

## ПОДХОДЫ К КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ КРОЛИКОВ МЕТОДОМ ВИТРИФИКАЦИИ

*Витрификация эмбрионов кролика*

Д.В. Попов<sup>1\*</sup>, Е.С. Колесник<sup>1</sup>, Е.А. Ермакова<sup>1</sup>, П.Г. Таргош<sup>1</sup>, Г.Ю. Косовский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт пушиного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева»

Россия, 140143, Московская область, Раменский район, пос. Родники, ул. Трудовая, 6.

\*e-mail: popov.bio@gmail.com

Для криоконсервации эмбрионов млекопитающих применяют метод программного замораживания, основанный на медленном снижении температуры и требующий специализированного оборудования, и метод витрификации, основанный на принципе минимального охлаждаемого объема, когда за счет объема меньше 0,1 мкл эмбрионы охлаждаются и отогреваются с очень высокой скоростью. В данном исследовании выполнено сравнение выживаемости и способности к дальнейшему развитию после процедуры витрификации-отогревания эмбрионов кроликов. С этой целью эмбрионы на стадиях развития морулы и бластоциста и полученные методами *in vitro* и *in vivo* от 21 самки кролика породы белый великан подвергались процедуре витрификации и отогревания по двум протоколам, отличающимся режимами экспозиции и составом базовых растворов: 1) TLP-HEPES + 20% сыворотки крови (TH20) и 2) DPBS + 0,2% БСА. Результаты культивирования показали, что выживаемость эмбрионов после процедуры витрификации и отогревания составила: для протокола № 1 морулы *in vitro* – 53,3%, бластоцисты *in vitro* – 45,4%, морулы *in vivo* – 47,8%, бластоцисты *in vivo* – 38,0%; для протокола № 2 морулы *in vitro* – 84,6%, бластоцисты *in vitro* – 70,0%, морулы *in vivo* – 68,0%, бластоцисты *in vivo* – 63,6%. Было установлено, что выживаемость эмбрионов кролика после витрификации зависела от метода получения эмбрионов и стадии развития. Протокол № 2 лучше подходил для витрификации эмбрионов кролика. Таким образом, для криоконсервации методом витрификации эмбрионов кролика рекомендуется использовать эмбрионы, находящиеся на стадии развития морулы, применяя протокол № 2 с составом базовых растворов DPBS + 0,2% БСА.

**Ключевые слова:** кролик, эмбрионы, морула, бластоциста, витрификация, криоконсервация

Репродуктивные технологии (РТ) применяются как в медицине с целью борьбы с бесплодием, так и в животноводстве для повышения эффективности селекционных процессов, увеличения продуктивности и сохранения генетических ресурсов. В то же время некоторые этапы репродуктивных технологий оказывают влияние на закономерности развития в перинатальный и постнатальный периоды.

В настоящее время гормональные обработки гонадотропными гормонами проводят для стимуляции яичников самок-доноров эмбрионов с целью индукции роста большого количества антральных фолликулов. Ооциты, собранные из этих фолликулов, могут созревать, оплодотворяться и развиваться *in vitro* до тех пор, пока они не будут подвержены либо криоконсервации, либо трансплантации самкам-реципиентам. При проведении этих процедур гаметы и зиготы подвергаются ряду нефизиологических процессов,

которые могут потребовать адаптации эмбрионов для выживания в этих условиях. Такая адаптация возможна, благодаря ранней эмбриональной пластичности, которая позволяет эмбриону изменять экспрессию генов, тем самым корректируя этапы дальнейшего развития [1]. Однако эти изменения могут влиять на последующие стадии развития эмбриона до взрослого состояния, и в настоящее время широко признано, что методы, сроки, процедура криоконсервации или условия культивирования оказывают различное влияние на дальнейшее развитие эмбрионов [2, 3].

Количество пересаженных эмбрионов, полученных методом множественной овуляции животных разных видов в 2020 году по данным АЕТЕ составило 91835 у крупного рогатого скота, 18839 у овец, 2248 у лошадей. Часть из них была подвергнута программируемой криоконсервации. Метод программируемой криоконсервации эмбрионов млекопитающих хорошо от-

работан и усовершенствован на протяжении последних десятилетий, и успех приживляемости после трансплантации криоконсервированных эмбрионов находится примерно на том же уровне, как и при трансплантации свежих эмбрионов [4]. Количество пересаженных эмбрионов, полученных методом *in vitro*, ежегодно возрастает и в 2020 году составило около 240206 у крупного рогатого скота только в США [5]. Это связано с возможностью ускоренного получения потомства от ценных животных при использовании метода ovum pick-up, а также с рациональным использованием разделенного по полу семени быка при оплодотворении ооцитов *in vitro*. При этом криоконсервация эмбрионов, полученных методом *in vitro*, остаётся на довольно низком уровне и составляет около 30-40% [6]. В основном это объясняется тем, что при использовании медленного замораживания жизнеспособность полученных IVP эмбрионов существенно снижается. Полученные методом *in vitro* эмбрионы по ряду морфологических характеристик существенно отличаются от полученных *in vivo* эмбрионов и являются более чувствительными к воздействию физико-химических факторов, связанных с криоконсервацией. Другим подходом для осуществления криоконсервации IVP млекопитающих является метод витрификации. Основной принцип витрификации заключается в том, что при быстром охлаждении раствора, содержащего вещества-криопротекторы в высокой концентрации, вода из жидкой фазы переходит в твёрдую без формирования кристаллов льда. Современные методы витрификации с доказанной высокой эффективностью основываются на принципе минимального охлаждаемого объема (*minimum volume cooling, MVC*), когда за счет очень маленького общего объема, меньше 0,1 мкл, эмбрионы охлаждаются и отогреваются с очень высокой скоростью.

По результатам исследований установлено, что витрифицированные IVP эмбрионы после отогревания обладают высокой жизнеспособностью в условиях *in vitro* (85-100%) и уровнем имплантации (47%), а успешность трансплантаций составляет 34%. Однако до настоящего времени метод витрификации при криоконсервации эмбрионов в технологии трансплантации эмбрионов животных сельскохозяйственных видов практически не используется. Несмотря на то, что технология криоконсервации эмбрионов путём витрификации кажется простой и не требующей специализированного оборудования, дан-

ный метод очень трудоёмок и требует быстрого и четкого выполнения всех этапов, и успех его намного больше зависит от навыков эмбриолога, чем замораживание с использованием программируемых приборов.

Чтобы повысить эффективность и исключить последствия различных процедур, таких как интрацитоплазматическая инъекция спермы, культивирование эмбрионов или криоконсервация, необходимо проводить исследования на модельных животных, направленные на совершенствование имеющихся и разработку новых подходов к выполнению этапов, связанных с манипуляциями с эмбрионами.

Кролик используется в качестве модельного организма для изучения репродукции млекопитающих уже более ста лет. Данный вид имеет ряд преимуществ: короткий срок беременности, легкость в уходе, благодаря его неагрессивному поведению, экономичному содержанию по сравнению с более крупными животными. Кроме того, кролик обладает важными репродуктивными характеристиками, такими как индуцированная овуляция. Хронология раннего эмбрионального развития сходна с человеческим эмбриогенезом. В тоже время в публикациях по витрификации эмбрионов кроликов в основном показаны результаты их трансплантации самкам-реципиентам и практически нет данных по выживаемости при культивировании их *in vitro* [7, 8], при этом криоконсервация эмбрионов методом витрификации наиболее отработана на IVP эмбрионах крупного рогатого скота, и в литературных источниках имеется богатый опыт накопленных данных [9].

Таким образом, изучение подходов и разработка протоколов криоконсервации эмбрионов на таком модельном объекте, как кролик, путем витрификации представляет несомненный и существенный исследовательский и практический интерес для использования в репродуктивных технологиях. Целью нашего исследования являлось определение влияния метода получения эмбрионов кроликов и стадии их развития на выживаемость после глубокой заморозки, а также определения оптимального протокола для витрификации эмбрионов.

#### **Материалы и методы исследования**

Исследования проводились в отделе биотехнологии ФГБНУ НИИПЗК.

Для получения эмбрионов методом *in vitro* выделяли комплекс ооцит-кумулюс (КОК) из ан-

тральных фолликулов яичников, взятых в убойном цехе, а также прижизненно после гормональной индукции фолликулогенеза у самок белый великан (n=21) методом пункции антральных фолликулов и аспирации фолликулярной жидкости [10].

Отобранные КОК ставили на созревание *in vitro* в среде TCM 199 с добавлением 20% эструс-сывороткой крови коров в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 38,5°C в течение 22–24 часов. Семя для проведения оплодотворения ооцитов методом *in vitro* и для проведения искусственного осеменения крольчих-доноров при получении эмбрионов методом *in vivo* получали на искусственную вагину от 1 самца породы калифорнийская. Оценку семени проводили под микроскопом по методике, представленной в статье [11]. В качестве разбавителя использовали коммерческую среду для семени Galap IMV. Для оплодотворения проводили совместное инкубирование ооцитов и сперматозоидов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 38,5°C в среде TALP-IVF в течение 22 часов.

Полученные зиготы освобождали от клеток кумулюса на Vortex в растворе гиалуронидазы и культивировали в средах mSOF и TCM 199 с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка в CO<sub>2</sub> инкубаторе в течение 2-3 дней.

Эмбрионы методом *in vivo* получали по следующей методике: индукцию фолликулогенеза проводили препаратом ФСГ-супер, для этого крольчихам-донорам эмбрионов породы белый великан (n=21) подкожно однократно инъецировали 66 МЕ препарата в сочетании с пролонгатором полиэтиленгликоль [12]. Для процедуры искусственного осеменения (ИО) крольчих-доноров использовали семя, полученное на искусственную вагину от одного самца породы калифорнийская. При процедуре ИО с целью индукции овуляции крольчихам-донорам внутривенно инъецировали ХГЧ в дозе 100 МЕ.

Эмбрионы извлекали по методике, представленной в исследовании [13]. С целью получения эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития, процедуры по сбору эмбрионов проводили через 20-24, 48, 60 и 72 часа после искусственного осеменения.

Оценку полученных ооцитов и эмбрионов проводили с использованием бинокулярного микроскопа Nikon SMZ-2T и МБС-10 при 150-200-кратном увеличении. Определяли следующие стадии развития эмбрионов: ранняя

морула (Мо I), поздняя морула (Мо II), ранняя бластоциста (Bl I), экспандированная бластоциста (Bl II), полностью экспонированная бластоциста (Bl III), а также качество: симметричность и целостность бластомер, целостность зоны пеллюцида, наличие включений в перивитилиновом пространстве.

Для формирования экспериментальных групп с целью проведения исследований по витрификации эмбрионов кроликов отбирали эмбрионы, находящиеся на стадии развития морулы, и ранние бластоцисты с гомогенной клеточной массой и сферическим муциновым покрытием и блестящей оболочкой. Витрификацию проводили по протоколам (табл. 1, 2).

По протоколу №1 была проведена витрификация эмбрионов кроликов, полученных методами *in vitro* и *in vivo*, находящихся на разной стадии развития:

Эмбрионы, полученные методом *in vitro*, – Группа 1.1 (Мо, *in vitro*) морулы (n=15), Группа 1.1.1 (Мо, *in vitro*) (контрольная) (n=11), Группа 1.2 (Bl, *in vitro*) бластоцисты (n=11), Группа 1.2.2 (Bl, *in vitro*) (контрольная) (n=10).

Эмбрионы, полученные методом *in vivo*, – Группа 1.3 (Мо, *in vivo*) морулы (n=23), Группа 1.3.3 (Мо, *in vivo*) (контрольная) (n=18), Группа 1.4 (Bl, *in vivo*) бластоцисты (n=21), Группа 1.4.4 (Bl, *in vivo*) (контрольная) (n=17).

Для приготовления растворов витрификации и отогревания готовили базовый раствор, состоящий из среды TLP-HEPES и 20% сыворотки крови (TH20).

Для приготовления растворов витрификации и отогревания готовили базовый раствор (БР) состоящий из среды DPBS и 0,2% БСА.

По протоколу №2 была проведена витрификация эмбрионов кроликов, полученных методами *in vitro* и *in vivo*, находящихся на разной стадии развития:

Эмбрионы, полученные методом *in vitro*, – Группа 2.1 (Мо, *in vitro*) морулы (n=13), Группа 2.1.1 (Мо, *in vitro*) (контрольная) (n=8), Группа 2.2 (Bl, *in vitro*) бластоцисты (n=10), Группа 2.2.2 (Bl, *in vitro*) (контрольная) (n=7).

Эмбрионы, полученные методом *in vivo*, – Группа 2.3 (Мо, *in vivo*) морулы (n=25), Группа 2.3.3 (Мо, *in vivo*) (контрольная) (n=15), Группа 2.4 (Bl, *in vivo*) бластоцисты (n=22), Группа 2.4.4 (Bl, *in vivo*) (контрольная) (n=16).

В качестве носителя использовали устройство для витрификации Minvitró (производство

**Таблица 1. Протокол № 1[6]**  
**Table 1. Protocol № 1[6]**

Этап/Stage	Раствор/Solution	Действие/Action
Витрификация/Vitrification		
Эквилибрация/ Equilibration	ТН20 с добавлением 7,5% этиленгликоля (EG) и 7,5% DMSO.	Экспозиция 3-5 минут
Витрификация/ Vitrification	ТН20 с добавлением 15% EG, 15% DMSO и 0,5 М сахарозы.	Экспозиция 20-30 секунд
Отогревание, Warming		
Отогревание/ Warming	ТН20 + 1 М р-р сахарозы	Быстро извлечь из жидкого азота и выдержать 1 минуту, 39°C
Разбавление 1 ст./ Dilution 1 st.	ТН20, содержащая 0,5 М р-р сахарозы	Экспозиция 3-5 минут
Разбавление 2 ст./ Dilution 2 st.	ТН20, содержащая 0,25 М р-р сахарозы	Экспозиция 3-5 минут
Отмывание/ Washing	Базовая среда ТН20	Экспозиция 3-5 минут

**Таблица 2. Протокол № 2 [8]**  
**Table 2. Protocol no. 2 [8]**

Этап/Stage	Раствор/Solution	Действие/Action
Витрификация/Vitrification		
Эквилибрация/ Equilibration	БР + 10% этиленгликоля (EG) + 10% DMSO.	Экспозиция 2 минуты
Витрификация/ Vitrification	БР + 20% EG + 20% DMSO	Экспозиция 1 минута
Отогревание, Warming		
Отогревание/Warming	Выдерживали носитель в парах жидкого азота до образования молочного вида, затем помещали в водяную баню 20°C на 10 сек.	
Разбавление 1 ст./ Dilution 1 st.	БР+ 0,33 М р-р сахарозы	Экспозиция 5 минут
Отмывание/ Washing	Базовый раствор	Экспозиция 5 минут

Китай). Данное устройство является аналогом устройства Cryotop® Kitazato Biopharma Co. Ltd. После отогревания проводили культивирование эмбрионов в течение 24-48 часов в среде для культивирования 199 (ТСМ199) + 10% эмбриональной бычьей сыворотки с добавлением антибиотиков (100 МЕ/мл пенициллина и 0,01 мг/мл стрептомицина) при 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub>. Регистрировали способность эмбрионов к развитию *in vitro* до следующих стадий и выхода из блестящей оболочки. В качестве контроля использовали эмбри-

оны, находящиеся на таких же стадиях развития, не подвергавшиеся витрификации.

Для проведения сравнения по показателям выживаемости и способности к дальнейшему развитию после процедуры витрификации-отогревания эмбрионов крупного рогатого скота с эмбрионами кроликов использовали ранее полученные нами данные по витрификации IVP эмбрионов крупного рогатого скота [6].

Для сравнения уровня выживаемости и выхода из блестящей оболочки статистическую



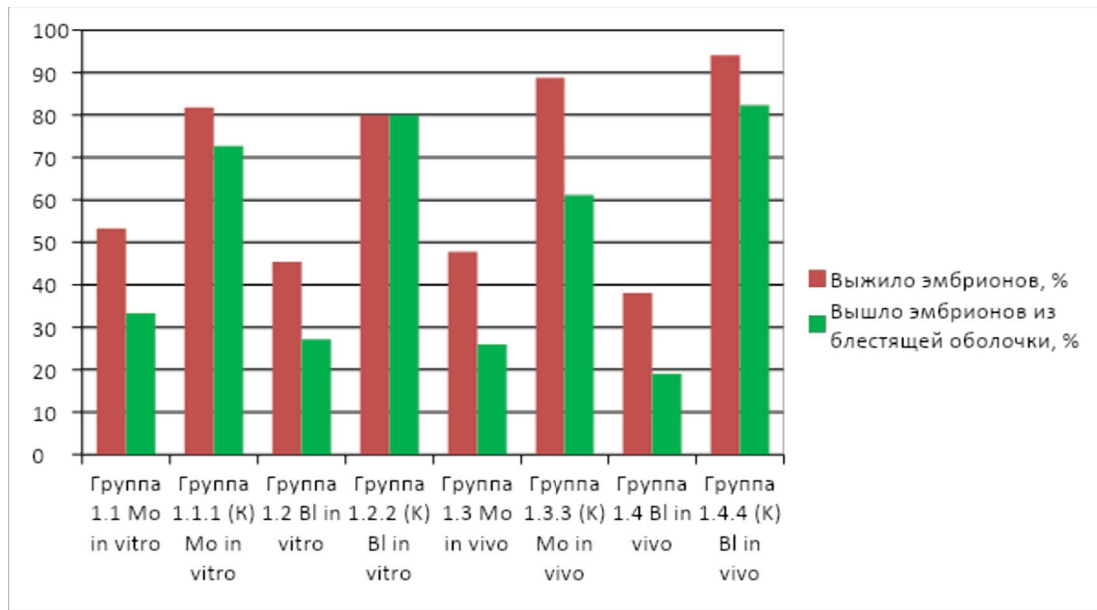
обработку полученных данных проводили с использованием точного критерия Фишера ( $\chi^2$ , Пирсона).

### Результаты исследований

В соответствии с поставленными задачами были проведены процедуры криоконсервации эмбрионов кроликов, находящихся на стадиях развития морула и бластоциста и полученных ме-

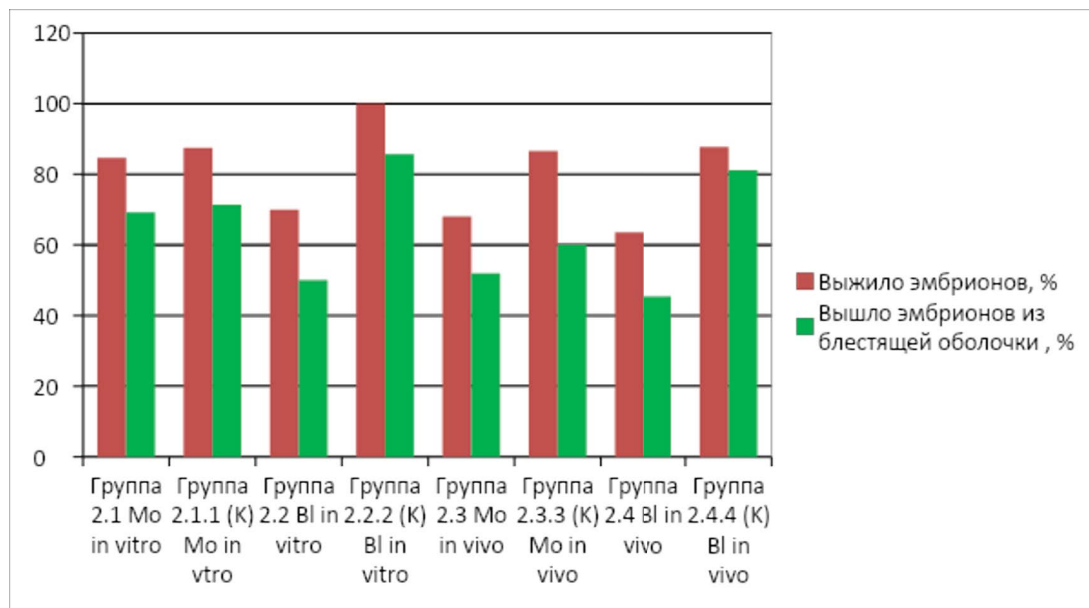
тодами *in vitro* и *in vivo*, по двум протоколам витрификации и отогревания. Результаты проведенных исследований представлены в таблице № 3 и на рисунках 1 и 2.

Как видно из представленных результатов, по протоколу № 1 было витрифицировано 15 морул, полученных методом *in vitro*. После отогревания в период 24-48 часов выжило 8 эмбрионов, что составило 53,3%, и вышло из блестящей обо-



**Рисунок 1.** Результаты витрификации и культивирования эмбрионов кроликов после отогревания по протоколу №1

**Figure 1.** Results of vitrification and culturing of rabbit embryos after rewarming according to protocol №1



**Рисунок 2.** Результаты витрификации и культивирования эмбрионов кроликов после отогревания по протоколу №2

**Figure 2.** Results of vitrification and culturing of rabbit embryos after rewarming according to protocol №2

**Таблица 3. Результаты культивирования витрифицированных эмбрионов после отогревания**

**Table 3. Cultivation results of vitrified embryos after warming**

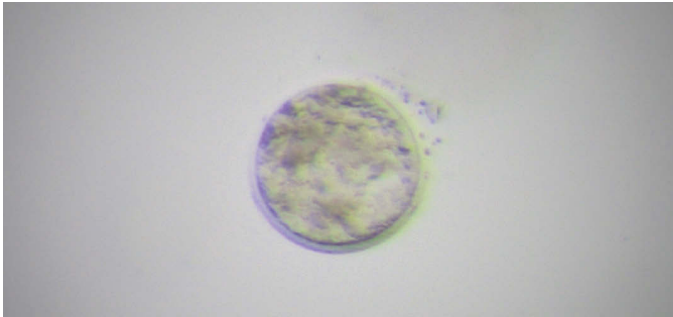
Группа/Group	Витрифицировано эмбрионов, шт./ Vitrified embryos, pcs	Культивирование эмбрионов после отогревания/ Cultivation of embryos after warming	
		24 – 48 часов/ 24-48 h	
		Выжило шт. (%) / Survived pcs (%)	Вышло из блестящей оболочки шт. (%) / Out of zona pellucida pcs (%)
Протокол № 1/ Protocol №1			
Группа 1.1 (Mo, <i>in vitro</i> )	15	8 (53,3)*	5 (33,3)*
Группа 1.1.1 (Mo, <i>in vitro</i> ) (контрольная)	11	9 (81,8)	8 (72,7)
Группа 1.2 (Bl, <i>in vitro</i> )	11	5 (45,4)*	3 (27,2)*
Группа 1.2.2 (Bl, <i>in vitro</i> ) (контрольная)	10	8 (80,0)	8 (80,0)
Группа 1.3 (Mo, <i>in vivo</i> )	23	11 (47,8)*	6 (26,0)*
Группа 1.3.3 (Mo, <i>in vivo</i> ) (контрольная)	18	16 (88,8)	11 (61,1)
Группа 1.4 (Bl, <i>in vivo</i> )	21	8 (38,0)*	4 (19,0)*
Группа 1.4.4 (Bl, <i>in vivo</i> ) (контрольная)	17	16 (94,1)	14 (82,3)
Протокол № 2/ Protocol №2			
Группа 2.1 (Mo, <i>in vitro</i> )	13	11 (84,6)*	9 (69,2) *
Группа 2.1.1 (Mo, <i>in vitro</i> ) (контрольная)	8	7 (87,5)	5 (71,4)
Группа 2.2 (Bl, <i>in vitro</i> )	10	7 (70,0)*	5 (50,0)*
Группа 2.2.2 (Bl, <i>in vitro</i> ) (контрольная)	7	7 (100)	6 (85,7)
Группа 2.3 (Mo, <i>in vivo</i> )	25	17 (68,0)*	13 (52,0)*
Группа 2.3.3 (Mo, <i>in vivo</i> ) (контрольная)	15	13 (86,6)	9 (60,0)
Группа 2.4 (Bl, <i>in vivo</i> )	22	14 (63,6)*	10 (45,4)*
Группа 2.4.4 (Bl, <i>in vivo</i> ) (контрольная)	16	14 (87,7)	13 (81,2)

\* p<0,05

лочки 5 морул, или 33,3% от общего количества от замороженных, при этом 8 морул в контрольной группе достигли стадии выхода из блестящей оболочки, что составило 72,0% от первоначального количества эмбрионов, поставленных на культивирование.

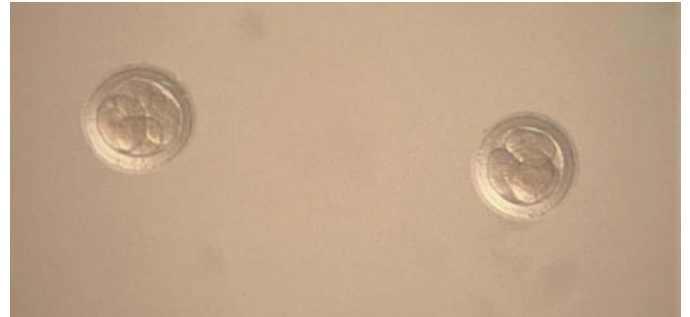
Таким образом, полученные данные демонстрируют, что относительное количество морул, полученных методом *in vitro*, замороженных по протоколу № 1, вышедших из блестящей оболочки, 33,3%, при этом в группе 1.3, где витрифицировали морулы, полученные методом *in vivo*, данный показатель составил 26,6%. Бластоцисты, полученные методом *in vitro*, витрифицированные по протоколу № 1, достигли стадии выхода из блестящей оболочки в 27,2% от количества

замороженных в группе 1.2, и в группе 1.4 стадии выхода из блестящей оболочки достигли 19,0% бластоцист, полученных методом *in vivo*. В тоже время, находящиеся на стадии морулы и бластоциста эмбрионы, замороженные по протоколу № 2, также достигли стадии выхода из блестящей оболочки в большем относительном количестве в группе, где витрификации подвергались эмбрионы, полученные методом *in vitro*: в группе 2.1 из блестящей оболочки вышло 69,2% от количества замороженных эмбрионов, в группе 2.3 52% морул, полученных методом *in vivo*, достигли стадии выхода из блестящей оболочки. В группе 2.2, где витрификации подвергались бластоцисты кролика, полученные методом *in vitro*, стадии выхода из блестящей оболочки достигли 50% замо-



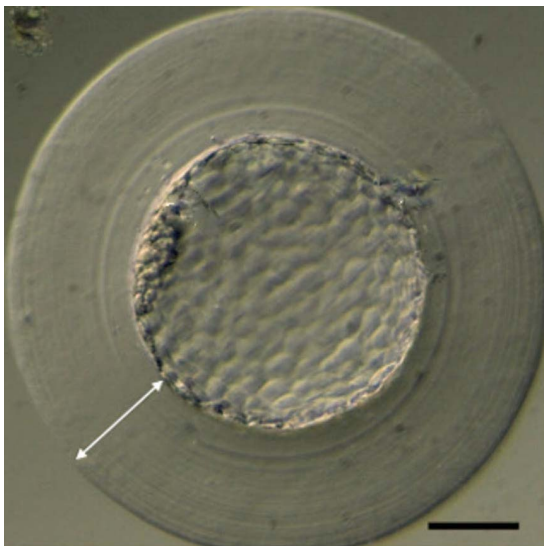
**Рисунок 3.** Бластоциста кролика, полученная *in vitro*. Шкала равна 100  $\mu\text{m}$

**Figure 3.** Rabbit blastocyst obtained *in vitro*. The scale is 100  $\mu\text{m}$



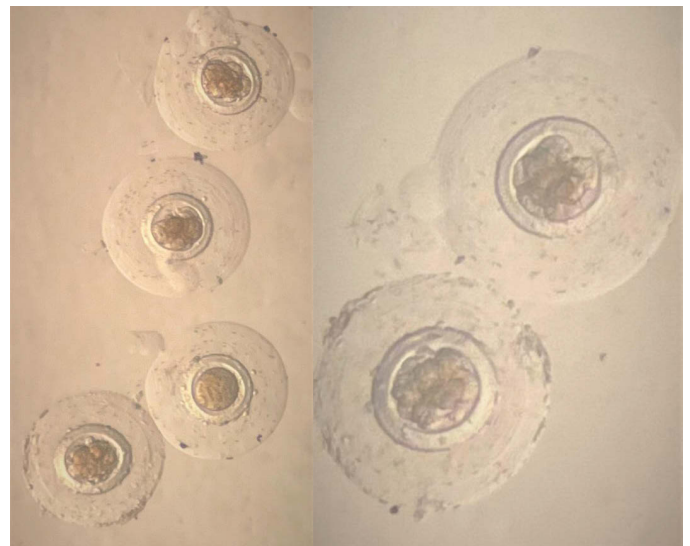
**Рисунок 4.** Морулы кролика, полученные *in vitro*. Шкала равна 100  $\mu\text{m}$

**Figure 4.** Rabbit morulae obtained *in vitro*. The scale is 100  $\mu\text{m}$



**Рисунок 5.** Бластоциста кролика, полученная *in vivo*, стрелкой обозначена муциновая оболочка, шкала равна 50  $\mu\text{m}$  [8]

**Figure 5.** Rabbit blastocyst obtained *in vivo*. The arrow marks the mucin membrane. The scale is 50  $\mu\text{m}$



**Рисунок 6.** Морулы кролика, полученные *in vivo*, стрелочкой обозначена муциновая оболочка, шкала равна 50  $\mu\text{m}$

**Figure 6.** Rabbit morulae obtained *in vivo*, arrow indicates mucin membrane, scale is 50  $\mu\text{m}$

рожденных эмбрионов, в группе 2.4 стадии выхода из блестящей оболочки достигли 45,4% blastocyst, полученных методом *in vivo*.

При статистической обработке полученных данных с использованием точного критерия Фишера было установлено, что относительное количество выживших морул было статистически значимо больше, чем blastocyst как внутри одного протокола, так и при сравнении между используемыми протоколами.

Таким образом, основываясь на полученных данных можно предположить, что эмбрионы кроликов, находящиеся на более ранних стадиях развития (морулы), обладают более высокой адаптационной возможностью к дальнейшему развитию после воздействия физико-химических факторов при процедуре витрификации и отогревания. Как отмечалось в исследовании [8], такие адаптационные свойства присущи эмбрионам за счет их биологической пластичности, и, по-видимому, у эмбрионов, находящихся на стадии морулы, имеется больше возможности к адаптации и аутокоррекции дальнейшего развития после агрессивного воздействия внешних факторов, чем у эмбрионов, находящихся на стадии blastocysta.

Также показатели выживаемости и развития до следующих стадий у эмбрионов, полученных методом *in vitro* (рис. 3, 4), были выше, чем у эмбрионов, полученных методом *in vivo* (рис. 5, 6).

Эмбрионы кроликов, полученные методом *in vivo*, отличаются от эмбрионов, полученных методом *in vitro*, наличием муциновой оболочки, которая образуется в результате продвижения эмбрионов кроликов по яйцеводу крольчихи и играет важную роль при имплантации [14]. Известно, что муцин – это кислый мукополисахарид, который высвобождается из канальцев эпителия яйцеводов самки после овуляции и обеспечивает преждевременное расширение blastocysta до выхода из блестящей оболочки. Поэтому очень важно учитывать данный фактор при подготовке крольчих-реципиентов к трансплантации. Как показывают многочисленные исследования [15], а также полученные нами данные, представленные в отчете 2021 года, что наступление сукрольности при пересадке IVP эмбрионов кроликов, находящихся на стадии развития морулы и трансплантированных в яйцеводы самкам-реципиентам, отмечалось в 72% случаев, тогда как при трансплантации IVP эмбрионов, находящихся на стадии blastocysta, сукрольность отмечалась только в 46% случаев. Таким образом, можно сделать предположение,

что муциновая оболочка у эмбрионов кроликов, полученных методом *in vivo*, снижала проницаемость и насыщение эмбрионов растворами для эквilibрации и витрификации, тем самым оказывая влияние на их подготовку к воздействию низких температур при процедуре витрификации.

### Заключение

Таким образом, на выживание и способность к развитию до следующих стадий эмбрионов, подвергшихся витрификации, оказывают влияние способ получения эмбрионов, стадия развития эмбрионов, а также протокол витрификации. По полученным нами данным из апробированных протоколов витрификации для эмбрионов кроликов лучше подходит протокол № 2, в котором базовый раствор для приготовления сред эквilibрации и витрификации готовили на основе среды DPBS и 0,2% БСА.

### Список использованных источников

1. Fleming, T.P., Velazquez, M.A., Eckert, J.J. Embryos, DOHaD and David Barker. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 6 (5), 377-83 (2015).
2. Sparks, A.E. Human embryo cryopreservation-methods, timing, and other considerations for optimizing an embryo cryopreservation program. *Seminars in Reproductive Medicine*. 33 (2), 128-44 (2015).
3. Swain, J.E. Optimal human embryo culture. *Seminars in Reproductive Medicine*. 33 (2), 103-17 (2015).
4. Заикина Е.В., Гончарова А.С., Позднякова В.В., Пандова О.В., Пржедецкий Ю.В., Воловик В.Г., Карасев Т.С. Обзор современных методов криоконсервации различных видов биологического материала // *Современные проблемы науки и образования*. – 2022. – № 4.
5. Трансплантация эмбрионов-2020. *In vivo: итоги года* [Электронный ресурс], <https://dairynews.today/news/transplantatsiya-embrionov-2020-1-in-vivo-itogi-go.html>
6. Маленко Г.П., Корниенко Е.В., Романова А.Б., Косовский Г.Ю. Витрификация полученных *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота в триацетат-целлюлозных полых волокнах и на носителях открытого типа // *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2016. №4.
7. Marco-Jiménez, F., Baselga, M., & Vicente, J. S. (2018). Successful re-establishment of a rabbit population from embryos vitrified 15 years ago: The importance of biobanks in livestock conservation. *PLoS one*, 13(6), e0199234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199234> Garcia-Dominguez, X., Marco-Jimenez, F., Viudes-de-Castro, M. P., & Vicente, J. S. (2019). Minimally Invasive Embryo Transfer and Embryo Vitrification at the Optimal Embryo Stage in Rabbit Model. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (147), 10.3791/58055. <https://doi.org/10.3791/58055> Dujičková, Linda, Alexander V. Makarevich, Lucia Olexiková, Elena Kubovičová, and František Strejček. "Methodological Approaches



- for Vitrification of Bovine Oocytes.” *Zygote* 29, no. 1 (2021): 1–11. doi:10.1017/S0967199420000465 Попов Д.В., Колесник Е.С., Кашапова И.С., Косовский Г.Ю. Подходы к получению ооцитов от крольчих и самок норок Кролиководство и звероводство. 2020. № 4. С. 3-8.
8. Карелина Т.К., Попов Д.В., Стрельцова Е.А., Прохоренко Т.В. Оценка самцов создаваемого внутривидового типа кроликов породы белый великан оценка самцов кроликов породы белый великан. Кролиководство и звероводство. 2020. № 6. С. 30-38.
9. Попов Д.В., Максудов Г.Ю., Шипова С.П., Косовский Г.Ю. Индукция суперовуляции у крольчих гипофизарными гонадотропинами Кролиководство и звероводство. 2018. № 5. С. 10-15.
10. Попов Д.В., Максудов Г.Ю., Шипова С.П., Виноградова Е.В., Косовский Г.Ю. Характеристики эмбрионов, полученных от крольчих при различных способах индукции суперовуляции Кролиководство и звероводство. 2018. № 6. С. 9-15.
11. Mocé, M. L., Blasco, A., & Santacreu, M. A. (2010). *In vivo* development of vitrified rabbit embryos: effects on prenatal survival and placental development *Theriogenology*, 73(5), 704-710 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.010> Joung, S. Y., Kim, H. J., Choi, W. S., Im, K. S., Lee, S. H., Park, C. S., & Jin, D. I. (2004). Effects of transferring *in vitro*-cultured rabbit embryos to recipient oviducts on mucin coat deposition, implantation and development. *Zygote (Cambridge, England)*, 12(3), 215–219. <https://doi.org/10.1017/s0967199404002795>

### Информация об авторах:

**Попов Дмитрий Владимирович** – к.б.н., ведущий науч. сотр., заведующий отделом биотехнологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева (ФГБНУ НИИПЗК), ORCID 0000-0001-7422-5470, SPIN-код 3657-4880, [popov.bio@gmail.com](mailto:popov.bio@gmail.com)

**Колесник Елена Сергеевна** – Мл. науч. сотр. ФГБНУ Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева (ФГБНУ НИИПЗК) SPIN-код 3533-3806, ORCID: 0000-0002-2465-7184, e-mail: [elena.rainis.lis@yandex.ru](mailto:elena.rainis.lis@yandex.ru)

**Ермакова Елизавета Андреевна** – лаборант ФГБНУ НИИПЗК, SPIN-код 7322-2533, ORCID: 0000-0003-4858-9558, e-mail: [ermakovaelizz@gmail.com](mailto:ermakovaelizz@gmail.com)

**Таргош Полина Геннадьевна** – лаборант ФГБНУ НИИПЗК, ORCID: 0000-0002-5717-5843, e-mail: [targosh.polinal@gmail.com](mailto:targosh.polinal@gmail.com)

**Косовский Глеб Юрьевич** – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник, директор, ORCID – 0000-0003-3808-3086, Author ID – 353097, e-mail: [niipzk@mail.ru](mailto:niipzk@mail.ru)

## APPROACHES TO THE CRYOPRESERVATION OF RABBIT EMBRYOS BY VITRIFICATION

*Vitrification of rabbit embryos*

**D.V. Popov<sup>1\*</sup>, E.S. Kolesnik<sup>1</sup>, E.A. Ermakova<sup>1</sup>, P.G. Targosh<sup>1</sup>, G.Yu.Kosovsky<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Federal State Budget Scientific Institute “Scientific Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding named after V.A. Afanas`ev”*

*Russia, 140143, Moscow Region, Ramensky District, Rodniki, Trudovaya Str., 6.* <sup>2</sup>*Federal State Budgetary*

*\*e-mail: [popov.bio@gmail.com](mailto:popov.bio@gmail.com)*

Cryopreservation of mammalian embryos involves programmed freezing, which is based on a slow temperature drop and requires specialized equipment, and vitrification, which is based on the principle of minimal refrigerated volume, where embryos are cooled and warmed at a very high rate due to a volume of less than 0.1 µl. In this study, we compared the survival and developmental ability of rabbit embryos after the vitrification-warming procedure. For this purpose, embryos at the morula and blastocyst stages of development and obtained by in

in vitro and in vivo methods from 21 female rabbits of the White giant breed were subjected to vitrification and heating according to two protocols with different exposure modes and composition of the basic solutions: 1) TLP-HEPES + 20% serum (TH20) and 2) DPBS + 0.2% BSA. The culturing results showed that the survival rate of embryos after the vitrification and warming procedure was: for protocol #1 Morula in vitro, 53.3%, Blastocysts in vitro, 45.4%, Morula in vivo, 47.8%, and Blastocysts in vivo, 38.0%; for protocol #2 Morula in vitro, 84.6%, Blastocysts in vitro, 70.0%, Morula in vivo, 68.0%, and Blastocysts in vivo, 63.6%. It was found that the survival rate of rabbit embryos after vitrification depended on the method of embryo acquisition and stage of development, and that Protocol #2 was better suited for vitrification of rabbit embryos. Thus, for cryopreservation by vitrification of rabbit embryos, it is recommended to use embryos at the developmental stage of morula and to use protocol № 2 with the composition of base solutions DPBS + 0.2% BSA.

**Keywords:** rabbit, embryos, morula, blastocyst, vitrification, cryopreservation

## References

- Fleming, T.P., Velazquez, M.A., Eckert, J.J. Embryos, DOHaD and David Barker. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 6 (5), 377-83 (2015).
- Sparks, A.E.. Human embryo cryopreservation-methods, timing, and other considerations for optimizing an embryo cryopreservation program. *Seminars in Reproductive Medicine*. 33 (2), 128-44 (2015).
- Swain, J.E.. Optimal human embryo culture. *Seminars in Reproductive Medicine*. 33 (2), 103-17 (2015).
- Zaikina E.V., Goncharova A.S., Pozdnyakova V.V., Pandova O.V., Przhedetsky E.V., Volovik V.G., Karasev T.S. Review of modern methods of cryopreservation of various types of biological material // *Modern problems of science and education*. – 2022. – № 4.
- Embryo-transplantation-2020. In vivo: the results of the year [Electronic resource], <https://dairynews.today/news/transplantatsiya-embrionov-2020-1-in-vivo-itogi-go.html>
- Malenko G.P., Kornienko E.V., Romanova A.B., Kosovsky G.Y. Vitrification of cattle embryos obtained in vitro in triacetate-cellulose hollow fibers and on open type carriers // *Problems of Biology of productive animals*. 2016. №4.
- Marco-Jiménez, F., Baselga, M., & Vicente, J. S. (2018). Successful re-establishment of a rabbit population from embryos vitrified 15 years ago: The importance of biobanks in livestock conservation. *PloS one*, 13(6), e0199234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199234>
- García-Domínguez, X., Marco-Jimenez, F., Viudes-de-Castro, M. P., & Vicente, J. S. (2019). Minimally Invasive Embryo Transfer and Embryo Vitrification at the Optimal Embryo Stage in Rabbit Model. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (147), 10.3791/58055. <https://doi.org/10.3791/58055>
- Dujičková, Linda, Alexander V. Makarevich, Lucia Olexiková, Elena Kubovičová, and František Strojček. "Methodological Approaches for Vitrification of Bovine Oocytes." *Zygote* 29, no. 1 (2021): 1-11. doi:10.1017/S0967199420000465
- Popov D.V., Kolesnik E.S., Kashapova I.S., Kosovsky G.U. Approaches to obtaining oocytes from rabbits and mink. 2020. № 4. C. 3-8.
- Karelin T.K., Popov D.V., Streltsova E.A., Prokhorenko T.V. Evaluation of males of the created inbreed type of rabbits of the white giant breed. *Krolikovodstvo i zverovodstvo*, 2020. № 6. C. 30-38.
- Popov D.V., Maksudov G.Y., Shipova S.P., Kosovsky G.Y. Induction of superovulation in rabbits by hypophysial gonadotropins. *Rabbit and fur farming*. 2018. № 5. C. 10-15.
- Popov D.V., Maksudov G.Y., Shipova S.P., Vinogradova E.V., Kosovsky G.Y. Characteristics of embryos obtained from rabbits with different methods of superovulation induction. *Krolikovodstvo i zverovodstvo*, 2018. № 6. C. 9-15.
- Mocé, M. L., Blasco, A., & Santacreu, M. A. (2010). In vivo development of vitrified rabbit embryos: effects on prenatal survival and placental development *Theriogenology*, 73(5), 704710 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.010>
- Joung, S. Y., Kim, H. J., Choi, W. S., Im, K. S., Lee, S. H., Park, C. S., & Jin, D. I. (2004). Effects of transferring in vitro-cultured rabbit embryos to recipient oviducts on mucin coat deposition, implantation and development. *Zygote (Cambridge, England)*, 12(3), 215-219. <https://doi.org/10.1017/s0967199404002795>.

## Information about the authors:

**Dmitry V. Popov** – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Head of Biotechnology Department, Afanas`ev Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, ORCID 0000-0001-7422-5470, SPIN-code 3657-4880, [popov.bio@gmail.com](mailto:popov.bio@gmail.com)

**Elena S. Kolesnik** – Junior Researcher, Afanas`ev Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, SPIN-code 3533-3806, ORCID: 0000-0002-2465-7184, e-mail: [elena.rainis.lis@yandex.ru](mailto:elena.rainis.lis@yandex.ru)

**Elizaveta A. Ermakova** – laboratory assistant, Afanas`ev Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, SPIN-code 7322-2533, ORCID: 0000-0003-4858-9558, e-mail: [ermakovaelizz@gmail.com](mailto:ermakovaelizz@gmail.com)

**Polina G. Targosh** – laboratory assistant, Afanas`ev Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, ORCID: 0000-0002-5717-5843, e-mail: [targosh.polina1@gmail.com](mailto:targosh.polina1@gmail.com)

**Gleb Y. Kosovsky** – Doctor of Biological Sciences, RAS corresponding member, Chief Researcher, Head of Afanas`ev Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, ORCID – 0000-0003-3808-3086, Author ID – 353097, e-mail: [niipzk@mail.ru](mailto:niipzk@mail.ru)