

УДК 636.082.4 52/55

А.М. МАЛИНОВСКИЙ, Н.М. РЕШЕТНИКОВА,  
Т.А. МОРОЗ

*Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела*

## НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ТЕХНОЛОГИИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ГЕНОФОНДНЫХ БАНКОВ

---

*В период с 1992 по 1995 г. сформирован банк эмбрионов, содержащий 1568 эмбрионов 15 пород крупного рогатого скота. Показано, что для криоконсервации можно использовать эмбрионы с оценкой «удовлетворительно» и выше, с последующей выбраковкой по качеству после оттаивания. Рассмотрены некоторые узловые моменты технологии криоконсервации, позволяющие получать качественные эмбрионы после оттаивания. Установлено, что хранение эмбрионов в криоконсервированном виде в течение 10 лет не приводит к снижению их приживляемости.*

**Генофондный банк, криоконсервация, оценка качества эмбрионов**

В сложившихся экономических условиях наиболее рентабельная отрасль животноводства — молочное скотоводство. Основным фактором, влияющим на рентабельность производства молока, является высокий темп генетического совершенствования стада, направленного на создание животных современного типа, характеризующегося скороспелостью, эффективным использованием кормов и долголетием при оптимальной молочной продуктивности, а также высоким содержанием в молоке жира и белка.

Новым подходом к ускорению генетического прогресса в соответствии с требованиями современной селекции является применение метода трансплантации эмбрионов, который дает

© А.М. Малиновский, Н.М. Решетникова, Т.А. Мороз, 2006

Розведення і генетика тварин. 2006. Вип. 40.

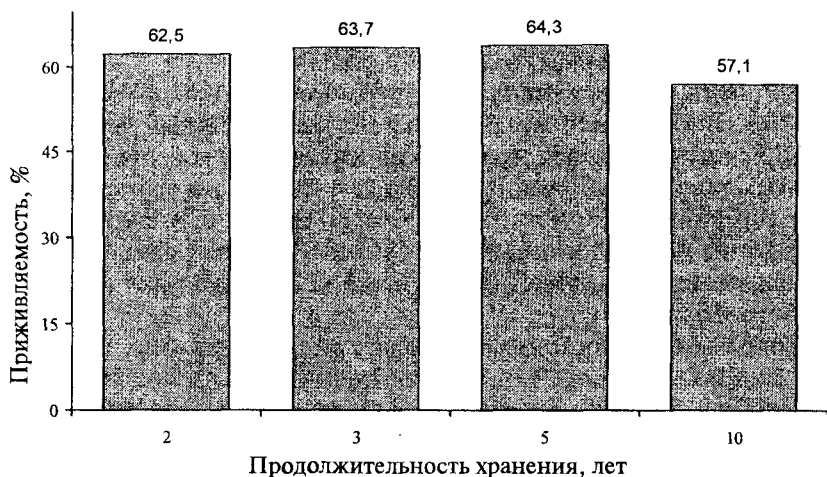
возможность широко использовать последние достижения мировой генетики в области скотоводства.

В России метод трансплантации эмбрионов начали внедрять в 1983 г. В 1990 г. в 39 областях, краях и автономных республиках при научно-исследовательских институтах и ведущих племенных заводах работало 124 центра и пункта по трансплантации эмбрионов. В настоящее время метод трансплантации эмбрионов в селекционных программах России практически не используется, а накопленный генофондный материал остается невостребованным.

Современное состояние метода криоконсервации эмбрионов дает возможность замораживать эмбрионы и создавать генофондные банки с целью длительного хранения ценного генетического материала и использования его в соответствии с селекционными программами различных уровней. Такой банк эмбрионов был создан при ВНИИплем. Банк формировался в период с 1992 по 1995 г. из эмбрионов, полученных как непосредственно специалистами института, так и эмбрионов, поставлявшихся из различных центров и пунктов трансплантации России. В настоящее время в банке находятся на хранении 1568 эмбрионов от 298 коров-доноров 15 пород крупного рогатого скота молочного и мясного направлений продуктивности.

При закладке на хранение эмбрионов в первую очередь возникает вопрос о гарантированном сроке хранения генетического материала без существенной потери их свойств. Анализ результатов по приживляемости эмбрионов, пересаженных после хранения в течение длительного времени, представлен на рисунке.

На диаграмме видно, что приживляемость эмбрионов существенно не менялась при хранении их в течение 10 лет (57,1–64,3%). Более низкую степень приживляемости имели эмбрионы, хранившиеся в течение 10 лет (57,1%), но полученные различия статистически недостоверны. Это свидетельствует о том, что метод криоконсервации эмбрионов позволяет практически хранить эмбрионы крупного рогатого скота в криобанках в течение 10 лет без риска снижения их приживляемости.



**Влияние сроков хранения на приживляемость эмбрионов**

Сохранность и жизнеспособность трансплантированных эмбрионов зависят от целого ряда факторов, связанных с технологией замораживания и хранения, с техникой пересадки, с состоянием половой системы реципиента и т.д. При закладке эмбрионов на длительное хранение необходимо быть уверенным в том, что после оттаивания будут получены эмбрионы, не потерявшие своих свойств и способные к дальнейшему развитию. Поэтому следует строго придерживаться определенных требований как к самому эмбриону, так и к процедурам, связанным с подготовкой к криоконсервации.

Первым критическим моментом в подготовке к криоконсервации является время от момента извлечения эмбриона до начала замораживания. Этот период должен составлять не более 3 ч, поскольку при более продолжительном времени до начала криоконсервации (свыше 3 ч) приживляемость эмбрионов снижается на 24%.

Важнейший фактор, определяющий успех трансплантации, — качество самого эмбриона. Различные манипуляции *in vitro* могут быть причиной снижения способности эмбрионов к дальнейшему развитию. В настоящее время в практике наибольшее распространение получил метод морфологической оценки качества эм-

брионов. Он технически не требует ни значительных затрат, ни средств, ни времени и не причиняет заметного вреда эмбрионам.

Согласно действующей инструкции для криоконсервации используют только свежеполученные эмбрионы «отличного» и «хорошего» качества. Поскольку в процессе замораживания-оттаивания эмбрионы подвергаются воздействию различных повреждающих факторов, их морфологическая оценка после оттаивания снижается, поэтому инструкцией предусмотрена выбраковка до замораживания эмбрионов с оценкой «удовлетворительно». Однако нами было установлено, что на процедуру замораживания эмбрионы реагируют по-разному: из 851 эмбриона 218 (26%) не изменили своей оценки по качеству после криоконсервации и имели приживляемость в среднем на 16% выше, чем эмбрионы с изменением оценки.

Многочисленными исследованиями показано, что приживляемость эмбрионов удовлетворительного качества по сравнению с таковой для эмбрионов, имеющих оценку 4–5 баллов, значительно ниже. Вместе с тем, по нашим данным, криоконсервированные эмбрионы, имевшие перед замораживанием оценку «удовлетворительно», могут давать высокую степень приживляемости (58%). Эмбрионы даже при наличии значительных повреждений перед криоконсервацией оказывались жизнеспособными, и после пересадки успешно развивались. Этот факт лишний раз убеждает в том, что оценка состояния эмбрионов только по морфологическим критериям не является достаточно объективной. Необходимо разрабатывать более совершенные методы оценки, дающие возможность определять состояние эмбрионов в практических условиях и прогнозировать их приживляемость после трансплантации животному-реципиенту. Однако следует признать, что на данном этапе морфологическая оценка эмбрионов наиболее оперативна, безвредна и вполне приемлема для использования в производственных условиях.

Установлено, что жизнеспособность, а вместе с нею и приживляемость криоконсервированных эмбрионов после нехирургической пересадки в основном зависят от степени изменения состояния эмбриона в процессе замораживания-оттаивания, и что приживляемость эмбрионов обратно пропорциональна степени

повреждения их в процессе криоконсервации ( $r = -0,98$ ). Отсюда следует, что при формировании эмбриобанков, учитывая высокую генетическую ценность эмбрионов, закладываемых на хранение, все полученные эмбрионы с оценкой от 3 баллов и выше необходимо замораживать. Окончательное решение о пригодности эмбрионов к пересадкам принимается после их оттаивания и оценки, согласно действующей системе определения качества. По степени изменения качества эмбрионов после оттаивания прогнозируется уровень их приживляемости и выбраковываются нежизнеспособные эмбрионы.

Одним из важных технологических моментов является сам процесс охлаждения эмбрионов. На этом этапе необходимо максимально сократить время, затрачиваемое на криоконсервацию. Насыщение эмбриона криопротектором проводится одномоментно. Использование устройств со спиртовой охлаждающей камерой позволяет сразу помещать контейнер с эмбрионом в температуру, при которой происходит «затравка» льдообразования. При этом исключается период времени 20–25 мин., требуемый для охлаждения эмбриона от плюсовых температур до температуры внесения «затравки».

Рекомендуемая инструкцией скорость охлаждения от температуры льдообразования до конечной температуры замораживания составляет 0,3 град/мин. Эту величину можно увеличить до 0,5...0,6 град/мин без заметного снижения качества криоконсервированных эмбрионов. Конечная температура, до которой программно охлаждается эмбрион перед погружением в жидкий азот, составляет по нашим данным  $-35^{\circ}\text{C}$ .

Оптимальный режим замораживания эмбрионов крупного рогатого скота при использовании в качестве криопротектора 1,5М раствора глицерина имеет следующие параметры:

- температура внесения «затравки» льдообразования . . . . .  $-6...-7^{\circ}\text{C}$ ;
- скорость охлаждения . . . . . 0,5 град/мин;
- конечная температура охлаждения . . . . .  $-35^{\circ}\text{C}$ .

И последний этап — размещение контейнеров с криоконсервированными эмбрионами и их маркировка. В данный момент существует два основных подхода к идентификации контейнеров с эмбрионами:

- 1) нанесение наиболее полной информации об объекте хранения непосредственно на контейнер, в котором он находится;
- 2) каждый из этих подходов имеет свои положительные и отрицательные стороны, кодировка объекта тем или иным способом с расшифровкой нанесенного кода в первичных документах, сопровождающих объект хранения.

В банке эмбрионов ВНИИплем использовался метод кодировки для перехода на единую систему идентификации. Это было обусловлено тем, что эмбрионы были уже криоконсервированы и имели свои идентификационные метки. Учитывая важность сохранения полноты информации о каждом конкретном объекте, заложенном на длительное хранение, при формировании генофондных банков было бы логично использовать оба подхода при идентификации эмбрионов.

Оценивая современное состояние метода криоконсервации эмбрионов, можно с уверенностью сказать, что эмбрионы крупного рогатого скота можно длительно хранить в генофондных банках, и для этого в настоящее время разработаны все необходимые способы и методы.

#### **ДЕЯКІ АСПЕКТИ ТЕХНОЛОГІЇ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ПРИ ФОРМУВАННІ ГЕНОФОНДНИХ БАНКІВ.** А.М. Маліновський, Н.М. Решетнікова, Т.А. Мороз

*У період з 1992 по 1995 р. сформовано банк ембріонів (n= 1568) 15 порід великої рогатої худоби. Показано, що для кріоконсервації можна використовувати ембріони з оцінкою «задовільно» і вище, з наступним вибракуванням за якістю після відтаювання. Розглянуто деякі моменти технології кріоконсервування, які дають змогу отримувати якісні ембріони після відтаювання. Встановлено, що зберігання ембріонів у кріоконсервованому вигляді протягом 10 років не призводить до зниження їхньої приживлюваності.*

#### **SOME ASPECTS OF CRYOTECHNOLOGY OF EMBRYOS UNDER CREATING OF GENEFUND BANKS.** A.M. Malinovskiy, N.M. Reshetnikova, T.A. Moroz

*During 1992–1995 years genefund embryobank was created. This bank holds 1568 embryos of 15 cattle breeds. Our researches showed that «fair»*

*embryos can be cryoconserved equally with «good» and «excellent» embryos and at the same time final culling of embryos with low quality can be carried out after thawing. Some technological stages allowing to optimize cryoconservation process was viewed. It was determined that the storage of frozen embryos during 10 years do not decrease embryos survival after transfer.*

**УДК 636.39.082**

**Н.И. МАЛМАКОВ, С.Ж. АРЫНГАЗИЕВ, С.А. АУЗБАЕВ,  
Г.К. АСИЛЬБЕКОВА**

*Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан  
РГП «Научно-производственный центр животноводства  
и ветеринарии»*

*Научно-исследовательский институт овцеводства*

**К. КЕРВЕН**

*Научно-исследовательский институт землепользования Маколи*

**Ж.Ш. АХМЕТОВА, Х. БЕККУЛОВ**

*Алматинский зоопарк*

## **ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНЫХ КОЗ\***

*Проведены работы по гибридизации винторогого козла мархора (Capra Falconeri) с домашними казахскими козами. Получено жизнеспособное потомство.*

**Козы, винторогий козел, кашемир**

В настоящее время в связи с повышением спроса на козий пух типа кашемир мы провели изучение качества шерсти местных казахских коз и обнаружили, что в основном тонина пуха у них составляет 15–16 микрон, что удовлетворяет требованиям на каше-

\* Исследование проведено при поддержке посольства Великобритании в г. Алматы и проекта ЕС «DARCA».

© Н.И. Малмаков, С.Ж. Арынгазиев, С.А. Аузбаев,  
Г.К. Асылбекова, К. Кервен, Ж.Ш. Ахметова, Х. Беккулов, 2006

Розведення і генетика тварин. 2006. Вип. 40.