

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ КОРІВ З ВИКОРИСТАННЯМ РІЗНИХ ВІТРИФІКАЦІЙНИХ РОЗЧИНІВ

О.Є. Гузеватий

Українська академія аграрних наук

П.А. Троцький

Інститут розведення і генетики тварин УААН

У статті наведено результати використання різних вітрифікаційних розчинів при заморожуванні гамет корів. Встановлено оптимальну концентрацію (50 %) гліцерину і пропандіолу у загальному об'ємі вітрифікаційного розчину, що забезпечує дозрівання поза організмом 52,1 % деконсервованих ооцитів корів до метафази-2 мейозу.

Ключові слова: біотехнологія, корова, кріоконсервування, ооцит-кумулюсні комплекси, кріопротектори, вітрифікаційний розчин, дозрівання *in vitro*.

Нині внаслідок інтенсивного розвитку і успіхів сучасної біотехнології виникла можливість розвитку принципово нових ефективних методів збереження репродуктивних клітин сільськогосподарських тварин. Розробка і удосконалення методів кріоконсервування гамет самиць та одержання в умовах *in vitro* ембріонів із деконсервованих, дозрілих поза організмом яйцеклітин корів зі подальшим їх заплідненням *in vitro* є одним із методів збереження генофонду великої рогатої худоби та базовим методом отримання необхідного біологічного матеріалу для експериментальних досліджень у багатьох країнах світу [1-4]. Разом із тим, незважаючи на певні успіхи за останнє десятиліття у цьому напрямі досліджень, у багатьох лабораторіях спостерігаються значні відмінності як до методичних підходів, так і до умов заморожування-розморожування, культивування і запліднення *in vitro* гамет самиць, зокрема для ооцит-кумулюсних комплексів корів, які у свою чергу значно відрізняються від ситуації, яка існує *in vivo*, де розвиток ооцитів відбувається на основі скоординованої зміни і взаємодії цілої низки різних чинників, що, безумовно, пояснює різноманітність отриманих результатів досліджень [5-8].

У наших дослідженнях для кріоконсервування ооцит-кумулюсних комплексів корів були використані кріопротектори гліцерин та пропандіол у різних концентраціях. Метою досліджень було встановлення їх оптимальної концентрації у загальному об'ємі вітрифікаційного розчину при заморожуванні гамет корів.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулюсні комплекси корів. Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко, виловлювали пастерівською піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками. Для заморожування використовували ооцити з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом [9]. Перед заморожуванням гамети корів спочатку 10 хвилин обробляли еквілібраційним розчином, потім 30 с переносили у вітрифікаційний розчин, вміщували у пластикові пайєти і занурювали у рідкий азот. Після розморожування гамет виведення кріопротекторів із них проводили шляхом перенесення їх на 10 хв у розчин 1,0 М сахарози. Потім клітини

відмивали середовищем 199, оцінювали за морфологічними ознаками і культивували протягом 27 год при температурі 38,5 °С; 5 % CO₂ у повітрі. Культивування проводили у краплях середовища 199, з додаванням 10 %-ї попередньо інактивованої сироватки корів, гормональних препаратів (2,5 мкг/мл фолікулостимулюючого гормону, 2,5 Мод/мл лютеїнізуючого гормону, 1 мкг/мл естрадіолу), 2,0 мМ натрію пірувату, 2,92 мМ кальцію лактату і 40 мкг/мл гентаміцину. Після культивування ооцити підлягали морфологічному і цитогенетичному аналізу. Цитогенетичні препарати готували за методом Tarcowski A.K. [10], забарвлювали 10 %-ним розчином Гімза та досліджували під мікроскопом. Отримані результати статистично обробляли з використанням критеріїв Стюдента [11].

Результати досліджень. У таблиці наведено дані з поєднання кріопротекторів гліцерину і пропандіолу та використання їх у різних концентраціях у вітрифікаційному розчині при кріоконсервуванні ооцит-кумуляюсних комплексів корів.

Використання різних концентрацій кріопротекторів у вітрифікаційному розчині при заморожуванні ооцит-кумуляюсних комплексів корів

Варіанти дослідів			А	Б	В	Г	Д	К
Показники								
Склад кріопротекторів у вітрифікаційному розчині			15%Г+1 5%ПД	20%Г+2 0%ПД	25%Г+2 5%ПД	30%Г+3 0%ПД	35%Г+3 5%ПД	—
Кількість прокультивованих клітин			78	67	73	63	54	51
Кількість клітин на	диплої + діакінезі + метафази-1	n	5	6	9	11	8	6
		%	6,5 ±2,8	9,0 ±3,5	12,3 ±3,8	17,5± 4,8	14,8 ±4,8	11,8 ±4,5
	анафази + телофази	n	3	1	6	4	5	2
		%	3,8 ±2,2	1,5 ±1,5	8,2 ±3,2	6,3 ±3,1	9,3 ±3,9	3,9 ±2,7
	метафази-2	n	-	7	38	31	25	35
		%	-	10,4 ^c ±3,7	52,1 ^b ±5,8	49,2 ^b ±6,3	46,3 ^b ±6,8	68,6 ^a ±6,5
Кількість клітин з хромосомними порушеннями	всього	n	70	53	20	17	16	8
		%	89,7 ^d ±3,4	79,1 ^d ±5,0	27,4 ^e ±5,2	27,0 ^e ±5,6	29,6 ^e ±6,2	15,7 ^e ±5,1
	з них на метафази-2	n	-	3	4	2	3	3
		%	-	5,7 ±3,2	20,0 ±8,9	11,8 ±7,8	18,6 ±9,8	37,5 ±17,1

Примітка. a : b – P < 0,05; a : c, b : c, e : d – P < 0,001.

Так в експериментальних групах А і Б, в яких ооцит-кумулясні комплекси корів перед заморожуванням обробляли спочатку еквілібраційним розчином (10 % гліцерин + 10 % пропандіол + 20 % попередньо інактивованої фетальної сироватки корів у фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко) упродовж 10 хвилин, а потім на 30 с переносили до вітрифікаційного розчину (гр.А – 15 % гліцерин + 15 % пропандіол, гр.Б – 20 % гліцерин + 20 % пропандіол) дозрівання поза організмом протягом 27 год деконсервованих ооцитів корів виявилось неефективним, переважна більшість гамет самиць (79,1-89,7 %) у цих експериментальних групах мали порушення хромосомного апарата.

На відміну від гр.А і Б, результати експериментальних досліджень з кріоконсервування ооцитів корів груп В, Г і Д, в яких ооцит-кумулясні комплекси корів перед заморожуванням обробляли 10 хвилин еквілібраційним розчином (10 % гліцерин + 20 % пропандіол + 20 % попередньо інактивованої фетальної сироватки корів у фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко), а потім 30 с вітрифікаційним розчином (гр.В – 25% гліцерин + 25% пропандіол, гр.Г – 30% гліцерин + 30% пропандіол, гр.Д – 35% гліцерин + 35% пропандіол) виявили, що рівень дозрівання поза організмом деконсервованих ооцитів корів становив 52,1; 49,2; 46,3 % відповідно у гр. В, Г і Д, а в контрольній групі, в якій використовували нативні ооцит-кумулясні комплекси (без заморожування), показник дозрівання до метафази-2 мейозу становив 68,6 %. У 15,7 % ооцитів контрольної групи спостерігали хромосомні порушення після культивування, а аналогічний показник в даних експериментальних групах становив 27,0-29,6 %.

Таким чином, проведений порівняльний аналіз різних концентрацій гліцерину і пропандіолу у вітрифікаційному розчині при кріоконсервуванні ооцит-кумулясних комплексів корів виявив, що використання їх у концентрації 30 і 40 % у загальному об'ємі вітрифікаційного розчину неефективно порівняно із застосуванням інших концентрацій кріопротекторів (50-70 %). У той же час збільшення концентрації цих кріопротекторів з 50 % до 70 % у загальному об'ємі вітрифікаційного розчину не призводить до збільшення після заморожування-розморожування і культивування показника кількості життєздатних та дозрілих до метафази-2 мейозу яйцеклітин корів та зменшення показника кількості гамет самиць з порушенням хромосомного матеріалу.

Висновок. Збільшення концентрації кріопротекторів (гліцерину і пропандіолу) з 50 % до 70 % у загальному об'ємі вітрифікаційного розчину не призводить до збільшення кількості життєздатних та дозрілих до метафази-2 мейозу деконсервованих гамет корів.

Бібліографічний список

1. Зубець М.В., Гузеватий О.Є., Ясінський В.В. Кріоконсервація ооцитів – один з шляхів збереження генофонду сільськогосподарських тварин// Тваринництво України.- 1994.- №3.- С.15.
2. Rexroad C.E.Jr., Green R.D., Wall R.J. Regulation of animal biotechnology: Research needs// Theriogenology.- 2007.- V.68.- Suppl.1.- P.S3-S8.
3. Le Gal F., Massip A. Cryopreservation of cattle oocytes: effect of meiotic stage, cycloheximide treatment and vitrification procedure// Cryobiology.- 1999.-V.24.- №4.- P.290-300.
4. Massip A. Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments// Reproduction, Nutrition and Development.- 2003.- V.43.- P.325-330.
5. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизводства крупного рогатого скота.- К.: Аграрна наука.- 1995.- 183 с.

6. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue/ E.J.Woods, J.D.Benson, Y.Agca, J.K.Crister// Cryobiology.- 2004.- V.48.- P.146-156.
7. Безуглий М.Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин.- Х., 2002.- 155 с.
8. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures/ Gardner D.K., Sheehan C.B., Rienzi L. et all// Theriogenology.- 2007.- V.67.- I.1.- P.64-72.
9. Гузеватий О.Є., Троцький П.А., Собко Ю.М. Методики оцінки якості ооцит-кумулюсних комплексів корів для кріоконсервування //Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві.- К.: Аграрна наука, 2005.- С.180-187.
10. Tarkowski A.K. An air drying method for chromosoma preparation from mouse eggs //Cytogenetics.- 1966.- V.5.- P.394-400.
11. Лакин Г.Ф. Биометрия.- Москва: Высшая школа, 1990.- 351 с.

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ КОРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ВИТРИФИКАЦИОННЫХ РАСТВОРОВ

О.Е. Гузеватый, Украинская академия аграрных наук

П.А. Троцкий, Институт разведения и генетики животных УААН

В статье приведены результаты использования различных витрификационных растворов при замораживании гамет коров. Определена оптимальная концентрация (50 %) глицерина и пропандиола в общем объеме витрификационного раствора, что обеспечивает созревание вне организма 52,1 % деконсервированных ооцитов коров до метафазы-2 мейоза .

Ключевые слова: биотехнология, корова, кріоконсервирование, ооцит-кумулюсные комплексы, кріопротекторы, витрификация, in vitro.

FREEZING PRESERVATION OF THE OOZYTE-CUMULUS COMPLEXES OF THE COWS BY THE VARIOUS IN-VITRO SOLUTION APPLICATION

O. Guzevatiy, the Ukrainian academy of agrarian sciences

P. Trozkiy, the institute of breeding & genetics of the animals, UAAS

This article highlights the experimental research results on the various in-vitro solution application by the cow gamete freezing. Optimal 50 % glycerol & propandiol concentration in the total amount of in-vitro solution was identified. The above-mentioned concentration procures 52,1 % cow oocyte in-vitro maturation after thaw. Maturation is prolonged by 2 metaphase.

Key words: biological technology, cow, freezing preservation, oocyte-cumulus complexes, freezing protectors, in-vitro solution, in-vitro maturation.