

ВПЛИВ РІЗНИХ ШВИДКОСТЕЙ ЗАМОРОЖУВАННЯ НА ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ООЦИТІВ КОРОВИ

А. С. Саліна, П. А. Троцький¹, О. Е. Гузеватий², Л. В. Горбунов,
К. Г. Лісіна, М. Д. Безуглий²

Інститут тваринництва УААН, м. Харків

¹Інститут розведення і генетики тварин УААН, м. Київ

²Українська академія аграрних наук, м. Київ

Проведено дослідження впливу різних швидкостей заморожування-відтаювання на життєздатність деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів корови. Встановлено, що збереженість ооцитів корови після заморожування з повільними, високими та надвисокими швидкостями теплообміну становить $11,4 \pm 5,4$ % ($n=3/40$), $6,7 \pm 3,2$ % ($n=4/60$), $14,0 \pm 4,9$ % ($n=7/50$), відповідно.

Ключові слова: КРІОКОНСЕРВУВАННЯ, ООЦИТИ, ПОВІЛЬНІ, ВИСОКІ ТА НАДВИСОКІ ШВИДКОСТІ, ЕКВІЛІБРУЮЧИЙ ТА ВІТРИФІКУЮЧИЙ РОЗЧИНИ, КРІОПРОТЕКТОР

Нині застосування біотехнологічних методів в селекції і відтворенні сільськогосподарських тварин є ключовим фактором підвищення їх ефективності. Досягнуті за останні десятиріччя успіхи в галузі біології розмноження сільськогосподарських тварин значно розширили можливості регулювання відтворювальної функції у тварин біотехнологічними методами, відкрили великі можливості зберігання та практичного використання їх репродуктивних клітин і ембріонів [1–4].

Розробка нових та удосконалення існуючих методів низькотемпературного зберігання гамет та ембріонів розширює можливості їх використання для подальших біотехнологічних маніпуляцій з клітинами, дає змогу відчутно зменшити витрати на отримання ембріонів в умовах *in vitro* та сприяє розв'язанню цілої низки наукових проблем. У цьому контексті актуальним є удосконалення способу заморожування ооцитів корови. При вирішенні цієї проблеми важливе значення має проведення порівняльного аналізу існуючого різноманіття методів кріоконсервування генетичного матеріалу, в основі яких лежать застосування повільних, високих та надвисоких швидкостей заморожування [5–7]. Метою даної роботи було проведення порівняльного аналізу ефективності заморожування ооцитів корови з повільними, високими та надвисокими швидкостями теплообміну.

Матеріали і методи

Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулясні комплекси корови. Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів та вимивання середовищем Дюльбекко. Відібрані пастерівською піпеткою клітини оцінювали за морфологічними ознаками під мікроскопом. Для заморожування використовували ооцити з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом [8].

При заморожуванні з повільною швидкістю застосовували кріозахисне середовище, що містило 1,5 М етиленгліколю. Термін витримки у ньому гамет корови складав 10 хвилин, а в якості контейнера для їх заморожування використовували пробірки Уленгута ($V=0,75$ мл). Кріоконсервування ооцитів з повільною перемінною швидкістю здійснювали у пристрої, дія якого ґрунтується на пасивному охолодженні термоблоку у горловині посудини Дьюара Х-34 ($\bar{v} = 0,3$ °C/хв.) [5]. Заморожування ооцитів корови з повільною постійною швидкістю здійснювали у пристрої ЗЕМ-4. Для заморожування ооцит-кумулясних комплексів з високою швидкістю застосовували еквілібуючий (10 % етиленгліколю) і вітрифікуючий (40 % етиленгліколю та 0,5 М сахарози) розчини. Всі розчини були виготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20 % попередньо

інактивованої (56 °С, 30 хв) фетальної сироватки корів. Гамети корів було розподілено на чотири експериментальні групи: в першій — термін попередньої експозиції ооцитів у еквіліруючому розчині складав 15 хв, у другій — 10 хв, у третій — 5 хв, у четвертій — 0 хв. Тривалість експозиції ооцитів у вітрифікуючому розчині для усіх дослідних груп складала 30 секунд. Як контейнер для заморожування використовували французьку соломинку (d=2 мм), заморожування проводили шляхом безпосереднього занурення капіляра з ооцитом у рідкий азот, швидкість охолодження при цьому складала $v \approx 2 \cdot 10^3$ °С/хв. Контейнером для заморожування ооцитів з надвисокою швидкістю була соломинка з зовнішнім діаметром 1,0 мм. Розрахункова концентрація вітрифікуючого розчину при надвисокій швидкості становила 50 % гліцерину з сахарозою у співвідношенні 3:2 [9]. В ході дослідів загальну концентрацію вітрифікуючого розчину змінювали у бік збільшення, або зменшення на 10, 20, 30 % від початкової. Також в складі вітрифікуючого розчину застосовували такі кріопротектори, як етиленгліколь з сахарозою. Загальна розрахункова концентрація такого розчину становила 53 % у співвідношенні 2:1, яку під час роботи збільшували або зменшували на 5, 10, 15 %. Швидкість охолодження становила $v \approx 6 \cdot 10^3$ °С/хв.

Відтавання біооб'єкту проводили у водяній бані при температурі 40 °С з активним перемішуванням магнітною мішалкою. Швидкість відтавання $v \approx 7,5 \cdot 10^3$ °С/хв. [10, 11].

Усі маніпуляції з гаметами корів проводили при кімнатній температурі. Збереженість деконсервованих ооцитів визначали за морфологічними ознаками та результатами культивування і запліднення *in vitro*. Ооцити корови культивували протягом 27 год при температурі 38,5 °С, 5 % CO₂ у повітрі, в краплях середовища 199 з 10 % попередньо інактивованої сироватки корів, 2,5 мкг/мл ФСГ, 1,0 мкг/мл естрадіолу, 2,5 МОд/мл ЛГ, 2,0 мМ натрія пірувату, 2,92 мМ кальція пірувату, 40 мг/мл гентаміцину [12]. Для запліднення *in vitro* використовували заморожену сперму бугая, капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J.J. et al. [13]. Спільне інкубування гамет самців і самиць проводили в краплях середовища Fert.-TALP, потім яйцеклітини і зиготи переносили для подальшого культивування протягом 96 годин в краплі середовища CDM. Цитогенетичні препарати ооцитів готували за методом А. К. Tarcowski [14], ембріонів — за методом М. Ushijima [15], забарвлювали 10 % розчином Гімза та досліджували під мікроскопом. Результати експериментальних досліджень опрацьовували статистично за загальноприйнятими методами.

Результати й обговорення

У таблиці 1 наведено результати експериментальних досліджень, одержаних при застосуванні повільної швидкості охолодження при заморожуванні гамет корови. Аналіз деконсервованих ооцитів корови за морфологічними показниками показав, що збереженість гамет в групах 1 і 2 (заморожених, відповідно, з постійною та перемінною повільною швидкостями) становила 67,5±7,4 % (n=27/40) та 74,3±7,4 % (n=26/35), відповідно. При подальшому дозріванні поза організмом деконсервованих ооцитів, їх заплідненні *in vitro* та наступному культивуванні протягом 96-ти год виявили різний рівень збереженості (отримання 16-ти бластомерних зародків великої рогатої худоби) в групах 1 і 2 відповідно: 7,5±4,2 %, (n=3/40) та 11,4±5,4 %, (n=4/35), тоді як у контрольній групі цей показник становив S=20,0±6,8 %, (n=7/35).

Таблиця 1

Збереженість та подальший розвиток деконсервованих ооцитів корів, з аморожених з повільною швидкістю охолодження

№ групи	Кількість нативних ооцитів, n	Швидкість заморожування	Збереженість деконсервованих ооцитів, % (n)	Кількість запліднених <i>in vitro</i> яйцеклітин, % (n)	Розвиток зародків до стадії 16-ти бластомерів, % (n)
1	40	$v = \text{const}$	67,5±7,4 ^a (27)	25,0±6,8 ^a (10)	7,5±4,2 ^a (3)
2	35	$v \neq \text{const}$	74,3±7,4 ^a (26)	28,6±7,6 ^a (10)	11,4±5,4 ^a (4)
3	35	—	Контроль	62,9±8,2 ^b (22)	20,0±6,8 ^a (7)

Примітка: $v = \text{const}$ — постійна швидкість охолодження, $v = 0,3$ °C/хв.; $v \neq \text{const}$ — перемінна швидкість охолодження, $\bar{v} = 0,3$ °C/хв.

Таким чином, отримані дані свідчать, про те що застосування повільної перемінної швидкості дозволяє підвищити рівень збереженості та подальший розвиток в умовах *in vitro* деконсервованих ооцитів корів в порівнянні з використанням повільної постійної швидкості.

Результати досліджень, одержані при застосуванні високої швидкості охолодження та різного терміну попередньої обробки гамет еквіліруючим розчином представлено на рисунку 1.

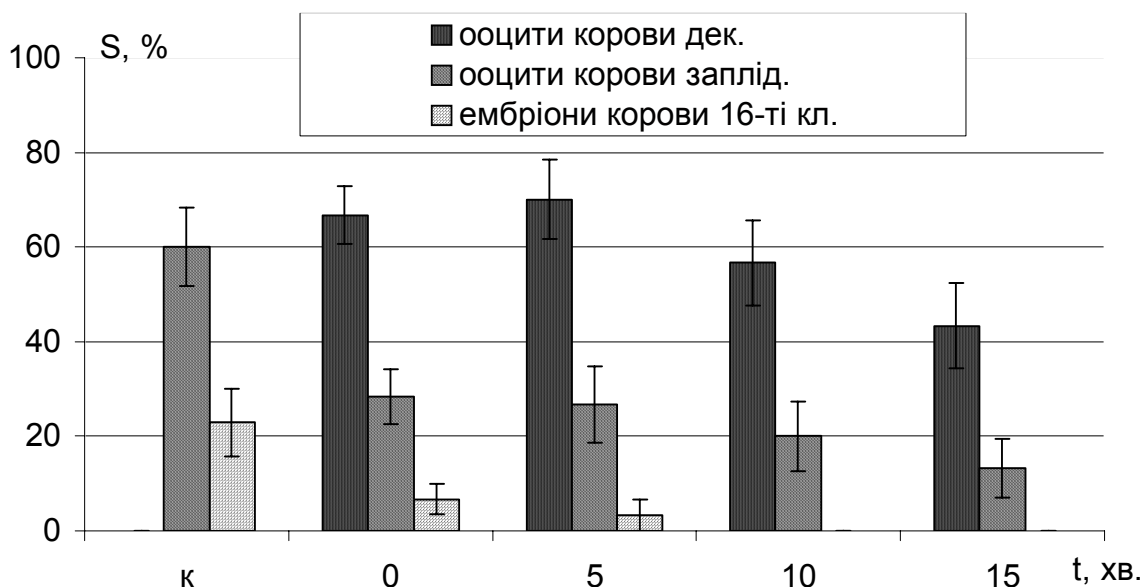


Рис.1. Збереженість деконсервованих ооцитів корови, заморожених після різної тривалості витримки в еквіліруючому розчині кріопротектора, при високій швидкості теплообміну

З рисунка 1 видно, що у дослідних групах після попередньої обробки гамет корів еквілібраційним розчином протягом 15, 10, 5, 0 хв збереженість ооцитів за морфологічними ознаками після заморожування–відтавання становила $43,3 \pm 9,0$ % ($n=13/30$); $56,7 \pm 9,0$ % ($n=17/30$); $70,0 \pm 8,4$ % ($n=21/30$); $66,7 \pm 6,1$ % ($n=40/60$), відповідно. Але після запліднення та подальшого культивування в умовах *in vitro* деконсервованих ооцитів корови спостерігали зниження їх збереженості в усіх дослідних групах. У групі з часом витримки 15 хв відбулося тільки запліднення без подальшого розвитку, а при експозиції 5 і 0 хв спостерігали дроблення до стадії 16-ти клітин. Зменшення збереженості ооцитів у групі з часом витримки у еквіліруючому розчині 15 хв можна пояснити тривалою взаємодією клітин і кріопротектора, внаслідок чого можливі осмотичні і токсичні порушення в ооцитах. Отже, встановлено, що скорочення часу попередньої витримки ооцитів корови в еквіліруючому розчині кріопротектору суттєво не знижує рівень їх збереженості заморожування–відтавання.

Проведено заморожування ооцитів корови з використанням різних концентрацій вітрифікуючого розчину гліцерину та сахарози, при надвисокій швидкості заморожування–відтавання, результати якого наведені в таблиці 2. З них видно, що максимальну кількість

Таблиця 2

Збереженість деконсервованих ооцитів корови, заморожених при використанні різних концентрацій вітрифікуючого розчину кріопротекторів гліцерину і сахарози при надвисокій швидкості теплообміну

№ групи	Кількість нативних ооцитів, n	Концентрація вітрифікуючого розчину, %	Збереженість деконсервованих ооцитів %, (n)	Рівень запліднення <i>in vitro</i> яйцеклітин, % (n)	Розвиток зародків до стадії 16-ти бластомерів, % (n)
1	16	60	$42,8 \pm 12,4^a$ (7)	0 (0)	—
2	9	50	$66,6 \pm 15,7^a$ (6)	0 (0)	—
3	20	40	$44,4 \pm 11,1^a$ (9)	0 (0)	—
4	26	30	$38,0 \pm 9,5^a$ (10)	0 (0)	—

5	5	20	20,0±17,9 ^a (1)	0(0)	—
6	28	Контроль	—	67,9±8,9 (19)	46,4±9,4 (13)

морфологічно цілих ооцитів отримали в дослідній групі з 50 % вітрифікуючим розчином (30 % гліцерину та 20 % сахарози), який забезпечив збереженість ооцитів корови на рівні $66,6 \pm 15,7$ % ($n=9$). Але дроблення запліднених клітин не виявлено в жодній з дослідних груп. У контрольній групі 2-клітинної стадії дроблення досягли $46,4 \pm 9,4$ % ($n=28$) клітин. Таким чином, застосування вітрифікуючого розчину у складі гліцерину та сахарози при заморожуванні ооцитів корови не призводить до отримання ембріонів з деконсервованих гамет.

На наступному етапі роботи використовували вітрифікуючий розчин, що складається з етиленгліколю та сахарози при заморожуванні з надвисокою швидкістю охолодження (рис. 2).

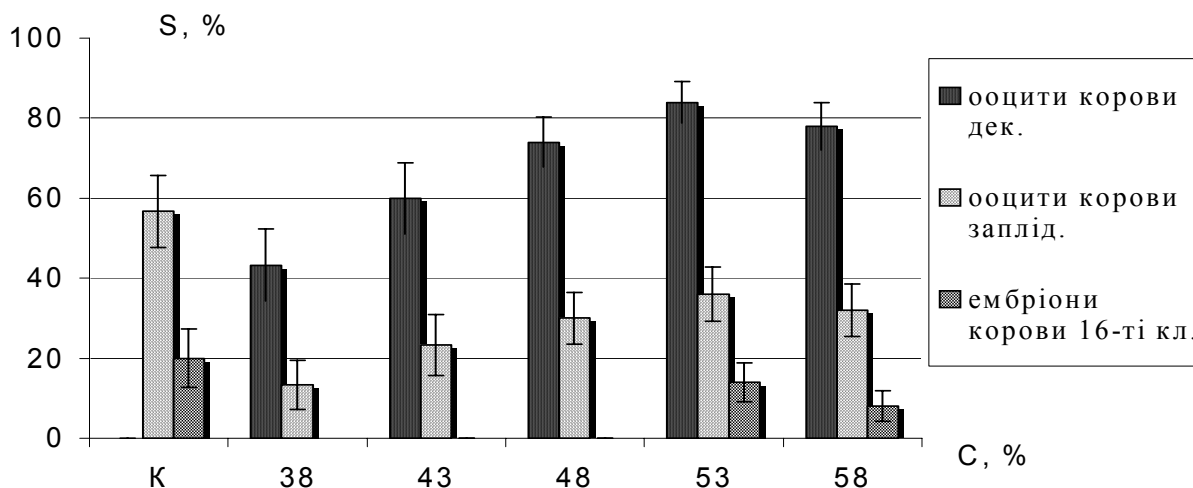


Рис. 2. Збереженість ооцитів корови, заморожених з різними концентраціями вітрифікуючого розчину кріопротекторів етиленгліколю і сахарози при надвисокій швидкості теплообміну

Із результатів, представлених на рисунку 2 видно, що 53 % розчин кріопротектора, який складається з 35 % етиленгліколю та 18 % сахарози, за морфологічними ознаками забезпечив збереженість ооцитів корови на рівні $84,0 \pm 5,2$ %, ($n=42/50$). При заморожуванні ооцитів у 58 % розчині (39 % етиленгліколю та 19 % сахарози), збереженість становила $78,0 \pm 5,9$ % ($n=39/50$). У групі, в якій заморожування ооцитів проводилося у 48 % розчині (32 % етиленгліколю та 16 % сахарози), збереженість становила $74,0 \pm 6,2$ % ($n=37/50$); у групі — 43 % розчину (29 % етиленгліколю та 14 % сахарози) — $60,0 \pm 8,9$ % ($n=18/30$); у групі 38 % розчину (25 % етиленгліколю та 13 % сахарози) — $43,3 \pm 9,0$ % ($n=13/30$). Але тільки у групах з концентраціями вітрифікуючого розчину 58 % та 53 % після культивування деконсервованих та запліднених ооцитів корови в умовах *in vitro* спостерігали дроблення до 16-клітинної стадії розвитку ембріонів $8,0 \pm 3,8$ % ($n=4/50$) та $14,0 \pm 4,9$ % ($n=7/50$), відповідно. Таким чином, застосування вітрифікуючого розчину етиленгліколю і сахарози для заморожування ооцитів корови з надвисокою швидкістю виявляється можливим, а оптимальною концентрацією вітрифікуючого розчину є 53 %, так як при її використанні отримано максимальний рівень збереженості.

Висновки

1. У порівняльному аспекті при заморожуванні ооцитів корови у широкому діапазоні швидкостей теплообміну встановлено, що максимальний рівень збереженості ($11,4 \pm 5,4$ % ($n=3/40$) та $14,0 \pm 4,9$ % ($n=7/50$)) з розвитком до 160-клітинних ембріонів отримано при використанні повільної перемінної та надвисокої швидкостей охолодження-відтаювання, відповідно.

2. Встановлено, що скорочення часу попередньої витримки в еквілібруючому розчині кріопротектора при використанні високих швидкостей теплообміну не знижує рівень збереженості деконсервованих ооцитів корови. Тому вважаємо, що виключення попередньої

еквілібрації як технологічного етапу з повного циклу заморожування—відтаювання підвищить технологічність процесу кріоконсервування ооцитів корови.

3. При заморожуванні ооцитів корови з надвисокими швидкостями теплообміну визначено оптимальну концентрацію вітрифікуючого розчину, яка становить 53 % (етиленгліколю та сахарози), що дає можливість отримувати збереженість $14,0 \pm 4,9\%$ ($n=7/50$) 16-клітинних ембріонів.

A. S. Salina, P. A. Trotsky¹, O. E. Guzevatiy¹, L. V. Gorbunov, E. G. Lisina, N. D. Bezugly

INFLUENCE OF DIFFERENT RATES OF FREEZING ON SAFETY OF BOVINE OOCYTES

Summary

Are carried out researches on influence of different rates of freezing—thawing on viability frozen—thawed of bovine oocyte—cumulus complexes. It is established, that of bovine oocytes preservation of $11,4 \pm 5,4\%$, ($n=3/40$), $6,7 \pm 3,2\%$, ($n=4/60$), $14,0 \pm 4,9\%$ ($n=7/50$), after freezing with slow, high and superhigh rates of heat—exchange.

Institute of animal science UAAS, Kharkiv

¹*Institute of animal breeding and genetics UAAS, Kyiv*

²*Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kyiv*

1. Мельничук Д. О., Гузеватий О. Є. Перспективи біотехнології у тваринництві// Вісник аграрної науки. — 2002. — № 12. — С. 3–11.

2. Bovine embryo technology. / C. Galli, R. Duchi, G. Crotti et al. // Theriogenology. — 2003. — V.59. — I.7. — P.599–616.

3. Betteridge K. J. Farm animal embryo technologies: achievements and perspectives// Theriogenology.— 2006. — V.65. — I. 5. — P. 905–913.

4. Безуглий М. Д., Гузеватий О. Є. Розвиток біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин// Вісник аграрної науки. — 2006. — № 12. — С.83–87.

5. Пат. 60161А Україна, МКВ F 25 D 3/10. Установка для заморожування біологічних об'єктів та спосіб ініціації кристалоутворення в кріозахисному середовищі: Пат. 60161А Україна, МКВ F 25 D 3/10/ Л. В. Горбунов, В. І. Кабачний, Т. С. Антоненко, Н. І. Горбунова, Т. О. Томаровська (Україна); Національна фармацевтична академія України. — № 2003021337; Заявл. 14.02.2003; Опубл. 15.09.2003; Бюл. № 9. — 2 с.

6. Vitrification of mouse oocytes in ethylene glycol—raffinose solution: effects of preexposure to ethylene glycol or raffinose on oocyte vability. / Dela Pena E. C., Takahashi Y., Atabay E. C. et al. // Cryobiology. — 2001. — № 42. — P.103–111.

7. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos. / G. Vajta, P. Holm, M. Kuwayama et al.// Mol. Reprod. Devel. — 1998. — V.51. — P. 55–58.

8. Гузеватий О. Є., Троцький П. А., Собко Ю. М. Методики оцінки якості ооцит-кумуляусних комплексів корів для кріоконсервування // Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві. — К.: Аграрна наука, 2005. — С.180–187.

9. Безуглий Н. Д., Горбунов Л. В., Морозова И. А. Определение критической зоны кристаллообразования раствора глицерина в широком диапазоне скоростей замораживания-оттаивания // Проблемы криобиологии. — 2000. — № 3. — С. 3–7.

10. Горбунов Л. В., Морозова И. А., Безуглый Н. Д. Определение оптимальной концентрации криопротектора, обеспечивающей высокую сохранность эмбрионов мыши, замороженных при сверхвысоких скоростях теплообмена // Проблемы криобиологии. — 2000. — № 4. — С. 8–14.

11. Пат. 72374А Україна, МКВ 7 А61 N 1/02. Спосіб вітрифікації ооцитів і ембріонів ссавців при надвисоких швидкостях теплообміну: Пат. 72374А Україна, МКВ 7 А61 N 1/02/ Л. В. Горбунов, В. І. Кабачний, І. А. Морозова, Н. І. Горбунова, (Україна); Національний фармацевтичний університет. — № 2003109778; Заявл. 31.10.2003; Опубл. 15.02.2005; Бюл. № 2. — 6 с.

12. *Гузеватий О. Є., Троцький П. А.* Оцінка розвитку деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів корів // Вісник Державної агроекологічної академії України. — Житомир, 2000. — С.140–141.
13. Capacitation of bovine sperm by heparin. / J. J. Parrish, J. L. Susko-Parrish, M. A. Winer, N. L. First. // Biol.Reprod. — 1988. — V.38. — P.1171–1180.
14. *Tarcowski A. K.* An air drying method for chromosoma preparation from mouse eggs // Cytogenetics. — 1966. — V.5. — P.394–400.
15. Relationship between the cell number Quality of Day-8 bovine blastocysts // Ushijima M., Okuda M., Nakajama T. et al.// Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans. — 1988. — № 9. — P. 37–38.