

СТАБІЛІЗАЦІЯ МЕМБРАН ЕМБРІОНІВ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ НАДШВИДКИМ МЕТОДОМ

М. М. Шаран

Інститут біології тварин УААН, м. Львів

Наведено дані про криозахисні властивості інсолвіту, лінолевої кислоти, холестеролу лінолеату і олеату при додаванні їх у середовища для надшвидкого заморожування ембріонів мишей і корів. Встановлено, що введення вказаних мембраностабілізуючих речовин у середовище для заморожування ембріонів методом вітрифікації в оптимальних концентраціях знижує кількість морфологічно пошкоджених клітин після деконсервування, що підтверджується високим показником збереження деконсервованих ембріонів (понад 80,0 %), а також підвищує їх приживлюваність на 7,2–17,0 %.

Ключові слова: КРІОКОНСЕРВУВАННЯ, ЕМБРІОН, ІНСОЛВІТ, ЛІНОЛЕВА КИСЛОТА, ХОЛЕСТЕРОЛ, НАДШВИДКЕ ЗАМОРОЖУВАННЯ, ВІТРИФІКАЦІЙНЕ І ЕКВІЛІБРАЦІЙНЕ СЕРЕДОВИЩЕ

За останні 30 років трансплантація ембріонів великої рогатої худоби перетворилася на міжнародну індустрію, в якій більше 500 тисяч ембріонів щорічно одержують, пересаджують і кріоконсервують [1]. Тривалими дослідженнями і впровадженням їх у практику напрацьовано метод заморожування ембріонів, який здатний забезпечити 80–90 % їх виживання після деконсервування [2].

Новим і перспективнішим методом кріоконсервування ембріонів є їх надшвидке заморожування у рідкому азоті в середовищах з високими концентраціями проникаючих кріпротекторів. При цьому через сильне підвищення в'язкості розчинів цитоплазма ембріонів разом з висококонцентрованими розчинами переходить у твердий склоподібний стан без кристалізації, тобто вони вітрифікуються [3, 4]. Велике значення для успіху вітрифікації має вибір складу вітрифікаційного розчину, методів еквілібрації клітин, їх заморожування і розморожування, процедури відмивання ембріонів від вітрифікаційного розчину [5].

Головним місцем кріопошкоджень є цитоплазматична мембрана та специфічні ліпіди в ній. Ліпіди при низьких температурах проходять стадії від рідкокристалічної до фази гелю, у результаті чого може порушуватися цілісність мембран і настає загибель клітин, якщо проходять незворотні процеси. Цей феномен пояснюється композицією мембран. Мембрани з високим співвідношенням холестерол : фосфоліпід менш чутливі до дії субфізіологічних температур. Ці біофізичні і біохімічні параметри можуть пояснити як відмінності результатів кріоконсервування ембріонів, так і розбіжності, викликані сезоном і живленням [6–8]. Тому важливим фактором підвищення ефективності кріоконсервування ембріонів є зміна співвідношення холестерол : фосфоліпід у сторону останнього.

Оскільки лінолева кислота як ненасичена жирна кислота є структурним компонентом фосфоліпідів мембран, ми вирішили застосувати її для зміни пластичності мембран ембріонів. Крім того, доведено, що лінолева кислота зміцнює клітинні мембрани і слизові оболонки [9]. Заморожування статевих клітин викликає втрату мембранами холестеролу [10], що спонукало до використання різних форм холестеролу для стабілізації співвідношення холестерол : фосфоліпіди у мембранах ембріонів.

Антиоксидантна система ембріонів включає різні природні антиоксиданти (вітаміни А, Е, аскорбінова кислота, убіхінони, каротиноїди) та антиоксидантні ферменти [11, 12].

Вважають, що головним жиророзчинним антиоксидантом є вітамін Е, який здатний у низьких концентраціях ефективно виконувати захисні функції [12, 13]. Разом з вітаміном А він виконує функцію стабілізатора клітинних мембран, захищаючи їх від окиснення [14].

Метою цієї роботи було дослідження ефективності дії лінолевої кислоти, різних форм холестеролу, 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 введенням 3 МО гонадотропіну сироватки жеребних кобил (ГСЖК) на кожну мишку. На третій день самкам вводили хоріонічний гонадотропін (ХГ) у дозі 2 МО, 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 0,4 % бичачого сироваткового альбуміну (БСА) за стандартною методикою [15]. Для дослідів відбирали ембріони на стадії 8–16 бластомерів, яка вважається найбільш зручною для кріоконсервування.

Досліди на ембріонах великої рогатої худоби проводили у ТЗОВ «Городище» Луцького району Волинської області, які одержували від корів української чорно-рябої молочної породи віком 4–7 років. Відбір і підготовку корів-донорів проводили за загальноприйнятими методами, поліовуляцію індукували використанням фолікуло-стимулюючого гормону «Фолікотропін» (Чехія) за 4-денною схемою [9]. Оцінку якості ембріонів 7–8-денного віку визначали за морфологічними ознаками з врахуванням стадії їх розвитку [10].

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 NERES — 0,1 мл; гентаміцин — 50 мг; БСА — 0,4 %; розчин Дюльбекко — 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.

Далі провели три серії експериментів, у яких вивчали вплив інсолвіта, лінолевої кислоти та сполук холестеролу на стабілізацію мембран ембріонів. У 1 серії експериментів при заморожуванні ембріонів мишей дослідних груп до вітрифікаційного середовища додавали лінолеву кислоту (Linoleic acid 27908, Serva), дози якої підбирали емпірично з урахуванням літературних даних — від 0,1 % до 0,4 % в 1–4 дослідних групах відповідно [11, 12]. У 2 серії експериментів при заморожуванні ембріонів мишей дослідних груп до вітрифікаційного середовища додавали різні форми холестеролу (Cholesteryl linoleat 17112, Cholesteryl oleat 17121, Cholesterol stearat 17124, Serva). Дози холестеролу підбирали емпірично, враховуючи літературні дані — від 0,5 до 2,0 мг/мл середовища в 1–4 дослідних групах кожної

форми холестеролу відповідно [9, 13]. У 3 серії дослідів 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, лінолеву кислоту, холестеролу олеат, лінолеат і стеарат у концентраціях, які проявили високий відсоток збереження ембріонів мишей (0,1, 0,2 і 0,3 %). Контрольну групу ембріонів великої рогатої худоби заморожували методом вітрифікації без додавання вказаних речовин.

Розморожування ембріонів мишей проводили на повітрі при температурі 18–22 °С і розміщали в 0,5 М розчин сахарози на 10 хв. 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 хв. 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 у дослідних групах додавали досліджувані речовини у концентраціях, які проявили високу ефективність. Надалі ембріони багаторазово промивали в культуральному середовищі, яке складалося з ФБС Дюльбекко та 0,4 % БСА і заправляли в пайєти для трансплантації.

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

Результати й обговорення

При застосуванні інсолвіту у вітрифікаційному середовищі після деконсервування ембріонів високий відсоток збереження був у 2, 3 і 5 дослідних групах (80,0 %, 80,9 % і 80,0 %), що відповідало концентрації інсолвіту 0,2, 0,3 і 0,5 мл на 10 мл середовища (рис. 1).

З отриманих даних можна зробити припущення, що інсолвіт при додаванні його у середовища для заморожування ембріонів мишей методом вітрифікації, починаючи з концентрації 0,2 мл, «пом'якшує» вплив надшвидкого охолодження на ембріони, про що свідчить високий показник збереження деконсервованих ембріонів, який був на рівні 80 %. Це можна пояснити захисною дією вітаміну Е відносно 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 [14].

При застосуванні лінолевої кислоти після деконсервування ембріонів 1, 2 і 3 дослідних груп і подальшого культивування до стадії бластоцисти збереженість їх становила відповідно 80,0 %, 81,8 % і 77,8 %, що на 13,3 %, 15,1 % і 11,1 % більше, ніж у контрольній групі. Підвищення збереженості ембріонів, очевидно, пов'язано із тим, що лінолева кислота, як одна з ненасичених жирних кислот, є структурним елементом фосфоліпідів мембран і додавання її до вітрифікаційного середовища дозволяє змінити співвідношення фосфоліпіди: холестерол у сторону перших. А це, у свою чергу, призводить до зміни

композиції мембран (вони стають еластичнішими), що дозволяє їм лабільніше реагувати на дію низьких температур. На думку ряду дослідників, співвідношення фосфоліпиди : холестерол визначає текучість, проникність і термотропну поведінку мембран. Оскільки швидке охолодження мінімізує час дії критичних температур на клітину, необхідно змінити композицію мембран і оптимізувати кріоконсервування [7, 8].

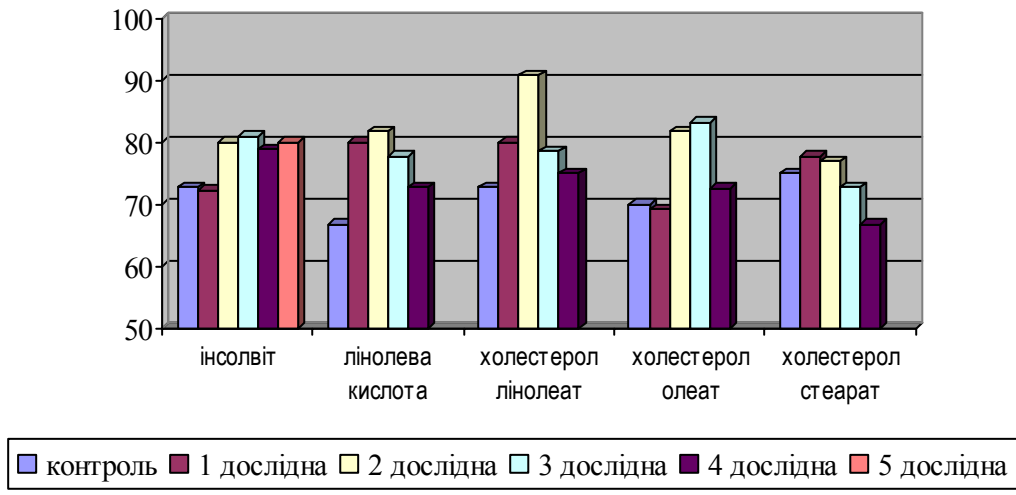


Рис. 1. Збереження деконсервованих ембріонів мишей

Застосування Cholesteryl linoleat і Colesteryl oleat суттєво зменшило кількість ембріонів з грубими морфологічними пошкодженнями після деконсервування. Вказані пошкодження клітинної маси визначили результативність культивування розморожених ембріонів і їх збереженість. Найвищу збереженість ембріонів (90,0 %) спостерігали при додаванні холестеролу лінолеату у дозі 1,0 мг/мл. Аналогічні показники збереженості деконсервованих ембріонів після культивування одержали при використанні холестеролу олеату у дозі 1,5 мг/мл середовища — 83,3 %. В той же час застосування стеарату холестеролу у дозах від 0,5 до 1,5 мг/мл середовища майже не змінювало збереженості деконсервованих ембріонів. Збільшення дози холестеролу до 2,0 мг/мл, навіть, дещо знижувало життєздатність ембріонів. Слід відзначити, що ембріони, які досягли стадії бластоцисти, за морфологічним станом не відрізнялись від нативних: чітко видима бластопорожнина, бластула заповнена тонким шаром бластомерів і більш щільною масою, яка виступає в бластопорожнину.

Отже, додавання лінолеату і олеату холестеролу в оптимальних дозах у вітрифікаційне середовище підвищує збереженість деконсервованих ембріонів на 13,3–18,2 %. Очевидно, це пов'язано із тим, що додаткове введення холестеролу зменшує його втрати мембранами ембріонів протягом кріоконсервування, і тим самим знижує кріопошкодження та підвищує виживаність ембріонів після розморожування. Аналогічні дані отримані вченими при кріоконсервуванні сперми [20]. При вивченні кріозахисних властивостей інсолвіту на ембріонах великої рогатої худоби встановлено 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 (рис. 2).

Введення лінолевої кислоти у вітрифікаційне середовище підвищило збереженість деконсервованих ембріонів у всіх дослідних групах, а, особливо, у 2 і 3 дослідних групах з концентрацією лінолевої кислоти 0,2 % і 0,3 %, де вона становила відповідно 83,3 % і 80,0 %, що на 13,3 % і 10,0 % більше від контролю.

Найвищі показники збереження деконсервованих ембріонів корів отримали при застосуванні холестеролу лінолеату 1,0 мг/мл — 90,0 %. Деяко нижчий відсоток збереження розморожених ембріонів (83,3 %) одержали при використанні 1,5 мг/мл холестеролу олеату. При застосуванні стеарату холестеролу збереженість відталих ембріонів майже не відрізнялася від контролю.

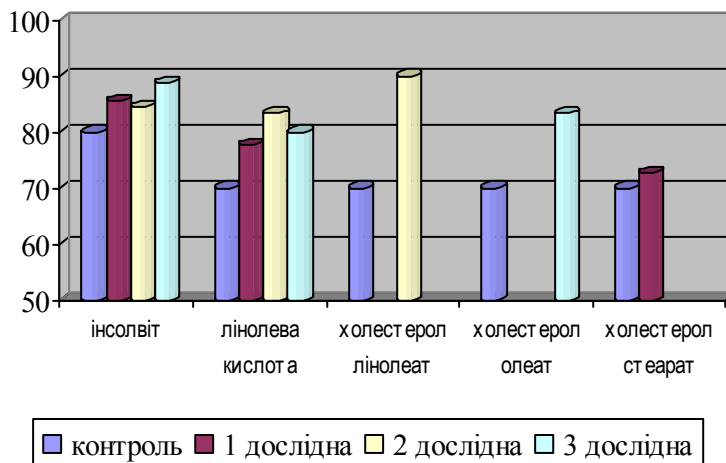


Рис. 2. Збереження деконсервованих ембріонів великої рогатої худоби

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

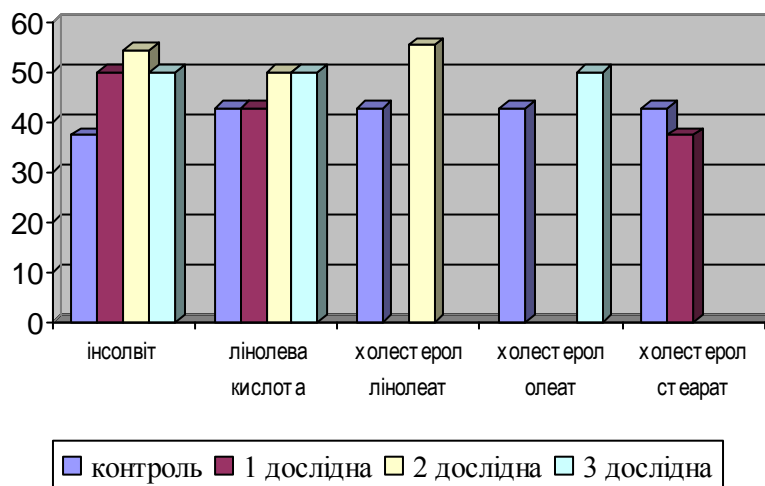


Рис. 3. Приживлюваність деконсервованих ембріонів великої рогатої худоби

Використання лінолевої кислоти у складі середовищ для вітрифікації та розморожування забезпечило підвищення приживлюваності ембріонів у 2 і 3 дослідних групах на 7,2 % порівняно з контрольними реципієнтами.

При застосуванні лінолеату холестеролу в дозі 1,0 мг/мл приживлюваність трансплантованих ембріонів становила 55,5 %, що на 12,7 % більше порівняно з контрольними реципієнтами. Аналогічно використання холестеролу олеату в дозі 1,5 мг/мл

підвищило приживлюваність ембріонів у телиць-реципієнтів на 7,2%. В той же час застосування оптимальної концентрації холестеролу стеарату (0,5 мг/мл) дещо знизило рівень приживлення ембріонів — на 5,3%.

Підсумовуючи вищенаведені дані, можна зробити висновок, що введення лінолевої кислоти в середовища для надшвидкого заморожування ембріонів проявляє позитивний вплив як на збереженість деконсервованих ембріонів, так і на їх приживлення у реципієнтів.

Висновки

1. Введення мембраностабілізуючих речовин (інсолвіт, лінолева кислота, лінолеат та олеат холестеролу) у вітрифікаційні середовища для заморожування ембріонів мишей та великої рогатої худоби надшвидким методом знизило кількість морфологічно пошкоджених клітин після їх деконсервування, що зумовило краще їх збереження (до 90%) за дії низьких температур.

2. Застосування інсолвіту, лінолевої кислоти, лінолеату та олеату холестеролу в оптимальних дозах у складі вітрифікаційного середовища підвищує приживлюваність трансплантованих ембріонів великої рогатої худоби на 7,2–17,0%.

3. Використання стеарату холестеролу у складі вітрифікаційного середовища не покращує життєздатність і приживлюваність деконсервованих ембріонів, а тому недоцільне для практики.

Перспективи подальших досліджень. Науково-практичний інтерес становить дослідження впливу більш ненасичених жирних кислот і їх холестеринових ефірів на морфологічний стан ембріонів та їх приживлюваності.

M. Sharan

STABILIZATION OF EMBRYOS MEMBRANES AT CRIOCONSERVATION BY ULTRAFREEZING METHOD

S u m m a r y

Data are resulted about crioprotective properties of insolvit, linoleic acids, holesterol of linoleat, oleat and stearat at addition of her on medium for the ultrafreezing of embryos of mice and cows. It is set, that introduction of the indicated membrano stabilizing matters to the environment for freezing of embryos by the method of vitrification in optimum concentrations lowers the quantity of the morphologically damaged cells after deconservation, that is confirmed by the high index of saving of deconservation embryos (over 80,0%), and also promoted them implantation on 7,2–17,0%.

Н. Шаран

СТАБИЛИЗАЦИЯ МЕМБРАН ЭМБРИОНОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ СВЕРХБЫСТРЫМ МЕТОДОМ

А н н о т а ц и я

Приведено данные о криозащитных свойствах инсолвита, линолевой кислоты, холестерола линолеата, олеата и стеарата при добавлении их в среды для сверхбыстрого замораживания эмбрионов мышей и коров. Установлено, что введение указанных мембрано стабилизирующих веществ в среду для замораживания эмбрионов методом витрификации в оптимальных концентрациях снижает количество морфологически поврежденных клеток

после деконсервирования, что подтверждается высоким показателем сохранения оттаянных эмбрионов (свыше 80,0 %), а также повышает их приживляемость на 7,2–17,0 %.

1. *Thibier M.* The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world for the year 1999: A new record for bovine in vivo-derived embryos transferred. / Thibier M. // In: Wheeler, M (ed), Embryo Transfer Newsletter. — Savoy, IL. — 2000. — V. 18 — P. 24–28.

2. *Hasler J. F.* Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. / Hasler J. F. // Theriogenology. — 2001. — 56. — P. 1401–15.

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

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

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

6. *Zeron Y.* Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. [Text] / Zeron Y., Ocheretny A., Kedar O., Borochoy A. et al. // Reproduction. — 2001. — V. 121. — P. 447–454.

7. *Arav A.* Does lipid profile explain chilling sensitivity and membrane lipid phase transition of spermatozoa and oocytes? [Text] / Arav A., Pearl M., Zeron Y. // Cryoletters — 2000. — V. 21. — P. 179–186.

8. *Zeron Y.* Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. [Text] / Zeron Y., Sklan D., Arav A. // Mol. Reprod. Dev. — 2002. — V. 61 — P. 271–278.

9. *Казимирко В. К.* Функция ненасыщенных жирных кислот в организме. [Текст] / Казимирко В. К., Мальцев В. И. // Новости медицины — 2004. — № 95 — С. 35–39.

10. *Cormier N. A.* Differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation / Cormier N., Bailey J. I. // Biol. Reprod. — 69 (2003) 177–185.

11. *Кривохарченко А. С.* Влияние способа оттаивания эмбрионов мышей, замороженных сверхбыстрым методом или на программном замораживателе, на их жизнеспособность. [Текст] / Кривохарченко А. С., Бахитов К. И., Рябых В. П. // Онтогенез. — 1992 а. — Т. 23, № 1. — С. 67–70.

12. *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. // Theor. Ahhl. Cenet. — 1994. — Vol. 88, № 3–4. — P. 479–485.

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

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

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

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

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

18. *Hochi S.* Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae [Text] / Hochi S., Kimura K., Hanada A. // *Theriogenology* — 1999. — V. 52 (3) — P. 497–504.

19. *Tominaga K.* Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell stage. [Text] / Tominaga K., Hamada Y., Yabuue T., Ariyoshi T. // *J. Vet. Med. Sci.* — 2000. — V. 62(4) — P. 465–467.

20. *Purdy P. H.* Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility / Purdy P. H., Graham J. K. // *Biol. Reprod.* 71 — 2004. — P. 522–527.

Рецензент: завідувач лабораторії ембріональної біотехнології, кандидат біологічних наук Гевкан І. І.