

Количественный учет гетерогенности эмбрионов коровы для оценки эффективности способа их криоконсервирования и трансплантации

Л.В. ГОРБУНОВ¹, Н.Д. БЕЗУГЛЫЙ²

¹Институт животноводства НААН, г. Харьков

²Украинская академия аграрных наук, г. Киев

Quantitative Consideration of Bovine Embryos Heterogeneity to Evaluate Efficiency of Method for Their Cryopreservation and Transplantation

L.V. GORBUNOV¹, N.D. BEZUGLY²

¹Institute of Animal Science of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov, Ukraine

²Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kiev, Ukraine

Отсутствие метода количественного учета гетерогенности эмбрионов животных при оценке эффективности используемых способов их криоконсервирования и трансплантации является причиной низкой воспроизводимости и несопоставимости полученных результатов.

Исследовали эмбрионы коровы разного качества, находившиеся на стадии развития от ранней морулы до экспандированной бластоцисты. Все манипуляции с биообъектами – получение, поиск, вымывание и подготовка к экспериментам – проводили по общепринятым методикам [Манк М., 1990]. Эмбрионы замораживали в разработанном устройстве [Осташко Ф.И., Безуглый Н.Д., 1991]. В качестве криопротектора применяли раствор 1,2 М глицерина, 10 мин выдерживали в них эмбрионы при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Для выведения криопротектора после размораживания контейнеров использовали раствор сахарозы концентрацией 0,75 М.

В соответствии с предложенной математической моделью вероятность получения теленка от нативного эмбриона V_p зависит от его начального состояния V_0 и эффективности трансплантации W_p ($V_p = V_0 W_p$), а деконсервированного V_{dp} – также от эффективности криоконсервирования W_d ($V_{dp} = V_0 W_p W_d$). Показатели V_p и V_{dp} получали как отношение количества прижившихся эмбрионов к их начальному количеству. Эффективность криоконсервирования составила $W_d = V_{dp}/V_p$, а трансплантации – $W_p = V_p/V_0$. Начальную жизнеспособность V_0 определяли аналитически [Горбунов Л.В., Гордиенко Е.А. 2011] и по результатам краткосрочного культивирования $V_k \approx V_0$.

Для проверки предложенной математической модели проанализированы данные [Кот В.С., Горбунов Л.В., 2001]. Приживляемость нативных (деконсервированных) эмбрионов удовлетворительного $21,6 \pm 5,9\%$ $n = 245$ ($19,1 \pm 6,2\%$ $n = 85$) и отличного качества $53,2 \pm 3,2\%$ $n = 324$ ($51,2 \pm 3,4\%$ $n = 300$) отличается приблизительно на 32%. Регрессионные зависимости показателей состояния нативных и деконсервированных эмбрионов коров от их качества составили: для жизнеспособности $V_0(i) = -0,05i^2 + 0,33i + 0,41$ и $V_d(i) = -0,136i^2 + 0,785i - 0,225$; приживляемости $V(i) = -0,028i^2 + 0,27i - 0,026$ и $V_{dp}(i) = -0,027i^2 + 0,268i - 0,05$. Коэффициент аппроксимации $R^2 = 0,999$, где $i = 1$ для эмбрионов удовлетворительного качества, $i = 2$ хорошего и $i = 3$ отличного. Для обеспечения сопоставимости результатов эффективности W_p и W_d вычисления производили при условии $i = 3$. Обобщенные показатели составили: для эффективностей криоконсервирования $96,2 \pm 4,2$ и трансплантации $54,8 \pm 5,7\%$, начальной жизнеспособности эмбрионов коровы $97,1 \pm 1,0\%$. Расхождения значений, полученные опытным и расчетным способом, для эмбрионов разного качества составляют приблизительно 5%.

The absence of method for quantitative consideration of animal embryo heterogeneity during evaluation of the efficiency of the applied methods of their cryopreservation and transplantation is the cause of low reproductibility and comparability of the obtained results.

We investigated bovine embryos of different quality at the development stage from early morula to expanded blastocyst. All manipulations with bioobjects such as obtaining, search, washing and preparation to the experiments were carried-out by standard methods [Mank M., 1990]. The embryos were frozen with the developed device [Ostashko F.I., Bezugly N.D., 1991]. As a cryoprotectant we used 1.2 M solution of glycerol, kept the embryos for 10 min in it at $20 \pm 2^\circ\text{C}$. To remove the cryoprotectant after thawing of containers we used sucrose solution with 0.75 M concentration.

According to the proposed mathematical model of the probability to obtain a calf from a native embryo V depends on its initial state V_0 and efficacy of transplantation W_p ($V = V_0 W_p$), and frozen-thawed V_{dp} does on the efficiency of cryopreservation W_d ($V_{dp} = V_0 W_p W_d$). The indices V_p and V_{dp} were obtained as the ratio of survived embryos to their initial number. The efficacy of cryopreservation has made $W_d = V_{dp}/V_p$, and transplantation has been $W_p = V_p/V_0$. Initial viability V_0 was determined analytically [Gorbunov L.V., Gordienko E.A. 2011] and by the results of short-term culturing $V_k \approx V_0$.

When testing the proposed mathematical model the data [Kot V.S., Gorbunov L.V., 2001] have been analyzed. Grafting of native (frozen-thawed) embryos of satisfactory $21.6 \pm 5.9\%$ $n = 245$ ($19.1 \pm 6.2\%$ $n = 85$) and excellent quality $53.2 \pm 3.2\%$ $n = 324$ ($51.2 \pm 3.4\%$ $n = 300$) differs by about 32%. Regression dependences of indices of native and frozen-thawed bovine embryos' state on their quality were: for viability $V_0(i) = -0.05i^2 + 0.33i + 0.41$ and $V_d(i) = -0.136i^2 + 0.785i - 0.225$; for grafting $V(i) = -0.028i^2 + 0.27i - 0.026$ and $V_{dp}(i) = -0.027i^2 + 0.268i - 0.05$. Approximation coefficient $R^2 = 0.999$ where $i = 1$ is for the embryos of poor quality, $i = 2$ is for good one and $i = 3$ is for excellent one. To ensure the comparability of the results of W_p and W_d efficiency the calculations were done when $i = 3$. The summarized indices made: for efficiency of cryopreservation 96.2 ± 4.2 and transplantation $54.8 \pm 5.7\%$, the initial viability of bovine embryos $97.1 \pm 1.0\%$. Differences in the values obtained experimentally and those calculated for embryos of different quality are about 5%.