

УДК 636.2:57.086.83:591.31

ОЦІНКА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ДЕКОНСЕРВОВАНИХ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ КОРІВ, ЗАМОРОЖЕНИХ НАДШВИДКИМ МЕТОДОМ

П.А. ТРОЦЬКИЙ

Інститут розведення і генетики тварин НААН

Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н, с. Чубинське, вул. Погребняка, 1

e-mail: trotskiy_pa@ukr.net

Наведено результати експериментальних досліджень із оцінки життєздатності деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів корів кріоконсервованих надшвидким методом. Проведено культивування *in vitro* гамет корів, що були кріоконсервовані при використанні різних концентрацій етиленгліколю і пропандіолу з наступним їх заплідненням та морфологічний і цитогенетичний аналізи яйцеклітин і отриманих *in vitro* ембріонів. Встановлено, що життєздатність деконсервованих гамет корів заморожених надшвидким методом залежить від концентрації етиленгліколю і пропандіолу у еквілібраційному і вітрифікаційному розчинах.

Ключові слова: ембріони, кріоконсервування, ооцит-кумулясні комплекси, кріопротектори, етиленгліколь, пропандіол, вітрифікаційний розчин, дозрівання *in vitro*.

Вступ. Методи зберігання ооцитів і ембріонів надзвичайно важливі для розвитку тваринництва, біології та медицини. Дослідники, які працюють у галузі біології розвитку ссавців, зокрема великої рогатої худоби, постійно стикаються з проблемою одержання гамет самиць на різних стадіях мейозу та ембріонів різних стадій розвитку. Проте постійне їх отримання в необхідній кількості потребує великих затрат часу і фінансів. Глибоке заморожування в рідкому азоті до температури $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (в такому стані клітини можуть зберігатись роками) може деякою мірою вирішити цю проблему. Інтенсивна розробка і впровадження у виробництво технології трансплантації ембріонів великої рогатої худоби також спонукала до розробки методу зберігання гамет у рідкому азоті з використанням кріопротекторів [1 – 4]. З аналізу літературних даних відомо, що кріоконсервування гамет тварин і особливо корів достатньо інформативні і свідчать про великий інтерес вчених і практиків до вивчення цієї проблеми. Основні дослідження були направлені на вивчення дії кріопротекторів на гамети при кріоконсервуванні, розробку сучасних методів їх збереження та вивчення процесів кріопшкодження і криозахисту. Важливе значення для впровадження методів кріоконсервування, зберігання і практичного використання генетичного матеріалу в племінному тваринництві є інтенсивне використання ооцитів, яйцеклітин і ембріонів сільськогосподарських тварин, отриманих як *in vivo*, так і *in vitro*. Непередбачуваність результатів кріоконсервування гамет корів у кожному окремому випадку робить процес їх заморожування технологічним і затратним. У зв'язку з цим вивчення технологічних питань використання кріопротекторів у еквілібраційному та вітрифікаційному розчинах є досить актуальним [5 – 8].

© П.А. ТРОЦЬКИЙ, 2011

Метою досліджень було оцінити життєздатність і дозрівання поза організмом деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів корів, що були кріоконсервовані надшвидким методом з використанням різних концентрацій етиленгліколю і пропандіолу в еквілібраційному та вітрифікаційному розчинах.

Матеріали і методи

Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулясні комплекси корів. Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко, вилувлювали пастерівською піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками під мікроскопом. Для заморожування використовували ооцити корів із гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом. Перед заморожуванням гаметети обробляли еквілібраційним розчином (10 хв.) потім переносили у вітрифікаційний розчин (30 с). Еквілібраційний та вітрифікаційний розчини були приготовлені (об'ємне співвідношення) на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20 % сироватки крові корів, яку попередньо інактивували при 56 °С протягом 30 хв. Виведення кріопротекторів після розморожування гамет корів 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-кумулясні 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 МОд/мл лютеїнізуючого гормону, 2,0 мМ натрію пірувату, 2,92 мМ кальцію лактату, 40 мкг/мл гентаміцину.

Частина гамет корів після культивування поза організмом підлягала цитогенетичному аналізу, цитогенетичні препарати готували за методом Tarkowski A.K. [9], забарвлювали 2,0 % розчином Гімза та досліджували під мікроскопом. Решта нативних (контрольна група) та деконсервованих яйцеклітин після дозрівання поза організмом підлягала 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. [10]. 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 після запліднення *in vitro* та зародків готували за методом Ushijima M. et al. [11].

Результати та обговорення

Добір і використання певних концентрацій і співвідношень кріопротекторів у еквілібраційному і вітрифікаційному розчинах при кріоконсервуванні є одним із основних чинників, що забезпечують життєздатність і подальший розвиток поза організмом деконсервованих гамет. На рис. 1 наведено результати застосування різних концентрацій етиленгліколю і пропандіолу у еквілібраційному розчині при кріоконсервуванні ооцит-кумулясних комплексів корів. У варіантах досліді А-Д використовували поступове збільшення концентрації етиленгліколю з 5 до 25 % та відповідне зменшення концентрації пропандіолу з 25 до 5 % у загальному об'ємі еквілібраційного розчину (загальний об'єм становив 30 %). Варіант досліді К був контролем, в якому культивували *in vitro* нативні ооцит-кумулясні комплекси корів.

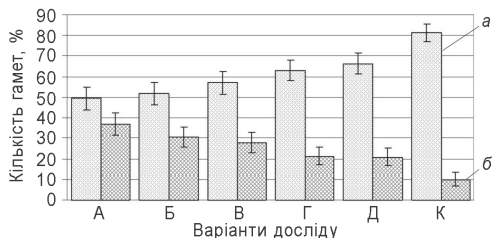


Рис. 1. Застосування різних концентрацій етиленгліколю і пропандіолу в еквілібраційному розчині при заморожуванні ооцит-кумулясних комплексів корів: а – метафаза–2, б – хромосомні порушення; А – 5 % етиленгліколю + 25 % пропандіолу; Б – 10 % етиленгліколю + 20 % пропандіолу; В – 15 % етиленгліколю + 15 % пропандіолу; Г – 20 % етиленгліколю + 10 % пропандіолу; Д – 25 % етиленгліколю + 5 % пропандіолу; К – контрольна група (без заморожування)

За результатами експериментальних досліджень встановлено взаємозв'язок між рівнем концентрації кріопротекторів етиленгліколю та пропандіолу у еквілібраційному розчині та рівнем мейотичного дозрівання деконсервованих ооцитів корів. Доведено, що на життєздатність деконсервованих гамет впливає концентрація і співвідношення кріопротекторів у еквілібраційному розчині за такими показниками як кількість дозрілих до метафази–2 мейозу та кількість клітин з хромосомними порушеннями.

Наступним завданням наших досліджень було визначити оптимальну концентрацію етиленгліколю і пропандіолу у вітрифікаційному розчині, що забезпечить нам високі результати дозрівання деконсервованих ооцитів корів поза організмом. На рис. 2 наведено результати використання різних концентрацій етиленгліколю і пропандіолу у вітрифікаційному розчині при кріоконсервуванні ооцит-кумулясних комплексів корів. Проведені експериментальні дослідження з порівняння різних концентрацій кріопротекторів у вітрифікаційному розчині при кріоконсервуванні гамет корів за умов збільшення концентрації етиленгліколю з 10 до 40 % та

відповідне зменшення концентрації пропандіолу з 40 до 10 % (загальний об'єм становив 50 %). За результатами наших досліджень встановлено, що зменшення концентрації кріопротекторів етиленгліколю і збільшення концентрації пропандіолу у загальному об'ємі вітрифікаційного розчину впливає на життєздатність та дозрівання до метафази–2 мейозу ооцитів корів.

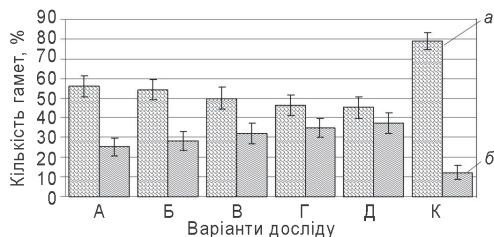


Рис. 2. Використання різних концентрацій етиленгліколю і пропандіолу у вітрифікаційному розчині при заморожуванні ооцит-кумулясних комплексів корів: а – метафаза–2, б – хромосомні порушення; А – 10 % етиленгліколю + 40 % пропандіолу; Б – 20 % етиленгліколю + 30 % пропандіолу; В – 25 % етиленгліколю + 25 % пропандіолу; Г – 30 % етиленгліколю + 20 % пропандіолу; Д – 40 % етиленгліколю + 10 % пропандіолу; К – контрольна група (без заморожування)

Проведені експериментальні дослідження із запліднення *in vitro* попередньо дозрілих поза організмом деконсервованих яйцеклітин корів, що були заморожені з використанням різних концентрацій етиленгліколю і пропандіолу. Встановлено, що в групі А, в якій склад еквілібраційного розчину становив 5 % етиленгліколю + 25 % пропандіолу, а вітрифікаційного 40 % етиленгліколю + 10 % пропандіолу (дані наведені в таблиці) загальний показник дроблення яйцеклітин після запліднення *in vitro* і 96 годинного подальшого культивування становить 5,2 %. В той час як в групі Б, в якій еквілібраційний розчин складався з 25 % етиленгліколю + 5 % пропандіолу, а вітрифікаційний розчин – з 10 % етиленгліколю + 40 % пропандіолу дроблення яйцеклітин спостерігали у 12,6 % випадках. В контрольній групі К, в якій для

Таблиця. Результати запліднення *in vitro* деконсервованих яйцеклітин корів, що були заморожені з використанням різних концентрацій етиленгліколю і пропандіолу

Варіанти дослідів	Кількість клітин, що підлягали заплідненню	Термін культивування після запліднення, год.	Кількість ембріонів на стадіях:							
			2–4 клітинних		5–8 клітинних		9–16 клітинних		всього	
			п	%	п	%	п	%	п	%
А	115	96	2	1,7 ±1,2	3	2,6 ±1,5	1	0,9 ±0,9	6	5,2 ^а ±2,1
Б	103	96	3	2,9 ±1,7	6	5,8 ±2,3	4	3,9 ±1,9	13	12,6 ^а ±3,3
К	93	96	7	7,5 ±2,7	9	9,7 ±3,1	21	22,6 ±4,3	37	39,8 ^б ±5,1

Примітка: а : б- $P < 0,001$

дозрівання і запліднення *in vitro* використовували нативні ооцит-кумулюсні комплекси корів, показник дроблення гамет становив 39,8 %.

Таким чином, на основі одержаних нами даних кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів корів з різними концентраціями та поєднаннями кріопротекторів етиленгліколю та пропандіолу у еквілібраційному та вітрифікаційному розчинах, вважаємо, що поєднання цих двох кріопротекторів забезпечують при високих кріопротекторних властивостях меншу токсичність еквілібраційного та вітрифікаційного розчинів, що, в свою чергу, сприяє більш повноцінному дозріванню деконсервованих ооцитів. Це припущення підтверджується в роботах [12 – 14], де показано підвищення рівня дозрівання і запліднення деконсервованих і дозрілих поза організмом ооцитів при застосуванні комплексу кріопротекторів. Разом із тим, в останні роки все активніше стали застосовувати метод кріоконсервування ооцитів, яйцеклітин і ембріонів, який включає пряме занурення пайєт з біооб'єктом в рідкий азот. Зважаючи на це, розробка ефективних способів визначення оптимальних концентрацій кріопротекторів у еквілібраційному та вітрифікаційному розчинах є актуальною і для вирішення проблеми кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів корів.

Висновки

Встановлено, що використання для кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів корів 25 % етиленгліколю і 5 % пропандіолу у еквілібраційному розчині та 10 % етиленгліколю і 40 % пропандіолу у вітрифікаційному розчині сприяє збільшенню на 7,4 % кількості отриманих зародків після запліднення *in vitro* деконсервованих гамет.

Перелік літератури

1. Безуглий М.Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин – Харків, 2002. – 155 с.
2. Mapletoft R.J. Embryo transfer technology for the enhancement of animal reproduction // *Biotechnology*. – 1994. – № 8. – P. 149–160.
3. Woods E.J., Benson J.D., Agca Y., Crister J.K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue // *Cryobiology*. – 2004. – Vol. 48. – P. 146–156.
4. Vajta G., Kuwayama M. Improving cryopreservation systems // *Theriogenology*. – 2006. – Vol. 65, № 1. – P. 236–244.
5. Gupta M.K., Uhm S.J., Lee H.T. Cryopreservation of immature and *in vitro* matured porcine oocytes by solid surface vitrification // *Theriogenology*. – 2007. – Vol. 67, № 2. – P. 238–248.
6. Bautista J.A., Kanagawa H. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: ethylene glycol as emerging cryoprotectant of choice // *Jpn. J. Vet. Res.* – 1998. – Vol. 45, № 1. – P. 183–191.
7. Massip A. Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments // *Reprod. Nutr. Dev.* – 2003. – Vol. 43. – P. 325–330.
8. Checura C.M., Sidel G.E.Jr. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes // *Theriogenology*. – 2007. – Vol. 67, № 5. – P.919–930.

9. Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // *Cytogenetics*. – 1966. – Vol. 5, № 3. – P. 394–400.
10. Parrish J.J., Sushko-Parrish J.L., Handron R.R. et al. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid // *Biol.Reprod.* – 1989. – Vol. 40. – P. 1020–1025.
11. Ushijima M., Okuda M., Nakajama T. et al. Relationship between the cell number and Quality of Day-8 bovine blastocysts // *Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans.* – 1988. – № 9. – P. 37–38.
12. Rizos D., Ward D., Baland J.P., Lonergan P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification // *Theriogenology*. – 2001. – Vol. 56, № 1. – P. 1–16.
13. Halas A.N., Collins G.M. Studies in cryoprotection II: propylene glycol and glycerol // *Cryobiology*. – 1984. – Vol. 21. – P. 144.
14. Hurrт A.E., Landim-Alvarenga F., Seidel G.E., Squires E.L. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficol and sucrose solution using open-pulled straw // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 54, № 1. – P. 119–128.

Представлено С.І. Ковтун
Надійшла 29.04.2011

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ
ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫХ
ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ
КОРОВ, ЗАМОРОЖЕННЫХ СВЕРХБЫСТРЫМ
МЕТОДОМ

П.А. Троцкий

Институт разведения и генетики животных НААН
Украины
Украина, 08321, Киевская обл., Бориспольский
р-н, с. Чубинское, ул. Погребняка, 1
e-mail: trotskiy_pa@ukr.net

Приведены результаты экспериментальных исследований по оценке жизнеспособности деконсервированных ооцит-кумулюсных комплексов коров криоконсервированных сверхбыстрым методом. Проведено культивирование *in vitro* гамет коров, которые были криоконсервированы при использовании различных концентраций этиленгликоля и

пропандиола с последующим их оплодотворением, морфологический и цитогенетический анализы яйцеклеток и полученных *in vitro* эмбрионов. Установлено, что жизнеспособность деконсервованных гамет коров замороженных сверхбыстрым методом зависит от концентрации этиленгликоля и пропандиола в эквивибрационном и витрификационном растворах.

Ключевые слова: эмбрионы, криоконсервирование, ооцит-кумулюсные комплексы, криопротекторы, этиленгликоль, пропандиол, витрификационный раствор, созревание *in vitro*.

ESTIMATION OF VIABILITY FOR COWS'
FROZEN-THAWED OOCYTE-CUMULUS
COMPLEXES FROZEN BY ULTRAFAST
METHOD

P.A. Trotskiy

Institute of animals breeding and genetics NAAS
of Ukraine
Ukraine, 08321, Kyiv Region, Boryspil District, v.
Chubinsky, Pogrebnyaka, 1
e-mail: trotskiy_pa@ukr.net

The results of experimental researches on estimation of viability for cows' frozen-thawed oocyte-cumulus complexes cryopreserved by an ultrafast method have been presented. There was performed cultivation *in vitro* of cow gametes to be cryoconserved using various levels of ethylenglycol and propandiol with their further fertilization as well as cytogenetic analysis of oocytes and *in vitro* derived embryos. The viability of deconserved cows' gametes frozen by ultra fast method may depend on ethylenglycol and propandiol levels in equilibration and vitrification solutions.

Key words: embryos, cryopreservation, oocyte-cumulus complexes, cryoprotectors, ethylenglykol, propandiol, vitrification solution, maturations *in vitro*.