УДК 632.2.082.591.15.16

# КРІОЗАХИСНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ВОДОДИСПЕРСНОЇ ФОРМИ ЖИРОРОЗЧИННИХ ВІТАМІНІВ ПРИ ДОДАВАННІ ЇХ У СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ НАДШВИДКОГО ЗАМОРОЖУВАННЯ ЕМБРІОНІВ ТВАРИН

*М. М. Шаран, І. М. Яремчук*

Інститут біології тварин УААН, м. Львів

*Наведено дані про кріозахисні властивості інсолвіту при додаванні його до середовища для надшвидкого заморожування ембріонів мишей і корів. Встановлено, що введення інсолвіту у середовище для заморожування ембріонів методом вітрифікації у встановлених концентраціях значно «пом'якшує» вплив надшвидкого охолодження на ембріони, що підтверджується високим показником збереження деконсервованих ембріонів (понад 80,0 %) і рівня їх приживлення у реципієнтів (понад 50,0 %).*

***Ключові слова:*** КРІОКОНСЕРВУВАННЯ, ЕМБРІОН, ІНСОЛВІТ, НАДШВИДКЕ ЗАМОРОЖУВАННЯ, ВІТРИФІКАЦІЙНЕ І ЕКВІЛІБРАЦІЙНЕ СЕРЕДОВИЩЕ.

Новим і перспективнішим підходом у методиці кріоконсервування ембріонів є їх надшвидке заморожування у рідкому азоті в середовищах з високими концентраціями проникаючих кріпротекторів. Внаслідок цього через сильне підвищення в'язкості розчинів цитоплазма ембріонів разом з висококонцетрованими розчинами переходить у твердий склоподібний стан без кристалізації, тобто вони вітрифікуються [1, 2].

Велике значення для успіху вітрифікації має вибір складу вітрифікаційного розчину, методів еквілібрації клітин, їх заморожування і розморожування, процедури відмивання ембріонів від вітрифікаційного розчину [3]. Зокрема, для здійснення вітрифікації розчину в рідкому азоті і запобігання його кристалізації при заморожуванні та під час розморожування (девітрифікації) необхідна наявність високих концентрацій кріопротекторів, досить високою повинна бути швидкість заморожування і розморожування вітрифікаційного розчину. Проте, головною проблемою вітрифікації є те, що високі концентрації кріопротекторів можуть спричинити токсичний ефект і осмотичний шок [4, 5].

Найчутливішою структурою ембріона до дії низьких температур є його біомембрана. Для забезпечення ефективного клітинного захисту проти окислювальних пошкоджень важливим є повноцінне функціонування антиоксидантних систем цитоплазми і мембран [4, 6]. Антиоксидантна система ембріонів включає різні природні антиоксиданти (вітаміни А, Е, аскорбінова кислота, убіхінони, каротиноїди) та антиоксидантні ферменти [7, 8]. Вважають, що головним жиророзчинним антиоксидантом є вітамін Е, який здатний в низьких концентраціях ефективно виконувати захисні функції [8, 9]. Разом з вітаміном А він виконує функцію стабілізатора клітинних мембран, захищаючи їх від окиснення [10].

Метою даної роботи було дослідження ефективності дії вододисперсної форми вітамінів А, D, Е при додаванні їх до середовищ для надшвидкого заморожування ембріонів мишей і корів.

## Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень слугували ембріони великої рогатої худоби та мишей. Ембріони мишей отримували від самок білих безпородних мишей, вирощених в умовах віварію Інституту біології тварин УААН. Гормональну обробку самок проводили шляхом введення 0,1 мл гонадотропіну сироватки жеребних кобил (ГСЖК) на кожну мишку. На третій день самкам вводили хоріонічний гонадотропін (ХГ) в дозі 0,2 мл, а на ніч підсаджували їх до самців. Вранці самок перевіряли на наявність копулятивних корків. День виявлення корка вважали першим днем вагітності. Забій мишок проводили шляхом

дислокації шийних хребців на третій день вагітності. Ембріони отримували промиванням відпрепарованих яйцепроводів розчином Дюльбекко з додаванням 20 % фетальної сироватки за стандартною методикою [11]. Для дослідів відбирали ембріони на стадії 8 бластомерів, яка вважається найбільш зручною для кріоконсервування.

Досліди на ембріонах великої рогатої худоби проводили у ТзОВ ім. Шевченка Жовківського району, які одержували від корів української чорно-рябої молочної породи віком 4-7 років. Відбір і підготовку корів-донорів проводили за загальноприйнятими методами, поліовуляцію індукували шляхом використанням ФСГ-супер (Росія) за 4-денною схемою [12]. Оцінку якості ембріонів 7-8–денного віку визначали за морфологічними ознаками з врахуванням стадії їх розвитку [13].

При заморожуванні ембріонів великої рогатої худоби та ембріонів мишей надшвидким методом використовували еквілібраційне і вітрифікаційне середовища. Ембріони після промивання в культуральному середовищі від механічного забруднення поміщали в еквілібраційне середовище яке складалося з 10 % гліцерину (1,4 М), експозиція 7-10 хв. Надалі ембріони переносили у вітрифікаційне середовище, для одержання якого спочатку готували маточний розчин, який складався з наступних компонентів:

| | |
|---|---|
| середовище ДМЕМ в 10 % концентрації | 1,2 мл; |
| сахароза | 6,84 г; |
| натрію бікарбонат 7,5 % | 0,1 мл; |
| 1 М HEPES | 0,1 мл; |
| гентаміцин | 50 мг; |
| фетальна сироватка | до 14 мл. |

Щоб приготувати вітрифікаційне середовище, яке б містило 30 % гліцерину і 50 % сахарози, брали 2,8 мл маточного розчину і 1,2 мл гліцерину. Далі ембріони тонкою піпеткою переносили у попередньо заповнену вітрифікаційним середовищем запаяну пайєту. Першу половину пайєти (з ембріонами) занурювали у рідкий азот швидко, а другу повільно для запобігання розриву пайєти. Термін перебування ембріона у вітрифікаційному середовищі не перевищував 60 секунд.

При заморожуванні ембріонів мишей дослідних груп до вітрифікаційного середовища додавали препарат «Інсолвіт» виробництва Київського вітамінного заводу, у склад якого входили вітаміни: А — 80000 МО, D — 13000 МО, Е — 14 мг. Дози інсолвіту підбирали емпірично від 0,1 до 0,5 мл на 10 мл вітрифікаційного середовища в 1-5 дослідних групах відповідно.

Контролем слугували нативні ембріони мишей, які зразу після вимивання культивували 24–48 годин при температурі 38°С. Життєздатними вважали ембріони, які розвинулись в культурі до стадії пізньої бластоцисти.

При заморожуванні ембріонів великої рогатої худоби дослідних груп до вітрифікаційного середовища додавали інсолвіт у концентраціях, які проявили високий відсоток збереження ембріонів мишей (0,2 0,3 і 0,4 мл на 10 мл середовища). Контрольну групу ембріонів великої рогатої худоби заморожували методом вітрифікації без додавання інсолвіту.

Розморожування ембріонів мишей проводили на повітрі при температурі 18–22°С і розміщали в 0,5 М розчин сахарози на 10 хвилин. Після 24–48-годинного культивування ембріони, які досягли стадії пізньої бластоцисти, вважали життєздатними.

Виведення кріопротекторів з деконсервованих ембріонів великої рогатої худоби проводили в двох розчинах по 5 хвилин. Перший розчин містив 5 % гліцерину і 0,5 М сахарозу. Для його виготовлення брали: води бідистильованої — 2 мл, маточного розчину — 7 мл, гліцерину — 1 мл, середовища МЕМ — 10 мл. Друге середовище складалося з 0,25 М сахарози і містило: води бідистильованої — 1,5 мл, маточний розчин — 3,5 мл, середовище МЕМ — 15 мл.

До вищенаведених розчинів додавали інсолвіт від 0,2 до 0,4 мл на 10 мл середовища для розморожування, що відповідало 1–3 дослідним групам ембріонів. Надалі ембріони багаторазово промивали в культуральному середовищі, яке складалося з ФБС Дюльбекко та 20 %-ої фетальної сироватки і заправляли в пайєти для трансплантації.

Життєздатність деконсервованих ембріонів великої рогатої худоби визначали за результатами їх приживлення у реципієнтів через 2 місяці після трансплантації.

**Результати та обговорення**

У результаті досліджень встановлено, що найвищий відсоток (27,8 %) грубих морфологічних пошкоджень (повний розпад або серйозні пошкодження більшої частини бластомерів) спостерігались у ембріонів 1 дослідної групи (табл. 1). Спроба культивувати пошкоджені ембріони була невдалою, жоден із них не розвинувся in vitro. У другій дослідній групі відсоток деконсервованих ембріонів з грубими морфологічними пошкодженнями був значно меншим і становив 20 %. У 3 дослідній групі цей показник виявився найнижчим — 19 %. В 4 та 5 дослідних групах відсоток значних морфологічних пошкоджень був дещо більшим (21 % та 20 % відповідно).

*Таблиця 1*

**Збереження деконсервованих ембріонів мишей залежно від концентрації інсолвіту у вітрифікаційному середовищі**

| Показники | Групи тварин та дози інсолвіту на 10 мл середовища | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | I 0,1 мл | II 0,2 мл | III 0,3 мл | IV 0,4 мл | V 0,5 мл | контроль |
| Заморожено ембріонів, шт | 18 | 20 | 21 | 19 | 20 | 22 |
| Деконсервовані ембріони з морфологічними пошкодженнями, n-% | 5–27,8 | 4–20,0 | 4–19,0 | 4–21,0 | 4–20,0 | 6–27,3 |
| Деконсервовані ембріони, що розвинулись до стадії бластоцисти, шт | 13 | 16 | 17 | 15 | 16 | 16 |
| Збереження деконсервованих ембріонів, % | 72,2 | 80,0 | 80,9 | 78,9 | 80,0 | 72,7 |

Після деконсервування ембріонів 1 дослідної групи і подальшого їх культивування стадії бластоцисти досягло 72,2 % ембріонів, що приблизно відповідало контролю. Життєздатність деконсервованих ембріонів 2, 3, 4 та 5 дослідних груп була на досить високому рівні і становила приблизно 80 відсотків. Морфологічний стан ембріонів, які досягли стадії бластоцисти не відрізнялись від нативних ембріонів: чітко видима бластопорожнина, бластула заповнена тонким шаром бластомерів і більш щільною масою, яка виступає в бластопорожнину.

Підсумовуючи наведені дані, можна зробити припущення, що інсолвіт при додаванні його у середовища для заморожування ембріонів мишей методом вітрифікації, починаючи з концентрації 0,2 мл, значно «пом'якшує» вплив надшвидкого охолодження на ембріони, про що свідчить високий показник збереження деконсервованих ембріонів, який був на рівні 80 відсотків. Це можна пояснити захисною дією вітаміну Е у відношенні до поліненасичених жирних кислот фосфоліпідів клітинних мембран. Крім цього, він взаємодіє також з інтегральними білками ліпопротеїнових комплексів. Отже, вітамін Е, взаємодіючи з ліпідами і білками в клітинних мембранах, стабілізує та забезпечує їх нормальне функціонування [10].

При вивченні кріозахисних властивостей інсолвіту на ембріонах великої рогатої худоби ми враховували кращі показники збереження деконсервованих ембріонів мишей і використовували відповідні концентрації досліджуваного препарату. В результаті досліджень встановлено, що відсоток деконсервованих ембріонів з незворотними морфологічними змінами майже у всіх дослідних групах був досить низьким (11,1–15,4 %) у порівнянні з контролем, де цей показник становив 20,0 % (табл. 2). Це й зумовило підвищення відсотка збереження деконсервованих ембріонів у всіх дослідних групах, а, особливо, в 3 дослідній групі з концентрацією інсолвіту 0,4 мл, де він становив 88,9 %, що майже на 10,0 % вище від контролю.

*Таблиця 1*

**Збереження деконсервованих ембріонів великої рогатої худоби залежно від концентрації інсолвіту у вітрифікаційному середовищі**

| | Групи тварин та дози інсолвіту на 10 мл середовища |
|---|---|

| Показники | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | I<br>0,2 мл | II<br>0,3 мл | III<br>0,4 мл | контроль |
| Заморожено ембріонів, шт | 14 | 13 | 9 | 10 |
| Деконсервовані ембріони з морфологічними пошкодженнями, n-% | 2–14,3 | 2–15,4 | 1–11,1 | 2–20,0 |
| Збереження деконсервованих ембріонів, % | 85,7 | 84,6 | 88,9 | 80,0 |

При цьому слід відзначити, що морфологічний стан деконсервованих ембріонів не відрізнявся від нативних (без будь-яких щільних темних ділянок, неправильної форми бластопорожнини), що досить часто спостерігається у ембріонів після розморожування (рис. 2).

1 2 3

*Рис. 2.* Морфологічний стан ембріонів мишей після деконсервування:
1 — рання компактна морула; 2 — рання компактна морула з анормальною клітиною;
3 — бластоциста відмінної якості.

Крім того, відмічено, що реекспансія бластопорожнини у пізніх бластоцист відбувалась на 1,5–2 хв швидше, ніж у ембріонів контрольної групи аналогічної стадії розвитку.

Вища якість деконсервованих ембріонів, обумовлена використанням інсолвіту у складі середовищ для вітрифікації та розморожування, забезпечила підвищення результативності трансплантації ембріонів. Результати пересадки ембріонів свідчать про досить високий рівень приживлення деконсервованих ембріонів. Так, у всіх дослідних групах він був на рівні 50 %, а в 2-й групі становив 54,5 %, що на 17 відсотків вище від контролю (табл. 3).

*Таблиця 3*

**Приживлення деконсервованих ембріонів великої рогатої худоби, які піддавалися впливу інсолвіту в різних концентраціях**

| Показники | Групи тварин та доза інсолвіту на 10 мл середовища | | | |
|---|---|---|---|---|
| | I<br>0,2 мл | II<br>0,3 мл | III<br>0,4 мл | контроль |
| Трансплантовано деконсервованих ембріонів, шт | 12 | 11 | 8 | 8 |
| Тільні реципієнти, гол | 6 | 6 | 4 | 3 |
| Приживлення ембріонів, % | 50,0 | 54,5 | 50,0 | 37,5 |

Підсумовуючи вищенаведені дані, можна зробити висновок, що введення інсолвіту в середовища для надшвидкого заморожування ембріонів проявляє позитивний вплив як на збереження деконсервованих ембріонів, так і на їх приживлення у реципієнтів. Одержані результати вказують на можливість використання препарату інсолвіт для кріоконсервування ембріонів, а також необхідність пошуку інших антиоксидантів для підвищення стійкості біомембран до дії низьких температур.

## Висновки

1. Введення інсолвіту у вітрифікаційні середовища для заморожування ембріонів мишей та великої рогатої худоби надшвидким методом значно знизило кількість морфологічно пошкоджених клітин після їх деконсервування, що зумовило краще їх збереження (до 90 %) при дії низьких температур.

2. Застосування досліджуваних серій інсолвіту у складі середовища для розморожування ембріонів великої рогатої худоби підвищило приживлення деконсервованих ембріонів на 5–18 %.

*M. M. Sharan, I. M. Yaremchuk*

## CRYOPROTECTIVE EFFICIENCY OF FAT-SOLUBLE VITAMINS AT ADDITION THEM TO THE MEDIA FOR RAPID FREEZING

S u m m a r y

Data are resulted from the study of cryoprotective properties of insolvit at addition of it to the media for rapid freezing of mice's and cows' embryos. It is revealed, that introduction of insolvit to the media for freezing of embryos by the method of vitrification in the set concentrations considerably softens influencing of the rapid cooling on embryos, that is confirmed by the high index of surviving of thawed embryos (over 80,0 %) and level of their nidation it recipients (over 50,0 %).

*М. М. Шаран, И. М. Яремчук*

## КРИОЗАЩИТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ ИХ У СРЕДЫ ДЛЯ СВЕРХБЫСТРОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

А н н о т а ц и я

Приведены данные изучения криозащитных свойств инсолвита при добавлении его к среде для сверхбыстрого замораживания эмбрионов мышей и коров. Установлено, что введение инсолвита в среду для замораживания эмбрионов методом витрификации в установленных концентрациях значительно смягчает влияние сверхбыстрого охлаждения на эмбрионы, что подтверждается высоким показателем сохранения деконсервовированных эмбрионов (свыше 80,0 %) и уровня их приживления у реципиентов (свыше 50,0 %).

Институт биологии животных УААН

1. *Кривохарченко А. С.* Сверхбыстрое замораживание мышиных эмбрионов, хранившихся при 4°С в течении суток [Текст]: / А. С. Кривохарченко, А. И. Вильянович, В. П. Рябых / Онтогенез. — 1992. — т. 23, — № 2. — С. 146–149.

2. *Грищенко В.И.* Сверхбыстрые скорости охлаждения и витрифицирующие растворы в криобиологии [Текст]: / В. И. Грищенко, Ю. В. Калугин / Проблемы криобиологии. —1993. — № 3. — С. 3–13.

3. *Безуглый Н. Д.* Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих в растворах криопротекторов. IV. Прямая регидратация эмбрионов коровы. [Текст]: / Н. Д. Безуглый, А. В. Медведовский / Проблемы криобиологии. — 1998. — № 4. — С. 37–41.

4. *Кузнєцова І.Б.* Особливості кріоконсервування ембріонів та ооцитів ссавців методом вітрифікації. [Текст]: /Кузнєцова І.Б., Кузнєцов В.Е., Ковтун С.І./ Вісник аграрної науки.—1999. —№ 2. —С. 42–45.

5. *Shaw J.M.* Rapid freezing of pronuclear, two-ceel, eight-ceel, morulal and blastocyst stage mouse embryos. [Text]: /Shaw J.M., Diotallevi L.,MacFarlane D., Trounson A./ Cryobiology. — 1989. —Vol. 26. —№ 6. —P. 540–551.

6. *Miyare T.* Vitrificacion of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. [Text]: /Miyare T., Kasai M., Zhu S.E. et al./ Theriogenology. —1993. — Vol. 40. — № 1. — P. 121-134.

7. *Кривохарченко А.С.* Влияние способа оттаивания эмбрионов мышей, замороженных сверхбыстрым методом или на программном замораживателе, на их

жизнеспособность. [Текст]: / А. С. Кривохарченко, К. И. Бахитов, В. П. Рябых / Онтогенез. — 1992 а.— т. 23. — № 1. — С. 67–70.

8. *Armbryst T.A.* Effect of cryoprotectant and genetic selection for body fat content on embryonic cryosurvival in mice. [Text]: /Armbryst T.A., Eisen E.J./ Treor. Ahhl. Cenet. — 1994. — Vol. 88. — № 3–4. — P. 479–485.

9. *Agca Y.* Effects of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics. [Text]: / Y. Agca, J. Lin, A. T. Peter, E. S. Crister, J. K. Crister / Molecular Reproduction and Development. — 1998. — Vol. 49 (4). — P. 408–415.

10. *Янович В. Г.* Жиророзчинні вітаміни у ветеринарній медицині і тваринництві. [Текст]: / В. Г. Янович, Б. М. Курток. — Львів. — 2004. — 425 с.

11. *Вуд М.* Низкотемпературная консервация яиц и эмбрионов мышей. [Текст]: Биология развития млекопитающих. Методы / М. Вуд, Д. Уиттингхэм, У. Ролл / М.: Мир. — 1990 — С. 323–356.

12. *Довідник* з репродуктивної біотехнології великої рогатої худоби. [Текст]: Довідник / За редакцією С. Г. Шаловила. — Львів. — 2004. — 150 с.

13. *Кауффольд П.* Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота [Текст]: / П. Кауффольд, И. Тамм, И. Я. Шихов и др. / М. : Агропромиздат. — 1990 — 56 с.