

М.С. БОЙКО, студентка, НТУ "ХПИ"

Н.Ф. КЛЕЩЕВ, докт. техн. наук, проф., НТУ "ХПИ"

Л.В. ГОРБУНОВ, докт. с.-х. наук, доцент, НТУ "ХПИ"

ОПТИМИЗАЦИЯ КРИОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР, СВЯЗАННЫХ С ДЛИТЕЛЬНЫМ ХРАНЕНИЕМ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Проведен сравнительный анализ качественных и количественных методов оценки эффективности замораживания биообъектов. Установлена наиболее перспективная технология замораживания эмбрионов млекопитающих на основе медленных скоростей охлаждения. Исследовано влияние разнокачественности эмбрионов и критерия оценки пригодности на уровень их жизнеспособности. Применение относительной величины выживаемости сводит к минимуму влияние индивидуальных свойств биообъекта на технологию.

Проведено порівняльний аналіз якісних та кількісних методів оцінки ефективності заморожування біооб'єктів. Встановлена найбільш перспективна технологія заморожування ембріонів ссавців на основі повільних швидкостей охолодження. Досліджені вплив різноякісності ембріонів та критерію оцінки придатності на рівень їх життєздатності. Використання відносної величини виживанності зводить до мінімуму вплив індивідуальних властивостей біооб'єкта на результат оцінки ефективності технології.

The comparative analysis of qualitative and quantitative methods of an estimation of viability of bioobjects is carried out. It's established, that the most perspective technologies of freezing embryo mammal are on the basis of slow speeds of cooling. Influence different quality of embryo and criterion of an estimation of suitability on a level of their viability is investigated. Application of relative size of survival promotes decrease effect of individual properties of bioobject the technique.

Существующее многообразие методов криоконсервирования био-объекта, основанных на применении медленных, высоких и сверхвысоких скоростей охлаждения, дает возможность выбора доступной технологии [1-6]. Однако при выборе направления встает проблема оценки эффективности технологии существующих методов замораживания [7-11]. Наиболее распространенный способ оценки технологии криоконсервирования основывается на определении уровня сохранности деконсервированного биообъекта [1-6,11-13]. Однако показатель сохранности биообъекта зависит от многих факторов, таких как: биологическая разнокачественность эмбрионов, обусловленная получением биообъекта от разных видов и пород животных с разными условиями кормления и содержания; критерия оценки уровня пригодности биообъекта для дальнейшего использования; стадии развития зародыша [7-13].

Влияние пригодности биообъектов на уровень их жизнеспособности можно устранить посредством перехода от качественного метода оценки жизнеспособности биологического материала к количественному. Это возможно благодаря переходу от двухбалльной шкалы оценки качества (пригодные и непригодные биообъекты) к пятибалльной шкале оценки жизнеспособности биообъекта и последующим численным выражением этих показателей. Переход

от абсолютного показателя жизнеспособности к относительному – эффективности, дает возможность устранить влияние разнокачественности на оценку технологии замораживания биологического материала [7-11].

Целью работы являлось определение эффективности технологий криоконсервирования эмбрионов млекопитающих основанных на применении медленных скоростей замораживания.

Материалы и методы

Объектами исследования служили эмбрионы мыши и крупного рога-того скота (КРС), находившиеся на стадии развития от ранней морулы до поздней бластоцисты. Оценка жизнеспособности производилась по морфологическим показателям [13]. Оценка целостности биообъекта осуществлялась при помощи метода видеофиксации эмбрионов с последующей оцифровкой видеоизображения и записью на компьютер, тем самым повышалась точность визуальной оценки уровня сохранности конкретного эмбриона [14].

При получении эмбрионов использовались общепринятые методики [13]. Для вымывания эмбрионов коровы применяли стандартную среду Дюльбекко с добавлением антимикробных препаратов (ампициллина 100 ед/см³ и гентамицина 12 мкг/см³) и фетальной сыворотки телят (1% ÷ 2%) непосредственно перед вымыванием.

Для криоконсервирования использовали свежеполученные эмбрионы с оценкой «отлично», «хорошо», «удовлетворительно» для мышей, а для коров – с оценкой «отлично» и «хорошо». В качестве криопротектора для эмбрионов мыши использовали 1М раствор глицерина, приготовленный на среде Дюльбекко. Эмбрионы коровы перед замораживанием насыщали глицерином или этиленгликолем, приготовленных на среде Дюльбекко с добавлением 20% фетальной сыворотки [14]. Насыщение криопротектором проводилось одноступенчатым способом при комнатной температуре. Замороженные эмбрионы хранили непосредственно в жидком азоте в сосудах Дьюара. После оттаивания эмбрионы отмывали от криопротектора путем внесения их в 0,75М раствор сахарозы.

Сохранность эмбрионов рассчитывали по формуле:

$$S_j = \left(\frac{n_k}{n} \right) \cdot 100\% \quad (1),$$

где n – количество нативных эмбрионов определенного i -го качества, n_k – количество культивируемых эмбрионов (доросших до следующей стадии развития) заданного качества.

Жизнеспособность и выживаемость эмбрионов рассчитывали по формуле (2, 3):

$$V_j = \frac{1}{n_c} \left(\sum_{i=2}^k H_i \cdot n_{ij} \right) \cdot 100\% \quad (2),$$

где V_j – общая жизнеспособность биообъекта на j -ом этапе операции криоконсервации; n_c – количество свежеполученных эмбрионов; n_{ij} – количество биообъекта i -го качества на j -ом этапе операции криоконсервации; k – число

различных качественных состояний биообъекта; N_i – вероятность развития нативного биообъекта i -го качества в условиях *in vivo* или *in vitro*.

$$W = (V_d / V_n) \cdot 100\%, \quad (3),$$

где V_n – жизнеспособность эмбрионов до замораживания; V_d – жизнеспособность эмбрионов на определенном технологическом этапе [4, 5].

Результаты

Общеизвестно, что показатель сохранности эмбриона для мышей после культивирования в условиях *in vitro* снижается к 95% для отличного качества эмбрионов, 85% - хорошего, 70% - удовлетворительного, а для КРС 85%, 70%, 30% - соответственно [11, 12]. Для оценки уровня сохранности деконсервированных эмбрионов разного качества нами использовались данные, полученные в лаборатории "криоконсервации половых клеток и эмбрионов животных" на протяжении 15 лет. Для повышения точности оценки состояния эмбрионов, на первом этапе работы, был осуществлен переход от двухбалльной к пятибалльной шкале оценки качества эмбрионов формулы (1, 2, 3) [7, 9].

Сравнивая величины минимальных количеств измерений, обеспечивающих достоверный результат [15], установили, что для качественного метода, эта величина составляет несколько сотен, а для количественного – единицы или десятки эмбрионов. С учетом стоимости эмбриона КРС (1500 ÷ 2000 грн.) количественные методы оценки более пригодны.

При учете клеток удовлетворительного качества величины погрешности превышают допустимый 5% уровень (10,6% ÷ 23,4%), а при рассмотрении только отличного и хорошего – находятся в пределах нормы (3,5% ÷ 4,6%). Исходя из этих данных аналогичным образом была определена жизнеспособность эмбрионов мышей после низкотемпературного консервирования при использовании различных технологий (таблица 1). В таблице 1 представлены соответствующие расчеты для технологий, основанных на применении медленных скоростей охлаждения.

Для технологий замораживания, основанных на применении медленных скоростей охлаждения ($V=0,3$ °C/мин, $V=const$) величина эффективности имеет минимальное значение 81% (№10) и максимальное значение 99% (№1). Самый высокий показатель эффективности у эмбрионов, замороженных в соломинках при помощи термоблока из нержавеющей стали на основе пассивного остывания в горловине сосуда Дьюара.

Сравнивая величины жизнеспособности эмбрионов, полученных посредством качественного и количественного методов их оценки, можно сделать заключение о том, что последний является более чувствительным к оценке эффективности технологии криоконсервирования эмбрионов. В первом случае при грубой оценке исходного качества эмбрионов, уровни жизнеспособности деконсервированных эмбрионов для разных групп отличаются между собой (Δ достигает величины, равной 29%), а при более точной оценке - такого сильного различия не наблюдается ($\Delta = 5$).

Поскольку жизнеспособность эмбрионов, как до замораживания, так и после него в данных выборках может значительно меняться ($\Delta > 5\%$), то

критерием сравнения данных выборок может служить показатель выживаемости эмбрионов отражающей эффективность технологии.

Таблица 1- Сравнительный анализ технологий замораживания

№	n _i - количество эмбрионов определенного качества каждой из групп		Метод оценки жизнеспособности биообъекта, M±m						Метод замораживания эмбрионов, основанный на применении медленных скоростей охлаждения
			Качественный		Количественный				
	Свежеполученные	Деконсервированные	Сохранность	N ₀	Жизнеспособность V _j	N ₀	Выживаемость W _j	N ₀	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	32	30;2	93,8±2,3	3	94,4±4,0	3	99,0±1,4	3	Пассивное охлаждение в горловине сосуда Дьюара (соломинки) [1]
	32;30	30;25;7	90,3±3,5	204	88,2±4,1	13	99,0±1,9	9	
	32;30;23	30;25;23	65,9±2,1	669	77,5±4,3	30	91,5±2,5	13	
2	34; 34	30;32;6	87,8±4,0	155	88,1±0,7	11	97,9±0,9	9	ЗЭМ-3 (пробирки)[17]
3	317;317	310;315;9	84,9±1,4	23	89,7±0,3	6	97,1±0,6	8	Пенопластовый термоблок(пробирки) [17]
4	85;85	80;81;9	89,6±2,3	89	88,9±0,5	9	98,8±0,9	9	Нержавеющий термо-блок (соломинки) [17].
5	88;88	83;85;8	92,0±2,1	76	89,0±0,5	8	98,9±0,8	8	Нержавеющий термо-блок (пробирки)[17].
6	5;5	3;4;3	90,0±4,3	68	88,5±1,8	24	97,8±2,5	11	Универсальный термоблок (пробирки)[17]
7	324	236;64;22	92,6±1,5	117	90,7±1,1	9	95,5±3,8	5	Пассивное охлаждение в горловине сосуда Дьюара (пробирки Уленгута) [9].
8	-;311	-;239;64	76,9±2,4	428	79,7±4,2	9	93,8±3,7	12	
9	317;318	236;303;84	84,9±1,4	249	85,3±3,3	14	94,6±3,4	9	
10	293;293;293	236;303;16	61,3±2,1	502	68,3±2,9	23	81,9±3,2	11	
11	512;512	500;501;23	-	37	89,6±0,2	7	95,5±3,2	8	
12	443;443	423;421;42	-	80	89,1±0,2	8	97,9±2,9	8	

N₀ – минимальное количество измерений, обеспечивающее достоверный результат; i – номер группы заданного качества (отличное, хорошее, удовлетворительное); j – номер технологического этапа; M – средняя величина показателя; m -средняя квадратическая ошибка величины.

Таким образом, относительная величина сохранности эмбрионов позволяет свести к минимуму влияние индивидуальных свойств биообъекта, вносящих систематическую погрешность на результат оценки эффективности изучаемой технологии, а также дает возможность использования малых выборок (n<30), обеспечивающих достоверный результат (p<0,05), вследствие снижения влияния разнокачественности биообъекта на уровень изучаемой технологии.

Выводы.

1. Установлено, что наиболее перспективной технологией замораживания эмбрионов коровы, при медленных скоростях замораживания, является

пассивное охлаждение в горловине сосуда Дьюара в соломинках при помощи термоблока выполненного из нержавеющей стали.

2. Учет разнокачественности эмбрионов является обязательным элементом более точной оценки эффективности технологии замораживания.

3. Применение относительной величины выживаемости и жизнеспособности эмбрионов устраняет две основные проблемы, связанные с разнокачественностью биообъекта и критерием оценки его пригодности, а также дает возможность оценить технологию его криоконсервирования.

4. Использование количественных показателей оценки жизнеспособности и выживаемости эмбрионов способствует снижению величины ошибки среднеквадратического отклонения (m) в несколько раз.

5. Метод оценки криоконсервирования эмбрионов по относительным показателям жизнеспособности биообъекта позволяет уменьшить необходимое количество измерений, обеспечивающих достоверный результат, в 5-10 раз. Соответственно в столько же раз уменьшить расход используемого биообъекта и затраты на его получение.

Список литературы: 1. M.B. Nottle, H. Nagashima. Cryopreservation of porcine embryos. - Nature, vol.374, 1995. 2. Baril G., Traldi A-L., Cognie Y. et. al. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos // Theriogenology. 2001. V.56. P.299-305. 3. Loi P., Ptak G., Dattena M., Ledda S., Naitana S., Cappai P. Embryo transfer and related technologies in sheep reproduction // Reproduction, nutrition, development. - 1998. - 38(6). - P. 615-28. 4. Masashige Kuwayama. Evidence-based Embryo Cryopreservation // Journal of Mammalian Ova Research. - 2005. - 22(1). - P. 28-32. 5. Dattena M., Ptak G., Loi P., Cappai P. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts // Theriogenology 2000. - V. 53. - P. 1511-1519. 6. Cocero M.J., Moreno Díaz de la Espina S., Aguilar B. Ultrastructural Characteristics of Fresh and Frozen-Thawed Ovine Embryos Using Two Cryoprotectants // Biology of Reproduction. - 2002. - 66. - P. 1244-1258. 7. Горбунов Л.В. Оценка жизнеспособности эмбрионов млекопитающих и эффективности технологии их криоконсервирования. Проблемы криобиологии. - 2003, №4, с. 35-40. 8. Горбунов Л.В., Бугров О.Д., Горбунова Н.И. Спосіб оцінки ефективності проведення біотехнологічних операцій, які пов'язані з криоконсервацією сперматозоїдів та ембріонів ссавців // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. - Біла Церква. - 2000.- №14. - С. 178-183. 9. Горбунов Л.В. Кількісний спосіб оцінки життєздатності ембріонів ссавців // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. - Біла Церква.-2001.- №17.- С. 30-34. 10. Горбунов Л.В., Салина А.С., Клещев Н.Ф. Оптимизация криоконсервирования эмбрионов мыши // Биотехнология. - 2010. - Т.3, №5. - С. 100 - 105. 11. Кауффольд П., Тамм И., Шихов И.Я. и др. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота: Руководство для работы по пересадке эмбрионов. М.:Агропромиздат.-1990.-56с. 12. Шихов И.Я., Сергеев Н.И. Морфологическая оценка качества ранних эмбрионов крупного рогатого скота // Арх. Анат. Гистол. Эмбриол. - 1981. - В. 81. - №11. - С. 96 - 102. 13. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы / Манк М. - М. : Мир, 1990. - 406 с. 14. Горбунов Л.В., Бучацкий Л.П. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов // - Киев: Киевский университет, 2005. 325 с. 15. Горбунов Л.В. Определение минимального количества измерений, обеспечивающего достоверный научный результат // Агроекологічний журнал. - 2002. - Вип 1. - С. 69-71. 16. European convention for the protection of vertebrate animals used experimental and other scientific purpose: Council of Europe 10. 03. 1986 - Strasburg, 1986. - 52 p. 17. Горбунов Л.В. Влияние вариации технологических параметров на уровень сохранности деконсервированных эмбрионов коров //НТБ №72 ИЖ УААН. - 1996. - Харьков. - С. 17-22.

Поступила в редколлегию 25.12.2010