



УДК: 635.076: 57.043

## УЧЕТ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ЭМБРИОНОВ ПРИ ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

**Горбунов Л.В., к. с.-х. н.**

Институт животноводства НААН, г. Харьков

*Предложен способ количественного учета гетерогенности эмбрионов при оценке эффективности их криоконсервирования многократно повышающий воспроизводимость результатов опытов. Это дает возможность многократно сократить количество эмбрионов при условии получения достоверного результата. Преимущество предложенного способа, в сравнении с существующими аналогами, заключается в возможности проведения исследования при использовании разного качества эмбрионов и разных методов их криоконсервирования, что обеспечивается применением параметрических критериев анализа малых выборок. Показано, что количественный учет начальной жизнеспособности эмбрионов (зависимой от их индивидуальных свойств - качества и физиологического состояния доноров) дает возможность снизить их число до 15 шт. в каждой группе для получения достоверного результата.*

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

Экспериментальные данные показывают, что сила влияния вариации индивидуальных свойств биообъекта сопоставима с величиной воздействия на него исследуемых технологических факторов [1]. Применение методов математического моделирования позволяет осуществлять учет индивидуальных свойств биообъекта и особенностей составляющих технологических этапов, что повышает воспроизводимость и обеспечивает сопоставимость результатов криобиологического эксперимента.

Эмбрионы млекопитающих являются наиболее сложным объектом для исследования вследствие экономических (затраты на получения одного эмбриона коровы составляют более 1500 гривен) и этических (забой лабораторных животных) причин. Преимущество предложенного биометрического способа заключается в возможности проведения исследования при использовании разного качества эмбрионов и разных методов их криоконсервирования, что обеспечивается применением параметрических критериев анализа для однородных выборок при их малом количестве ( $n < 30$  единиц) [2]. Это приводит к необходимости определения минимально допустимого количества используемых эмбрионов в опыте для оценки влияния исследуемых технологических факторов.

Целью данных исследований являлось определение минимального количества эмбрионов обеспечивающих требуемую точность оценки влияния исследуемых технологических факторов посредством учета гетерогенности биообъекта.

**Материалы и методы исследований.** Объектом исследования были эмбрионы мышей, находившиеся на стадии развития от морулы до ранней бластоцисты. Эмбрионы мышей получали от самок лабораторных мышей, возрастом  $6 \div 8$  недель, (Mus musculus) СВА и гибридных Fi(СВАхС57В1), которые содержались в стандартных условиях вивария. Гормональную стимуляцию овуляции осуществляли внутримышечным введением самкам гонатропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) и (через  $46 \div 50$  часов) хорионического гонатропина человека (чХГ) в



дозах 5 МО [3, 4]. Эмбрионы получали через 86 ÷ 94 часа после инъекции чХГ. Забой самок осуществлялся посредством смещения шейных позвонков. Эмбрионы вымывали из препарированных рогов матки теплым (37 °С) фосфатно-солевым буфером Дюльбекко [5]. Материал помещали в пластиковые чашки Петри. Поиск эмбрионов и манипуляция с ними осуществлялась при помощи микроскопа МБС-9 при увеличении 28 раз (общий вид) и в 98 раз (для оценки отдельных бластомеров).

Все манипуляции с биообъектами – поиск, вымывание и подготовка к экспериментам проводили по общепринятым методикам [5]. В экспериментах использовались эмбрионы отличного, хорошего и удовлетворительного качества. Качество эмбрионов оценивали морфологически и результатам их развития в культуре *in vitro* [3, 4]. Критериями оценки качества и состояния эмбрионов мыши служили временные параметры развития и наличие или отсутствие видимых морфологических дефектов в соответствии с принятой классификацией.

Среды применяемые для проведения криоконсервирования эмбрионов мышей приготовлены на основе раствора Дюльбекко (PBS) с добавлением 10 % телячьей фетальной сыворотки. Для замораживания эмбрионов мышей в качестве эквilibрирующих (длительность экспозиции 10 мин) применялся 15 % (V/V) раствор глицерина и витрифицирующих (1 мин) 30% глицерина и 25% сахарозы (V/V). Насыщение криопротектором проводили в две ступени. Замораживание эмбрионов осуществлялось прямым погружением пластиковой соломинки ( $d=2\text{мм}$ ,  $V=200\text{ мкл}$ ) в жидкий азот. Для выведения криопротектора после размораживания контейнеров использовали раствор сахарозы концентрацией 0,75 М. Оттаивание контейнеров содержащих эмбрионы проводили в водяной бане при 40 °С.

Для повышения воспроизводимости результатов криоконсервирования исследование проводили с эмбрионами одинакового качества в каждой группе:

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

где  $S_i$  – сохранность пригодных к дальнейшему использованию эмбрионов  $i$ -го качества (удовлетворительное  $i=3$ , хорошее  $i=4$  и отличное  $i=5$ );

$n$  и  $n_{io}$  – количество пригодного биообъекта после криоконсервирования и начальная.

Для повышения точности оценки жизнеспособности эмбрионов после криоконсервирования использовали формулу расчета средневзвешенной величины их нативного состояния [1]:

$$V_i = \frac{1}{n_{io}} \sum_{i=1}^k V_{io} \cdot n_i , \quad (2)$$

где  $n_i$  – количество эмбрионов  $i$ -го качества после криоконсервирования.

Жизнеспособность нативных эмбрионов мыши  $i$ -го качества определяли аналитически и по результатам краткосрочного культивирования [1]:

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

где:  $V_{ik}$ ,  $V_{id}$  и  $V_{idk}$  – жизнеспособность эмбрионов после культивирования в условиях *in vitro*, замораживания-оттаивания, замораживания-оттаивания и последующего культивирования.



Эффективность криоконсервирования эмбрионов определяли, как отношение жизнеспособности деконсервированного объекта к её нативному состоянию [1]:

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

Статистический анализ полученных данных проводили при помощи параметрических и непараметрических критериев проведения статистического анализа [6] на основе применения разработанных нами и стандартных программ Microsoft Excel. Сравнительный анализ методов статистической обработки результатов деконсервированных эмбрионов проводили в группах, имеющих различное начальное состояние. Достоверность различия величин сохранности, жизнеспособности эмбрионов и эффективность их криоконсервирования рассчитывали, с помощью параметрического критерия Стьюдента  $t$  и непараметрических Пирсона  $\chi^2$ , Уилкоксона  $T$  и  $U$  [6]. Полученные показатели сохранности, жизнеспособности, эффективности, коэффициенты вариации и надежности выражали в процентах.

Минимальное количество эмбрионов, обеспечивающих достоверное среднее значение  $P \geq 0,95$  сохранности (1), жизнеспособности (2, 3) и эффективность их криоконсервирования (4), определяли по формуле [7]:

$$N = \left( \frac{t}{p} C_v \right)^2, \quad (5)$$

где  $t$  – критерий Стьюдента;  $p$  – допустимая относительная ошибка ( $p=5\%$ );  $C_v$  – коэффициент вариации, %.

Повышение воспроизводимости результатов эксперимента оценивали как отношение коэффициентов вариации, полученных для показателей сохранности, жизнеспособности и эффективности. Уменьшение количества эмбрионов оценивали как квадрат величины отношения сравниваемых коэффициентов вариации [1].

Таблица 1

**Количество и качество эмбрионов мышей до и после криоконсервирования в опытной и контрольной группах**

Качество эмбрионов, балл	Количество до эксперимента, шт.		Качество после эксперимента, балл							
	n <sub>1</sub> =10	n <sub>2</sub> =10	2	3	4	5	2	3	4	5
			n <sub>1</sub>				n <sub>2</sub>			
3	4	3	2	2	–	–	2		–	–
4	3	4		2	1	–	0	2	1	–
5	3	3	0	1	1	1	0	2	1	0

Примечание. n<sub>1</sub> и n<sub>2</sub> – количество эмбрионов в контроле и опыте.

**Результаты исследования.** Для определения минимального количества эмбрионов при оценке эффективности их криоконсервирования проанализированы данные состояния нативных и деконсервированных эмбрионов мышей удовлетворительного, хорошего и отличного качества, полученные нами в [7].

С целью получения достоверности различия в контроле и опыте взяты выборки объемом по десять штук эмбрионов мышей отличного, хорошего и удовлетворительного качества в каждой (табл. 1). После криоконсервирования эмбрионы



в разных группах (удовлетворительного – отличного качества) имели значимый разброс показателей сохранности составивший в опытной группе  $50 \div 100$  %, а в контроле  $0 \div 100$  % (табл. 2).

Таблица 2

**Состояние деконсервированных эмбрионов мышей замороженных в пробирках Уленгута (контроль) и соломинках (опыт), имеющих различную нативную жизнеспособность  $V_0$**

Качество, балл	Сохранность, %			Жизнеспособность, %				Эффективность, %		
	$S_1$	$S_2$	$S_1-S_2$	$V_0$	$V_1$	$V_2$	$V_1-V_2$	$W_1$	$W_2$	$W_1-W_2$
3	50	0,0	50,0	70	50,0	20,0	30,0	71,4	28,6	42,9
4	100	75	25,0	85	75	56,3	18,8	88,2	66,2	22,1
5	100	100	0,0	95	83,3	75	8,3	87,7	78,9	8,8
M	80,0	60,0	26,3	82,8	68,8	49,2	19,6	82,2	56,8	25,4
m	20,4	36,8	17,7	8,9	12,3	19,8	7,7	6,8	18,5	12,1
$C_v$ , %	36	87	31,3	15	25	57	15,8	12	46	20,9
t	0,48		1,48	-	0,84		2,55	1,29		2,09

Примечания: 1.  $S_1$  и  $S_2$ ,  $V_1$  и  $V_2$ ,  $W_1$  и  $W_2$  – сохранность, жизнеспособность, эффективность эмбрионов в контроле и опыте после криоконсервирования.

2. Критерии анализа достоверности различия Стьюдента: непарные, для одной пары (контроль–опыт) проб –  $t_a$  и парные –  $t_{\Delta}$  для трех пар,  $n_1 = n_2 = 10$ .

Для жизнеспособности разброс показателей оказался значимо меньшим, составив в опыте  $50 \div 83,3$  % и контроле  $20 \div 75$  %, а эффективности  $71,4 \div 88,2$  % и  $28,6 \div 78,9$  %, соответственно. Количественный учет гетерогенности эмбрионов до и после криоконсервирования дал возможность снизить вариацию показателей приблизительно в 1,5 раза для показателей жизнеспособности и 2 раза эффективности (см. значения коэффициентов вариации и ошибки среднеквадратического отклонения табл. 2).

Применение парного –  $t_{\Delta}$  и не парного –  $t_a$  критериев Стьюдента не дало возможности получить достоверность различия в сравниваемых группах с уровнем надежности 0,95.

С целью получения достоверности различия объем выборок был увеличен до 15 эмбрионов в контрольной и опытной группах (табл. 3). Разброс показателей в опытной и контрольной группе практически не изменился, составив для сохранности  $50 \div 100$  % и  $20 \div 100$  %, жизнеспособности  $45 \div 90$  % и  $32 \div 81$  %, а эффективности  $64,3 \div 94,7$  % и  $45,7 \div 85,2$  % (табл. 4).

Таблица 3

**Количество и качество эмбрионов мышей до и после криоконсервирования в опытной и контрольной группах**

Качество эмбрионов, балл	Количество до эксперимента, шт		Качество после эксперимента, балл							
			2	3	4	5	2	3	4	5
	$n_1=15$	$n_2=15$	$n_1$				$n_2$			
3	6	5	2	3	–	–	3	1	–	–
4	5	5		2	2	–	1	1	2	–
5	4	5	0	0	2	2	0	2	2	1



Таблиця 4

**Состояние деконсервированных эмбрионов мышей замороженных в пробирках Уленгута (контроль) и соломинках (опыт), имеющих различную нативную жизнеспособность  $V_0$**

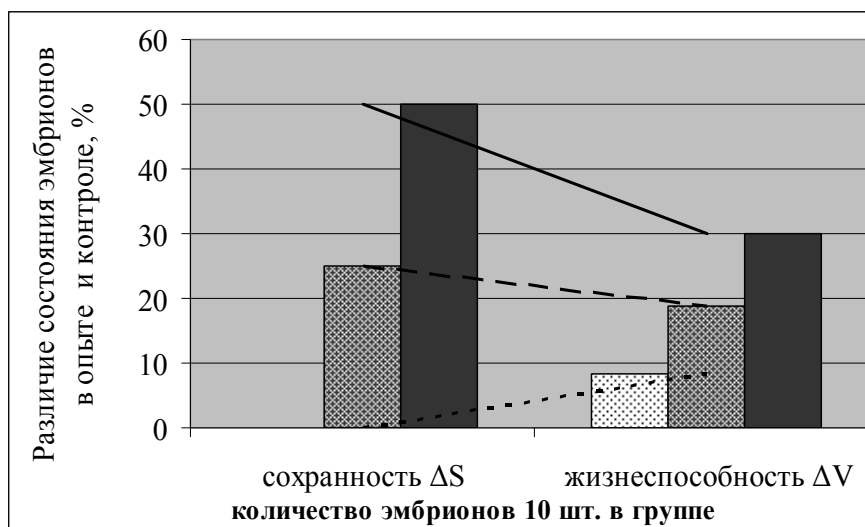
Качество, балл	Сохранность, %			Жизнеспособность, %				Эффективность, %		
	$S_1$	$S_2$	$S_1-S_2$	$V_0$	$V_1$	$V_2$	$V_1-V_2$	$W_1$	$W_2$	$W_1-W_2$
3	50	20	30,0	70	45	32	13,0	64,3	45,7	18,6
4	80	60	20,0	85	62	54	8,0	72,9	63,5	9,4
5	100	100	0,0	95	90	81	9,0	94,7	85,2	9,5
M	73,3	60,0	17,7	82,5	64,2	54,0	10,1	76,3	63,5	12,8
m	17,8	28,3	10,8	8,9	16,1	17,4	1,9	11,1	14,0	3,7
$C_v$	34	67	20,8	15	35	45	4,1	21	31	6,9
t	0,40		1,64	-	0,43		5,42*	0,72		3,43*

Примечание. См. табл. 2. \* –  $P \geq 0,95$ . Объем выборок 15 шт.

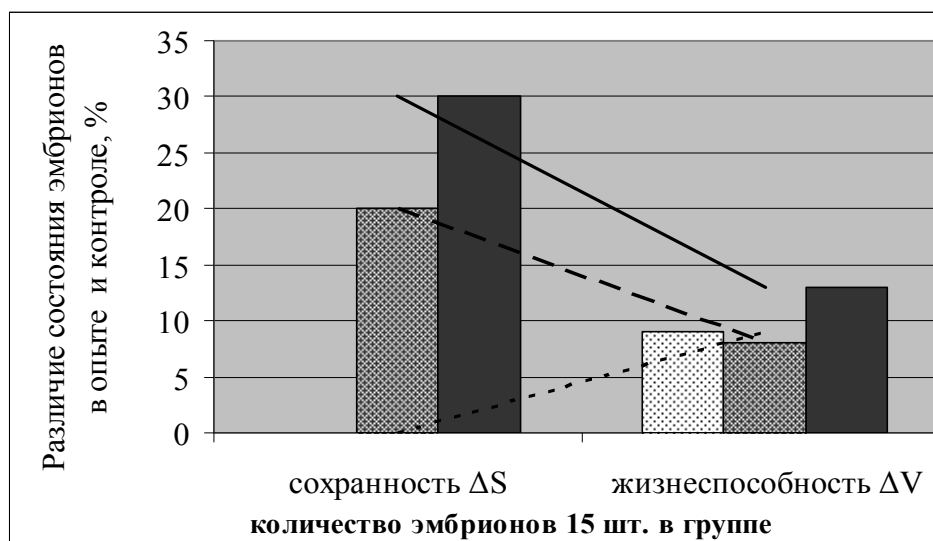
Данное явление объясняется устранением влияния межгрупповой вариации (гетерогенности эмбрионов) на оценку различия сравниваемых групп. Учет гетерогенности эмбрионов (влияние внутригрупповой вариации) дал возможность, снизить показатели коэффициентов вариации и ошибок среднеквадратического отклонения в  $1,6 \div 2,6$  раза для сохранности, жизнеспособности  $8,3 \div 15,6$  и эффективности  $4,9 \div 9,7$ . Увеличение количества эмбрионов на  $1/3$  часть позволило снизить вариацию для показателя сохранности в 1,5 раза жизнеспособности – 3,8 и эффективности – 3,0. Вместе с тем получена достоверность различия с уровнем надежности  $P \geq 0,95$  по парному критерию Стьюдента –  $t_d$  для показателей жизнеспособности и эффективности.

Традиционный способ оценки сохранности эмбрионов дает значимое расхождение в группах, содержащих разное качество. В группе с отличным качеством  $DS_5=0$  для  $n=10$  шт. (табл. 3, рис. 1) и  $n=15$  шт. (табл. 4, рис. 2). Удовлетворительного  $DS_4=25$  и 20 %, а неудовлетворительного  $DS_3=50$  и 30 %. Полученные результаты отражают низкую чувствительность качественной оценки изменения состояния эмбрионов к воздействию исследуемых технологических факторов. В то время как для показателя жизнеспособности данный показатель более стабилен  $DV_5=8,3$ ,  $DV_4=18,8$ ,  $DV_3=30$  %  $n=10$  шт. (табл. 3, рис. 1) и  $DV_5=9$ ,  $DV_4=8$ ,  $DV_3=13$  % для  $n=15$  шт. (табл. 4, рис. 2).

Таким образом, минимальное количество эмбрионов в группах, содержащих разное качество, составляет 15 шт., что дает приблизительно одинаковое расхождение значений их жизнеспособности в контроле и опыте. Для многократного повышения воспроизводимости результатов исследования и обеспечения условия их сопоставимости, при использовании разных способов замораживания, рекомендуется применять математическую модель, описывающую зависимость жизнеспособности деконсервированного объекта от его начального состояния и эффективности этапов криоконсервирования [1, 2]. Повышение воспроизводимости результатов исследования обеспечивается количественным учетом начального состояния биологического материала и эффективности этапов его криоконсервирования.



**Рис. 1.** Различие состояния деконсервированных эмбрионов мышей отличного (⦿), хорошего (▨) и удовлетворительного (■) качества в опыте и контроле. Объем выборок 10 эмбрионов в каждой.



**Рис. 2.** Различие состояния деконсервированных эмбрионов мышей отличного (⦿), хорошего (▨) и удовлетворительного (■) качества в опыте и контроле. Объем выборок 15 эмбрионов в каждой.

**Вывод.** Количественный учет начальной жизнеспособности эмбрионов (зависимой от их индивидуальных свойств - качества и физиологического состояния доноров) дает возможность снизить их число до 15 шт. в каждой группе для получения достоверного результата.

#### Библиографический список

1. Горбунов Л.В. Обеспечение условий сопоставимости результатов криоконсервирования эмбрионов млекопитающих / Горбунов Л.В., Гордиенко Е.А. // Проблемы криобиологии. – 2011. – № 2. – С. 162–172.
2. Горбунов Л.В. Биометрический способ оценки состояния эмбрионов млекопитающих и эффективности их криоконсервирования / Горбунов Л.В., Василенко А.Н. // Сборник научных трудов международной научно-практической



конференции. Современные проблемы и пути их решения в науке, транспорте, производстве и образовании. – Одесса, 2012. –Т. 45. – С. 45–53.

3. 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.

4. 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.

5. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы.– М.: Мир, 1990.– 406 с.

6. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. С. Гланц.– М.: Практика, 1998. – 459 с.

7. Горбунов Л.В. Крיוконсервация половых клеток и эмбрионов // Горбунов Л.В., Бучацкий Л.П.: Монография – К.: Издательско-полиграфический центр “Киевский университет”, 2005. – 325 с.

### *ОБЛІК ГЕТЕРОГЕННОСТІ ЕМБРІОНІВ ПРИ ОЦІНЦІ ЕФЕКТИВНОСТІ ЇХ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ*

*Горбунов Л.В., Інститут тваринництва НААН, м. Харків*

*Запропоновано спосіб кількісного обліку гетерогенності ембріонів при оцінці ефективності їх крיוконсервування, що багаторазово підвищує відтворюваність результатів дослідів. Це дає можливість значно скоротити кількість ембріонів за умови отримання достовірного результату. Переваги запропонованого способу, в порівнянні з існуючими аналогами, полягає в можливості проведення дослідження при використанні різної якості ембріонів і різних методів їх крיוконсервування, що забезпечується застосуванням параметричних критеріїв аналізу малих вибірок. Показано, що кількісний облік початкової життєздатності ембріонів (залежно від їх індивідуальних властивостей - якості і фізіологічного стану донорів) дає можливість знизити їх число до 15 шт. у кожній групі для отримання достовірного результату.*

*Ключові слова: відтворюваність результатів, ембріони, збереження, життєздатність, ефективність крיוконсервування.*

### *ACCOUNTING THE EMBRYOS HETEROGENEITY AT THE EFFECTIVENESS EVALUATION OF THEIR CRYOPRESERVATION*

*L.V. Gorbunov, Institute of Animal Science UAAS, Kharkov*

*The method of quantitative accounting of embryos heterogeneity at the effectiveness evaluation of their cryopreservation was proposed. It increases in many times the performance of the experiment results. It gives the possibility to reduce considerably the embryos number provided by obtaining reliable result. The advantages of the proposed method, compared with existing analogues, consists in the possibility to conduct a study with the use of different quality embryos and various methods of their cryopreservation, which is provided by applying parametric criteria for the analysis of small samples. The results demonstrate that the quantitative accounting of embryos initial viability (according to their individual properties that are quality and donors physiological condition) gives an opportunity to reduce their number to 15 pcs. in each group to obtain reliable results.*

*Keywords: performance of results, embryos, preservation, viability, cryopreservation effectiveness.*