

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЗАСТОСУВАННЯ РІЗНИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ У ЕКВІЛІБРАЦІЙНОМУ РОЗЧИНІ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ ГАМЕТ КОРІВ

П. А. Троцький

Інститут розведення і генетики тварин НААН України

Наведено результати експериментальних досліджень із кріоконсервування ооцит-кумулясних комплексів корів із використанням різних кріопротекторів у еквілібраційному розчині та оцінено життєздатність і подальший розвиток in vitro гамет після деконсервування. Установлено, що використання етиленгліколю у еквілібраційному розчині при кріоконсервування ооцит-кумулясних комплексів корів є більш ефективним, порівняно з гліцерином і пропандіолом. Проведено дозрівання поза організмом деконсервованих гамет корів, морфологічний і цитогенетичний аналізи яйцеклітин і отриманих in vitro ембріонів великої рогатої худоби.

Методи зберігання ооцитів і ембріонів надзвичайно важливі для розвитку тваринництва, біології і медицини. Дослідники, які працюють у галузі біології розвитку ссавців, зокрема великої рогатої худоби, повинні мати в своєму розпорядженні набір гамет самиць на різних стадіях мейозу та ембріонів різних стадій розвитку. Проте, постійне їх отримання в необхідній кількості потребує великих затрат часу і фінансів. Сьогодні існує спосіб збереження ооцитів та ембріонів, який полягає у глибокому заморожуванні їх в рідкому азоті. Збереження при -196°C створило можливість фактично необмеженого зберігання, транспортування і використання біологічного матеріалу для досліджень у будь-яких галузях науки. Стратегія використання і зберігання необхідного генетичного матеріалу, крім заморожування і тривалого зберігання ембріонів, включає й збереження інших біологічних об'єктів, а саме кріоконсервування гамет самців і самиць. Тривале зберігання гамет обох батьків припускає необмежені варіанти їх поєднання в майбутньому, тобто ведення селекції на клітинному рівні [1–3].

Наявність банку заморожених гамет необхідних генотипів дозволяє не побоюватись випадкової втрати цінного генетичного матеріалу внаслідок помилок схрещування, генетичних контамінацій або хвороб та інше. З використанням методу кріоконсервування можуть бути проведені дослідження з впливу оточуючого середовища на генотип, порівняння спадкового статусу тварин, що були відтворені традиційно та із заморожено-розморожених зародків. Легкість транспортування кріоконсервованого матеріалу дозволяє здійснювати обмін гаметами як для наукових цілей так і для прилиття свіжої крові популяціям, які розводять штучно. Біологічний матеріал може накопичуватись у достатній кількості та використаний в будь-який час для біотехнологічних досліджень [4–6].

Мета досліджень — порівняння впливу різних кріопротекторів у еквілібраційному розчині при кріоконсервуванні на життєздатність і дозрівання поза організмом деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів корів.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень були ооцит-кумулясні комплекси корів чорно-рябої породи. Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, які вимивали середовищем Дюльбекко та оцінювали за морфологічними ознаками. Для заморожування використовували ооцити корів з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом [7]. Перед заморожуванням гамети обробляли еквілібраційним розчином (10 хв) потім переносили у вітрифікаційний розчин (30 сек). Група, в якій ооцит-кумулясні комплекси корів не заморожували, була контрольною. Всі еквілібраційні та вітрифікаційні розчини готувались на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20 % фетальної сироватки корів, яку попередньо інактивували при $+56^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв. Після розморожування гамет корів виведення кріопротекторів з них

проводили шляхом перенесення їх на 10 хв у розчин 1,0 М сахарози. Потім клітини тричі відмивали середовищем М-199, оцінювали за морфологічними ознаками і переносили в середовище для культивування. Ооцит-кумулюсні комплекси корів культивували в чотирьохлункових планшетах протягом 27 год при температурі 38,5 °С, 5 % CO₂ у повітрі, в краплях середовища 199 з 10 % попередньо інактивованою сироваткою крові корів, 2,5 мкг/мл ФСГ, 1,0 мкг/мл естрадіолу, 2,5 МО/мл лютеїнізуючого гормону, 2,0 мМ натрія пірувату, 2,92 мМ кальція лактату, 40 мкг/мл гентаміцину. Гамети корів після культивування поза організмом підлягали цитогенетичному аналізу, цитогенетичні препарати готували за методом Tarkowski A. K. [8], забарвлювали 2,0 % розчином Гімза та досліджували під мікроскопом. Решта нативних та деконсервованих яйцеклітин корів після дозрівання поза організмом підлягали заплідненню *in vitro*. Для запліднення *in vitro* яйцеклітин корів використовували заморожену сперму бугая. Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J. J. et al. [9]. Спільне інкубування яйцеклітин і сперматозоїдів проводили в термостаті при температурі 38,5 °С, 5 % CO₂ в повітрі, в краплях середовища Fert.-TALP. Після 12–18 год спільного інкубування яйцеклітини і зиготи відмивали від прилиплої сперми і переносили в краплі середовища CDM для подальшого культивування. Цитогенетичні препарати гамет корів після запліднення *in vitro* та зародків великої рогатої худоби готували за методом Ushijima M. et al. [10], забарвлювали 2,0 % розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

Результати та обговорення. Проведено дослідження з вивчення впливу використання різних кріопротекторів (гліцерин — вар. А, пропандіол — вар. Б, етиленгліколь — вар. В) в еквілібраційному розчині на життєздатність і подальший розвиток *in vitro* деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів корів (табл. 1). У контрольній групі гамети не заморожували.

Таблиця 1

Використання різних кріопротекторів у еквілібраційному розчині при кріоконсервуванні ооцит-кумулюсних комплексів корів

Варіанти досліджу	Кількість заморожених клітин	Кількість клітин придатних для культивування після розморожування		Кількість клітин:					
				на метафазі-2		на інших стадіях мейозу		з хромосомними порушеннями	
				п	%	п	%	п	%
А	164	149	90,9 ±2,3	77	51,7 ^а ±4,1	19	12,7 ±2,7	53	35,6 ^ф ±3,9
Б	181	168	92,8 ±1,9	96	57,1 ^б ±3,8	21	12,5 ±2,6	51	30,4 ^{еф} ±3,5
В	172	164	95,3 ±1,6	104	63,4 ^б ±3,8	22	13,4 ±2,7	38	23,2 ^е ±3,3
К	155	—	—	117	75,5 ^с ±3,5	18	11,6 ±2,6	20	12,9 ^д ±2,7

Примітка: а : б; б : с; д : е; е : ф — P < 0,05; а : с; д : ф — P < 0,001, у цій та іншій таблиці різні суперскріпти вказують на вірогідну різницю між показниками

Результати досліджень показали наявність взаємозв'язку між кріопротекторами гліцерин, пропандіол та етиленгліколь у еквілібраційному розчині та рівнем мейотичного дозрівання деконсервованих ооцитів корів. Для визначення впливу дії кріопротекторів при кріоконсервуванні ооцит-кумулюсних комплексів корів на мейотичне дозрівання деконсервованих ооцитів корів в умовах *in vitro* застосували кріопротектори гліцерин, пропандіол та етиленгліколь у еквілібраційному розчині. За результатами експериментальних досліджень встановлено, що рівень дозрівання деконсервованих ооцитів, заморожених з використанням етиленгліколю різниться, порівняно із застосуванням гліцерину та пропандіолу у еквілібраційному розчині за такими показниками як кількість дозрілих ооцитів до метафазі-2 мейозу та кількість клітин з хромосомними порушеннями.

Різний рівень дозрівання поза організмом гамет корів (63,4 %, вар. В, проти 51,7 і 57,1 % відповідно до варіантів А і Б) та порушень хромосомного матеріалу (23,2, проти 35,6 і 30,4 %, відповідно у вар. В, А і Б) свідчать про перспективність застосування 30 % етиленгліколю при 10 хв витримці при кріоконсервуванні ооцит-кумулюсних комплексів

корів. Показники дозрівання до метафази-2 мейозу і хромосомних порушень при використанні нативних гамет корів становили відповідно 75,5 та 12,9 %.

Повноцінність мейотичного дозрівання поза організмом деконсервованих ооцитів корів, що були заморожені з використанням різних кріопротекторів, перевіряли шляхом їх запліднення *in vitro*. Порівняльний аналіз результатів запліднення *in vitro* деконсервованих яйцеклітин корів, що були заморожені з використанням гліцерину (вар. А) пропандіолу (вар. Б), етиленгліколю (вар. В) та нативних (вар. К) виявив позитивний ефект застосування етиленгліколю у еквілібраційному розчині при заморожуванні гамет корів (табл. 2). Ефективнішим при отриманні *in vitro* ранніх зародків великої рогатої худоби (2–16 клітин), і на доімплантаційних стадіях їх розвитку (морула та бластоциста) виявилось застосування етиленгліколю (вар. В, 25,6 та 3,2 %, відповідно), порівняно з використанням гліцерину (вар. А, 9,5 та 0,0 %, відповідно), та пропандіолу (вар. Б, 15,3 та 1,5 %, відповідно).

Таблиця 2

Результати запліднення *in vitro* деконсервованих яйцеклітин корів, що були заморожені з використанням різних кріопротекторів

Варіант досліджу	Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадіях:									
		2-клітинних		3–4-клітинних		5–8-клітинних		9–16-клітинних		морула + бластоциста	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
А	116	11	9,5 ^a ±2,7	9	7,8±2,5	5	4,3±1,9	2	1,7±1,2	–	–
Б	131	20	15,3 ^{ad} ±3,1	14	10,7±2,7	10	7,6±2,3	7	5,3±2,0	2	1,5±1,1
В	125	32	25,6 ^b ±3,9	27	21,6±3,7	24	19,2±3,5	16	12,8±3,0	4	3,2±1,6
К	104	44	42,3 ^c ±4,8	38	36,5±4,7	31	29,8±4,5	23	22,1±4,1	14	13,5±3,3

Примітка: b : c; b : d — P < 0,01; a : b; a : c; c : d — P < 0,001

У контролі (без заморожування) показники *in vitro* отримання ембріонів великої рогатої худоби на ранніх і на доімплантаційних стадій розвитку становили 42,3 і 13,5 %.

Таким чином, дослідження встановили різну кріорезистентність кріопротекторів, що проявляється у властивості деконсервованих ооцитів дозрівати поза організмом до метафази-2 мейозу та різна життєздатність запліднених яйцеклітин *in vitro*. Ця нерівномірність корелює з хромосомними порушеннями і в загальному характерна для всіх досліджених ооцит-кумулясних комплексів корів. Дослідження підтверджують припущення про те, що на рівень життєздатності деконсервованих гамет має вплив не тільки технологія глибокого заморожування і розморожування, а й кріопротектори, які є осмотично активними речовинами і при застосуванні впливають на клітини.

ВИСНОВКИ

Використання етиленгліколю у еквілібраційному розчині при кріоконсервуванні ооцит-кумулясних комплексів корів сприяє збільшенню на 6,3–11,7 % кількості дозрілих до метафази-2 мейозу та зменшення на 7,2–12,4 % кількості гамет із хромосомними порушеннями та отримано на 10,3–16,1 % більше зародків великої рогатої худоби на відміну від застосування гліцерину і пропандіолу.

Перспективи подальших досліджень. Слід отримувати ембріони з деконсервованих ооцитів корів як для наукових цілей, так і для практичного використання.

COMPARATIVE ANALYSIS APPLICATION OF DIFFERENT CRYOPROTECTORS IS IN EQUILIBRATION SOLUTION AT CRYOPRESERVATION OF COWS GAMETES

P. A. Trotskiy

SUMMARY

The results of experimental researches on cryopreservation oocytes-cumulus complexes cows with the use of different cryoprotectors in equilibration solution and viability and subsequent development in vitro gametes after they were frozen-thawed are resulted in this article. It was established, that the use of ethylene glycol in equilibration solution at cryopreservation oocytes-cumulus complexes of cows is more effective comparatively with glycerol and propandiol. Ripening of cows frozen-thawed gametes out of organism was conducted. Morphological and cytogenetic analyses of ovules and obtained in vitro cattle embryos were also conducted.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ В ЭКВИЛИБРАЦИОННОМ РАСТВОРЕ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ ГАМЕТ КОРОВ

П. А. Троцкий

А Н Н О Т А Ц И Я

Приведены результаты экспериментальных исследований по криоконсервированию ооцит-кумулюсных комплексов коров с использованием различных криопротекторов в эквilibрационном растворе, оценена жизнеспособность и последующее развитие in vitro гамет после деконсервирования. Установлено, что использование этиленгликоля в эквilibрационном растворе при криоконсервировании ооцит-кумулюсных комплексов коров более эффективно по сравнению с глицерином и пропандиолом. Проведено созревание вне организма деконсервованных гамет коров, морфологический и цитогенетический анализы яйцеклеток и полученных in vitro эмбрионов крупного рогатого скота.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Буркат В. П.* Третє тисячоліття — ера біотехнологічної селекції / В. П. Буркат // Вісник аграрної науки. — 2000. — № 12. — С. 118–119.
2. *Безуглий М. Д.* Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин / М. Д. Безуглий. — Харків, 2002. — 155 с.
3. *Hochi H.* In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer / H. Hochi // Theriogenology. — 2003. — V. 59, I. 2. — P. 553–697.
4. *Руденко Є. В.* Роль і перспективи сучасних методів біотехнології в умовах інтенсифікації тваринництва / Є. В. Руденко, О. Є. Гузеватий // НБТ. — Харків, 2008. — № 96. — С. 44–49.
5. *Безуглий М. Д.* Розвиток біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин / М. Д. Безуглий, О. Є. Гузеватий // Вісник аграрної науки. — 2006. — № 12. — С. 83–86.
6. *Осташко Ф. И.* Биотехнология воспроизводства крупного рогатого скота / Ф. И. Осташко. — К. : Аграрна наука, 1995. — 183 с.
7. *Гузеватий О. Є.* Методики оцінки якості ооцит-кумулюсних комплексів корів для криоконсервування : методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві / О. Є. Гузеватий, П. А. Троцький, Ю. М. Собко. — К. : Аграрна наука, 2005. — С. 180–187.
8. *Tarkowski A. K.* An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A. K. Tarkowski // Cytogenetics. — 1966. — V. 5. — P. 394–400.
9. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid / J. J. Parrish, J. L. Susko-Parrish, R. R. Handron et al. // Biol. Reprod. — 1989. — V. 40. — 3. — P. 1020–1025.
10. Relationship between the cell number and Quality of Day-8 bovine blastocysts / M. Ushijima, M. Okuda, T. Nakajama et al. // Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans. — 1988. — № 9. — P. 37–38.

Рецензент: завідувач відділу генетики Інституту розведення і генетики тварин НААН України, кандидат сільськогосподарських наук К. В. Копилов.