

ПІДВИЩЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОСТІ ПРОЦЕСУ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ ООЦИТІВ МИШІ НА ОСНОВІ ВИКОРИСТАННЯ ВИСОКИХ ШВИДКОСТЕЙ ТЕПЛООБМІНУ

А.С. Саліна

Інститут тваринництва УААН

На підставі вивчення осмотичної реакції ооцитів миші у розчинах кріопротекторів для вітрифікації, а також при дослідженні впливу часу еквілібрації ооцитів у розчинах кріопротекторів на їх збереженість після деконсервації було зроблено висновок про доцільність виключення етапу попередньої витримки в еквіліруючих розчинах і використання тільки вітрифікуючих під час кріоконсервації ооцитів миші з високими швидкостями заморожування, а це, в свою чергу, підвищить технологічність кріоконсервації.

ооцити, збереженість, кріоконсервація, еквіліруючий розчин, вітрифікуючий розчин, кріопротектор

У даний час більшість вчених віддають перевагу способу низькотемпературної консервації ооцитів ссавців за допомогою вітрифікації [1-5], яка припускає використання високих концентрацій кріопротекторів у сполученні з високими та надвисокими швидкостями охолодження. Проте практично всі захисні речовини, які застосовуються в даний час, є осмотично активними і викликають зміни в клітинах. Ці зміни пов'язані з потоками води та кріопротектора у клітину та з неї при насиченні та виведенні захисних речовин [6]. За певних умов вони можуть бути згубними для ооцитів та ембріонів ссавців. Не менше значення для життєздатності біологічного об'єкта у процесі кріоконсервації мають режими заморожування та відтавання. Одним із важливих питань щодо заморожування ооцитів ссавців з високими швидкостям є використання захисних речовин в процесі вітрифікації, а саме концентрації еквіліруючих та вітрифікуючих розчинів і час витримки в них ооцитів. В теперішній час багатьма дослідженнями підтверджено, що витримка ооцитів у вітрифікаційному розчині повинна бути якомога коротша [2-4]. Щодо експозиції в еквіліруючому розчині, то існують різні точки зору: час витримки змінюється від 10 хвилин [4] до 2 хвилин [5-6]. Проведений аналіз вітчизняної та іноземної літератури з питання оптимізації способу насичення та виведення захисних речовин при вітрифікації ооцитів ссавців, показує, що у найбільш ефективних схемах вітрифікації, які після використання давали високий рівень збереженості за морфологічними показниками, поширеними кріопротекторами є етиленгліколь (ЕГ), діметилсульфоксид (ДМСО) та сахароза з різними варіаціями концентраційних співвідношень від 30 до 40% ЕГ (або ДМСО) +7-10% сахарози, рівень збереженості $S=84-95\%$, [2, 4, 7, 8]. За даними багатьох авторів концентрація етиленгліколю і діметилсульфоксиду до 6М не спричиняє значних пошкод-

жень, не викликає морфофункціональних порушень і є ефективним захисним агентом при проведенні процедур вітрифікації цих клітин. Виходячи з вищесказаного вважаємо за необхідне провести дослідження по удосконаленню методів вітрифікації ооцитів ссавців.

Мета роботи – удосконалити метод кріоконсервації ооцитів миші на основі застосування високих швидкостей охолодження.

Методика досліджень. Об'єктом дослідження були фізіологічно повноцінні ооцити миші без атретичних змін. Ооцити вилучали з яєчників без патологічних порушень за стандартними методиками [9] шляхом проколювання (розрізування) великих фолікулів голкою або мікроножем. Для дослідів відбиралися ооцити миші на стадіях зародкового пухирця (ЗП). Ооцити на стадії ЗП збирали з оваріальних фолікулів через визначений час після введення гонадотропіну сироватки жеребної кобили (ГСЖК) і хоріогонадотропіну людини (ХГЛ). Життєздатність свіжоотриманих ооцитів визначали за морфологічними показниками [10]. Осмотичні зміни об'єкта, а саме час досягнення мінімального об'єму та час його відновлення у розчинах кріопротекторів, вивчали візуально під мікроскопом в розчинах необхідного складу та концентрації при кімнатній температурі 20- 22⁰С. В якості кріопротекторів були вибрані етиленгліколь (ЕГ), діметилсульфоксид (ДМСО) та сахароза. Розчини кріопротекторів готували на фосфатно-сольовому буфері у концентраціях: для ЕГ та ДМСО – 2М і 6М, для сахарози – 0,5М.

Для заморожування з високими швидкостями використовувалися еквілібруючий та вітрифікуючий розчини кріопротекторів. В якості еквілібруючого розчину застосовували розчин 10% ЕГ, а в якості вітрифікуючого розчину - 40% ЕГ + 0,5М сахарози. В якості основного робочого середовища був фосфатно-сольовий буфер Дюльбеко з додаванням 20% фетальної сироватки. Час витримки біооб'єкту в еквілібруючому розчині кріопротектора змінювався від 15 до 0 хвилин. Час експозиції у вітрифікуючому розчині для усіх дослідів становив 30–60 с. Як контейнер для заморожування було використано французьку соломинку (d=2мм), безпосередньо заморожування проводилося занурюванням контейнера у рідкий азот, швидкість заморожування при цьому становила приблизно 30⁰С/с. Усі маніпуляції з ооцитами проводились при кімнатній температурі. Відтавання контейнерів з ооцитами проводилось у водяній бані з магнітною мішалкою при температурі 40⁰С. Виведення кріопротекторів здійснювали у розчині 1М сахарози в один ступінь. Життєздатність заморожено-відталих ооцитів визначалась за морфологічними показниками [10]. Результати оброблялись статистично за загальноновживаними методами.

Результати досліджень. Досліджено вплив попередньої експозиції в еквілібруючих розчинах етиленгліколю (ЕГ), діметилсульфоксиду (ДМСО) у концентрації 2М і вітрифікуючих розчинах ЕГ і ДМСО у концентрації 6М з додаванням сахарози (0,5 М) на осмотичну поведінку ооцитів. Методом світлової мікроскопії одержано залежності зміни відносного об'єму ооцитів з часом у еквілібруючому та вітрифікуючому розчинах (рис.1).

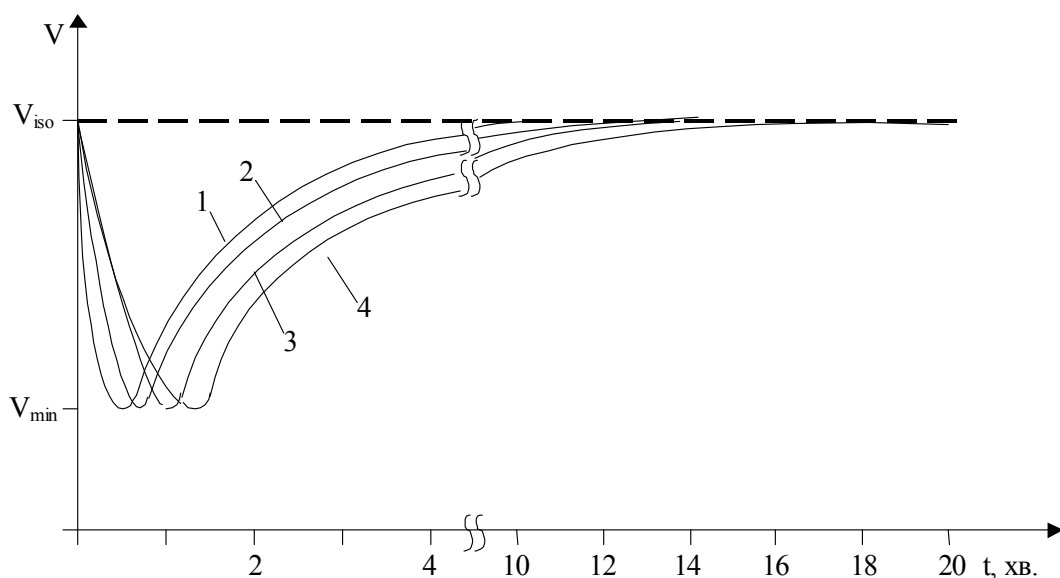


Рис.1. Осмотична поведінка ооцитів миші в розчинах кріопротекторів (1- 6М ЕГ+0,5М сахарози, 2- 6М ДМСО+0,5М сахарози, 3- 2М ЕГ, 4- 2М ДМСО)

Максимального стиску у розчинах 2М ЕГ та ДМСО ооцити досягали за 50÷60с та 80÷90с, а реекспандували за 13÷15хв. та 18÷20хв., відповідно. Мінімального об'єму у розчинах 6М ЕГ та ДМСО з додаванням сахарози клітини досягали за приблизно 30 та 45с, максимально можливо відновлювали об'єм відповідно через 8÷10 та 15÷18хв. Але після витримки біооб'єкта у вітрифікаційному розчині кріопротекторів (особливо в ДМСО) більше 8÷10хв. в ньому спостерігалися морфологічні пошкодження, такі як викривлення зони пелюцида та грануляція цитоплазми.

При послідовному використанні розчинів для попередньої експозиції та для безпосередньої вітрифікації осмотична реакція клітин відбувалася таким чином (рис. 2): швидкий стиск, відновлення на 20÷30%, знову стиск до мінімального об'єму і відновлення до 80% ізотонічного об'єму.

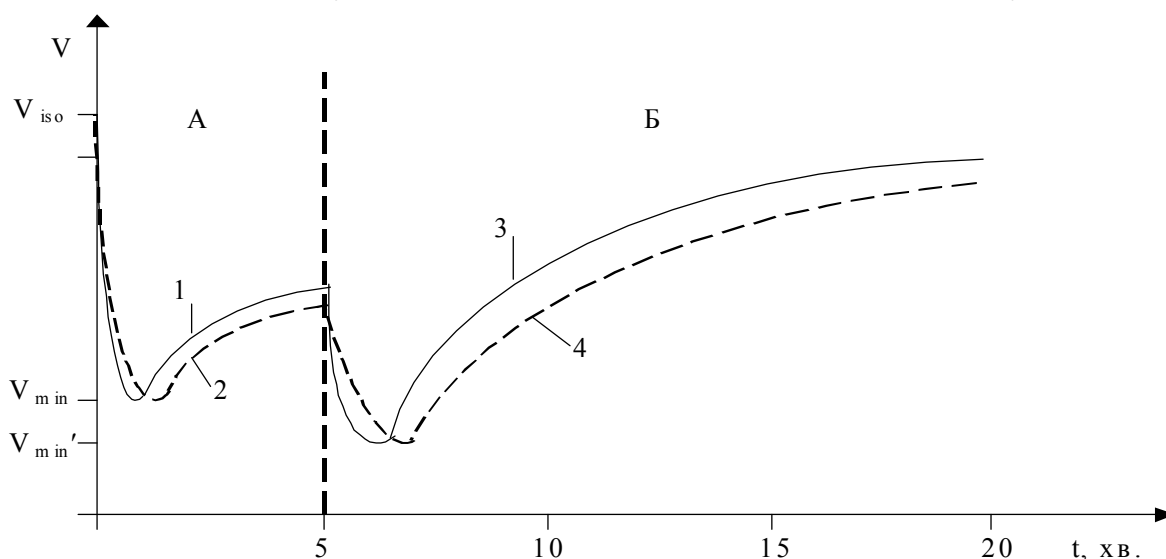
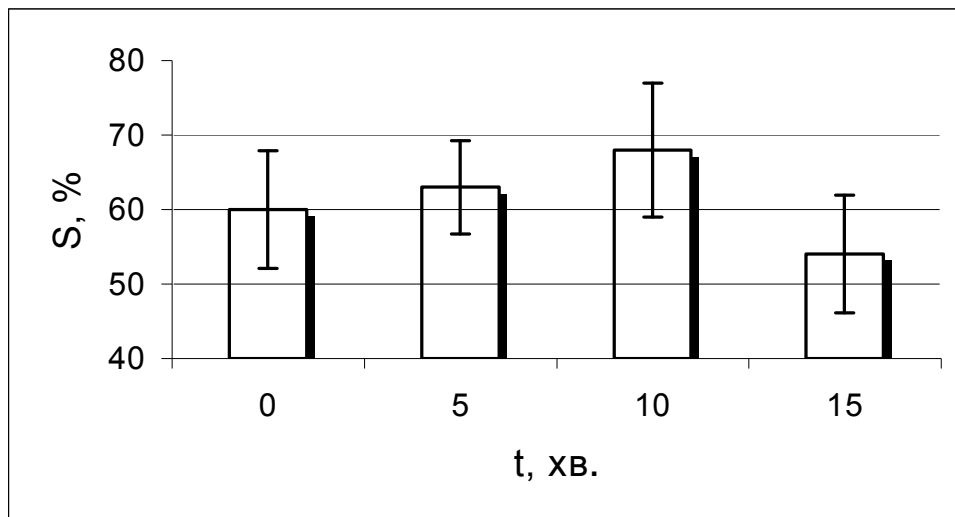


Рис.2. Осмотична поведінка ооцитів миші в еквиліруючих (А) та вітрифікуючих (Б) розчинах (1- 2М ЕГ, 2- 2М ДМСО, 3- 6М ЕГ+0,5М сахарози, 4- 6М ДМСО+0,5М сахарози)

Після попередньої експозиції ооцитів від 2 до 5 хв. клітина встигає відновити свій об'єм лише на третину, а після взаємодії з вітрифікуючим розчином до 5 хв. – наполовину.

Отже, на підставі вивчення осмотичної реакції ооцитів ссавців у розчинах кріопротекторів для вітрифікації визначено, що під час послідовного використання еквілібуючих та вітрифікуючих розчинів повного поновлення об'єму клітина не досягає, а це в свою чергу, дає підставу для вивчення можливості виключення етапу попередньої експозиції в еквілібуючих розчинах із технологічного ланцюга. Досліджено чотири групи ооцитів миші при заморожуванні з високими швидкостями охолодження: час попередньої експозиції в еквілібуючому розчині становив в I групі 15 хв., у II-10, в III – 5, в IV – 0 хв. Отримані після проведеної роботи результати подані в гістограмі.

Збереженість ооцитів після заморожування-відтавання у групах з попередньою експозицією 15, 10, 5, 0 хвилин складала $S=54,0\pm7,9$ ($n=46$); $S=68,0\pm9,0$ ($n=57$); $S=63,0\pm6,2$ ($n=62$); $S=60,0\pm7,9$ ($n=57$) відповідно. Вірогідної різниці між значеннями збереженості ооцитів миші у різних дослідних групах не отримано ($t_d=1,2$), тому вважаємо за доцільне виключити такий технологічний прийом як попередня експозиція в еквілібуючому розчині.



Гістограма . Збереженість деконсервованих ооцитів миші, які заморожені з різним часом витримки в еквілібуючому розчині кріопротектора

Деяке зменшення збереженості ооцитів у групі з часом витримки у еквілібуючому розчині 15 хв. можна пояснити перебільшенням часу взаємодії клітин і кріопротектора, за рахунок якого можливі осмотичні і токсичні порушення в ооцитах.

Таким чином встановлено, що скорочення часу попередньої витримки в еквілібуючому кріопротекторі не знижує рівень збереженості ооцитів миші після заморожування-відтавання. Це дозволяє зробити припущення, що виключення попередньої еквілібрації як технологічного етапу із повного циклу заморожування-відтавання можливе, і таким чином може підвищити технологічність процесу кріоконсервації ооцитів миші з використанням високих швидкостей заморожування.

Висновок. На підставі вивчення впливу часу еквілібрації ооцитів ссавців у розчинах криопротекторів на їх збереженість після деконсервації, доцільне виключення етапу попередньої витримки в еквіліруючих розчинах під час криоконсервації ооцитів ссавців з високими швидкостями заморожування і використання тільки вітрифікуючих розчинів криопротекторів, збереженість за морфологічними ознаками становить $S=60,0\pm 7,9$ ($n=57$).

Бібліографічний список

1. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos /Vajta G., Holm P., Kuwayama M. et al. Mol. Reprod. Devel. 1998, Vol.51, P. 55–58.
2. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws /Otoi T., Yamamoto K., Koyama N. et al. Cryobiology. 1998, Vol.37, №1, P. 77-85.
3. Vitrification of mature mouse oocytes in a 6 M Me2SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins: the effect of temperature /O'Neil L., Paynter S.J., Fuller B.J., et al. Cryobiology. 1998, Vol.37, № 1, P. 59-66.
4. In vitro viability of mouse oocytes vitrified in an ethylene glycol-based solution / Bautista J.A., Dela Pena E.C., Katagiri S., et al. Jpn. J. Vet. Res., 1998, Vol.46, № 1, P. 13-18.
5. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant /Isachenko V., Soler C., Isachenko E. et al. Cryobiology. 1998, Vol. 36, № 3, P. 250-253.
6. Agca Y. Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue. ILAR Journal. 2000, Vol.41, № 4, P. 207-220.
7. Hotamisligil S., Toner M., Powers R.D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. Biol. Reprod. 1996, Vol. 55, № 1, P. 161-168.
8. Vitrification of mouse oocytes in ethylene glycol-raffinose solution: effects of preexposure to ethylene glycol or raffinose on oocyte viability /E.C. dela Pena, Y.Takahashi, E.C. Atabay, and M.Nagano. Cryobiology. 2001, № 42, P.103-111.
9. Манк М. Биология развития млекопитающих. - М.: Мир, 1990.- 406 с.
10. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота: Руководство для работы по пересадке эмбрионов / Кауффольд П., Тамм И., Шихов И.Я. и др. – М.: Агропромиздат, 1990. – 56 с.

На основаниі изучения осмотической реакции ооцитов мыши в растворах криопротекторов для витрификации, а также при исследовании влияния времени эквilibрации ооцитов в растворах криопротекторов на их сохранность после деконсервации сделан вывод о целесообразности исключения этапа предварительной выдержки в эквilibрирующем растворе. И использование только витрифицирующих растворов криопротекторов во время криоконсервации ооцитов мыши с высокими скоростями замораживания, что в свою очередь, повысит технологичность процесса.

On the basis of study osmotic reaction of the mouse oocyte in the vitrification cryoprotectant solution, and also at research of influence of time equilibration oocyte in cryoprotectant solution on their safety after depreservation the conclusion about an opportunity of exception of a stage of preliminary endurance in equilibration solutions and use only vitrification in time cryopreservation oocyte of the mouse with high freezing rates is made, and it, in turn, will raise adaptability to cryopreservation technologies.