етапі одержання 26%, кріоконсервування — 49%, а приживлення нативних і деконсервованих — 32%.

Регресійні залежності показників життєздатності ембріонів корів від їхньої якості (дані з рисунка, імовірність виражено в у.о.) зіставили для нативних

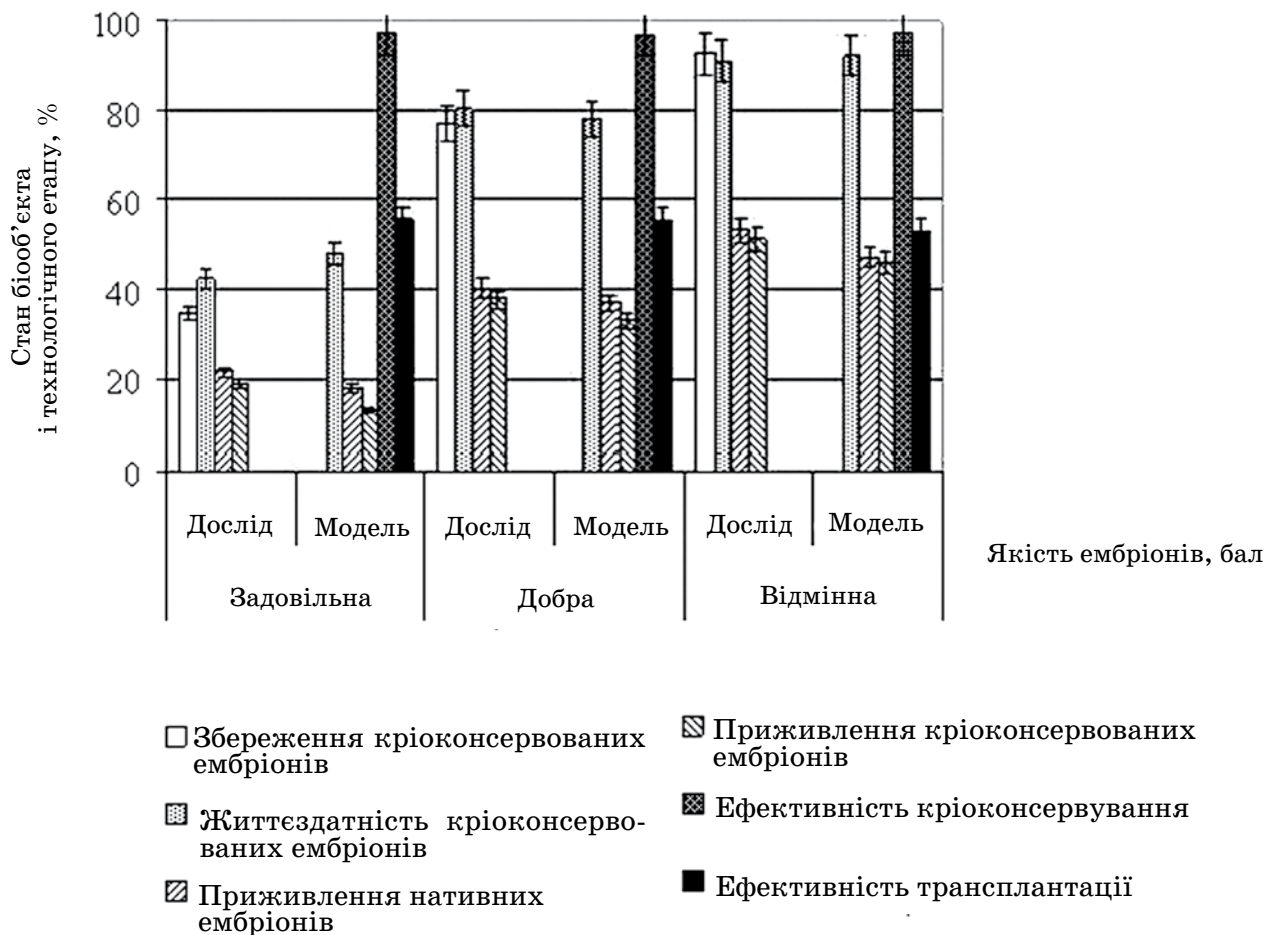
$V_{io} = -0,05i^2 + 0,33i + 0,41$  та деконсервованих  $V_{id} = -0,136i^2 + 0,785i - 0,225$  ембріонів; приживлення  $V_{ip} = -0,027i^2 + 0,268i - 0,05$ ; ефективність криоконсервування  $W_{id} = -0,022i^2 + 0,127i - 0,775$  та трансплантації  $W_{ip} = -0,025i^2 + 0,226i + 0,109$ . Коефіцієнт апроксимації  $R^2 = 0,999$ . Узагальнені показники отримали для ембріонів відмінної якості за  $i = 3$ .

Узагальнені показники (5, 6): для життєздатності ембріонів, яка залежить від фізіологічного стану їхніх донорів, —  $97,1 \pm 1,0\%$ , ефективності криоконсервування —  $96,0 \pm 4,2\%$  і трансплантації —  $54,3 \pm 4,8\%$  (рисунок). Значуща розбіжність величин ефективності криоконсервованих і трансплантованих ембріонів свідчить про відносно низький рівень ефективності технології трансплантації.

Перехід до показників ефективності значно підвищує відтворюваність результа-

тів оцінки процедури криоконсервування ембріонів та їх трансплантації. Застосування узагальнених показників життєздатності й ефективності знижує розкид до величини похибки їх визначення. Збільшення точності оцінки ембріонів за морфологічними показниками до 0,5 бала і диференціація етапів криоконсервування підвищують відтворюваність результатів експерименту.

Аналіз даних літератури [5] дає змогу обчислити узагальнені величини життєздатності нативних ембріонів корови: для середньої продуктивності донора —  $99,5\%$ , високої —  $70,2\%$ , проблемних тварин —  $55,4\%$ . Ефективність культивування ембріонів *in vitro* становила  $99,0\%$ , криоконсервування з використанням програмного заморожувача в 1,4 М розчині гліцеролу —  $94,8\%$ ; 1 М гліцеролу —  $90,7\%$ ; 1,5 М етиленгліколю —  $90,0\%$  та з використанням методу вітрифікації —  $76,3\%$ .



Показники збереженості (1), життєздатності (2) та приживлення (1) ембріонів корови (задовільної, доброї та відмінної якості), узагальненої ефективності криоконсервування і трансплантації: дані отримано дослідним і розрахунковим способом (5, 6)

Проведення багатofакторного дослідження пов'язано з необхідністю використання великого обсягу біооб'єкта, зменшення якого можливе за рахунок підвищення відтворюваності результатів експерименту. На оцінку деконсервованих ембріонів корови впливає їхній початковий стан і ефективність етапів кріоконсервування. Тому облік стану нативного біооб'єкта та ефективності використаного способу кріоконсервування уможливило підвищення відтворюваності і забезпечення порівнянності результатів експерименту. Запропонована математична модель дає змогу істотно підвищити відтворюваність результатів кріоконсервування біооб'єкта й забезпечити умови їх порівнянності.

Таким чином, розроблено математичну модель, яка описує залежність приживлення деконсервованих ембріонів корів від їхнього нативного стану та ефективності етапів кріоконсервування. Використання моделі значно підвищує відтворюваність результатів дослідження та забезпечує умови їх порівнянності з використанням різних способів заморожування.

Узагальнені показники становили: для життєздатності ембріонів, яка залежить від фізіологічного стану їхніх донорів, —  $97,1 \pm 1,0\%$ , ефективності кріоконсервування —  $94,3 \pm 4,8\%$  і трансплантації —  $58,2 \pm 5,7\%$ .

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Горбунов Л. В., Гордиенко Е. А. Обеспечение условий сопоставимости результатов кріоконсервирования эмбрионов млекопитающих // Пробл. кріобиол. — 2011. — № 1. — С. 162 — 172.
2. Кот В. С., Горбунов Л. В., Лисина К. Г. Оценка технологии трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота // Зб. наук. праць Луганського держ. агр. ун-ту. — 2001. — № 13. — С. 150–155.
3. Кот В. С., Безуглий М. Д., Горбунов Л. В., Лисина К. Г. Збереження генофонду зникаючих порід сільськогосподарських тварин України з використанням біотехнологічних методів // Там само. — 2001. — № 13. — С. 155–160.
4. Кауффольд П., Тамм И., Шихов И. Я. и др. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота: Руководство для работы по пересадке эмбрионов. — М.: Агропромиздат, 1990. — 56 с.
5. Титова В. А., Насибов Ф. Н., Хилькевич С. Н. и др. Эффективность технологических элементов кріоконсервирования эмбрионов, полученных от коров-доноров с различным физиологическим статусом // Докл. Рос. акад. с.-х. наук. — 2006. — № 2. — С. 33–35.
6. Шихов И. Я., Сергеев Н. И. Морфологическая оценка качества ранних эмбрионов крупного рогатого скота // Арх. анат. гистол. эмбриол. — 1981. — Т. 81, № 11. — С. 96–102.
7. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы. — М.: Мир, 1990. — 406 с.
8. Осташко Ф. И., Безуглый Н. Д., Валигура Е. Г., Горбунов Л. В. Устройство для замораживания эмбрионов / Авторское свидетельство 1802700, приоритет от 29.03.1991.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. — М.: Практика, 1998. — 459 с.

**АНАЛИЗ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ  
РЕЗУЛЬТАТОВ  
КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ  
ЖИВОТНЫХ**

*Л. В. Горбунов<sup>1</sup>  
Н. Д. Безуглый<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт животноводства НААН, Харьков

<sup>2</sup>Національна академія аграрних наук  
України, Київ

*E-mail: 4glv@i.ua*

Фундаментом разведения и селекции животных являются технологии криоконсервирования генетического материала, оплодотворения спермиями и трансплантации эмбрионов.

Проведен сравнительный анализ, представлены теоретическое обобщение и новое решение повышения воспроизводимости результатов эксперимента на основе предложенной математической модели оценки нативного состояния эмбрионов коров и эффективности этапов их криоконсервирования. Применение модели многократно повышает воспроизводимость результатов и обеспечивает возможность их сравнения при использовании разных способов замораживания эмбрионов. Экспериментальная проверка предложенной модели показала, что использование обобщенных показателей жизнеспособности и эффективности снижает разброс результатов до величины ошибки их определения. Расчетные значения обобщенных величин составили: для жизнеспособности эмбрионов коров, которая зависит от физиологического состояния их доноров, —  $97,1 \pm 1,0\%$ ; эффективности криоконсервирования —  $96,0 \pm 4,2\%$  и трансплантации —  $54,3 \pm 4,8\%$ .

Количественный учет состояния нативного биообъекта при определении эффективности этапов разных способов замораживания многократно повышает воспроизводимость результатов его криоконсервирования, что позволяет значительно снизить объем биологического материала и затраты на проведение опытов при условии получения достоверного значения.

**Ключевые слова:** воспроизводимость, эффективность криоконсервирования, эмбрионы коров, сохранность, жизнеспособность.

**ANALYSIS OF THE REPRODUCIBILITY  
RESULTS OF ANIMALS EMBRYOS  
CRYOPRESERVATION**

*L. V. Gorbunov<sup>1</sup>  
M. D. Bezugly<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Animal Husbandry of National  
Academy of Agrarian Sciences, Kharkiv

<sup>2</sup>National Academy of Agrarian Sciences  
of Ukraine, Kyiv

*E-mail: 4glv@i.ua*

Technologies of the artificial fertilization and transplantation of cryopreserved sperm and embryos are the foundation of the breeding and selection of animals.

The comparative analysis is carried out, theoretical generalization and the new solution of increase of reproducibility of results of experiment on the basis of the offered mathematical model of the estimation of a native condition of embryos of cows and efficiency of stages of their cryopreservation are given. Application of model repeatedly increases reproducibility of results and provides the condition to their comparability when using different ways of freezing of embryos of cows. Experimental test of the offered model showed that use of the generalized factors of viability and efficiency reduces the dispersion of results to size of an error of their detection. The design values of the generalized values were as follows: viability of embryos of cows, which depended on physiological condition of their donors —  $97.1 \pm 1.0\%$  and recipients —  $95.1 \pm 3.9\%$ ; efficiency of cryopreservation —  $96.0 \pm 4.2\%$  and transplantation —  $54.3 \pm 4.8\%$ .

The quantitative accounting of a condition of native bioobject, during determination of efficiency of stages of the different ways of the freeze, raised manifold the reproducibility of results of its cryopreservation, that allowed to reduce considerably the volume of the biological material and costs for carrying out the tests under condition of obtaining of reliable value.

**Key words:** reproducibility, efficiency of cryopreservation, embryos of a cow, safety of bioobject, viability.