

ОЦІНКА ТЕХНОЛОГІЇ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ ООЦИТІВ ССАВЦІВ

Л.В.Горбунов, А.С.Саліна *

Харківський біотехнологічний центр

Запропоновано метод оцінки технології кріоконсервації ооцитів ссавців, заснований на використанні як абсолютних, так і відносних значень їхньої життєздатності. Зниження впливу неврахованих факторів при переході до відносних величин дає можливість знизити кількість біооб'єкта, необхідного для одержання достовірного результату у 2-3 рази, тим самим скоротити витрати часу і коштів на проведення дослідження приблизно у стільки ж разів.

ооцити, схоронність, виживаність, деконсервований, культивований

Традиційне одержання достовірного результату забезпечується при порівнянні схоронності ооцитів у дослідній групі з контролем при однакових умовах проведення експерименту. Аналіз літературних даних показує, що схоронність свіжоотриманих ооцитів ссавців після культивування *in vitro* до стадії бластоцисти вірогідно відрізняється і варіює від $67,5 \pm 5,2\%$, ($n=80$) до $45,8 \pm 5,0\%$, ($n=100$) [1-2]. Очевидно, що на оцінку ефективності технології кріоконсервації ооцитів ссавців при використанні абсолютного показника схоронності впливає різноякісність біооб'єкта і варіація умов проведення експериментів. Емпіричний пошук оптимальної концентрації кріопротектора та його виду, вибір середовища й умов культивування біооб'єкта, варіація режимів заморожування-відтаювання створюють проблему зіставлення результатів, отриманих при різних умовах проведення експерименту.

Проведення багатфакторного дослідження стає можливим завдяки використанню особливих методів математичного моделювання, в основі яких лежить принцип використання відносних величин [5]. Застосування відносної величини виживаності – дає можливість зменшити вплив вище перерахованих факторів [6], подібно тому, як перехід від показника середньоквадратичного відхилення до коефіцієнта варіації дає змогу кількісно зіставити різноякісні вибірки [7]. Це, у свою чергу, може істотно знизити кількість ооцитів, необхідних для одержання достовірного результату і тим самим зменшити час для проведення досліджень, а також скоротити витрати матеріальних коштів.

Мета роботи – розробити спосіб оцінки технології кріоконсервації ооцитів ссавців, який знижує кількість біооб'єкта, необхідного для одержання достовірного результату за допомогою зниження впливу неврахованих факторів при переході до відносних величин

Методика досліджень. Оцінка вірогідності різниці порівнюваних вибірок проводилася за допомогою критерію Стюдента t_d [7]. Для оцінки різниці досліджуваних показників життєздатності ооцитів на різних етапах про-

* Науковий керівник – доктор с.-г. наук Безуглий М.Д.

ведення процесу кріоконсервації застосовувався відносний показник - α , який розраховують за формулою (1):

$$\alpha = \frac{t_{d1} - t_{d2}}{t_d} \cdot 100\%, \quad t_d = \frac{t_{d1} + t_{d2}}{2}, \quad (1)$$

де: t_{d1} та t_{d2} - критерії Ст'юдента обчислені для порівнюваних вибірок по абсолютному показнику - схоронності і відносному - виживаності, відповідно.

Мінімальна кількість ооцитів, необхідна для одержання достовірного значення з рівнем надійності $P=0,95$ оцінювалася по $\Phi(2)$ [8] для порівнюваних вибірок (n_{Δ}) і для однієї вибірки (n) по $\Phi(3)$ [9]:

$$n_{\Delta} = 8 \frac{M \cdot (100 - M)}{\Delta M^2}, \quad (2) \quad n = 1600 \frac{100 - M}{M}, \quad (3)$$

де: M – середні показники абсолютної і відносної величини життєздатності деконсервованого біооб'єкта; схоронність – C і виживаність – W , відповідно;

ΔM – величина різниці порівнюваних вибірок.

Результати досліджень. Для виключення впливу різноякісності біооб'єкта в порівнюваних вибірках загально прийнято використовувати непараметричний критерій X^2 [7]. Однак даний параметр менш чутливий до порівняння вибірок, що мають нормальний і біноміальний розподіл, що, у свою чергу, призводить до необхідності збільшення кількості біооб'єкта, значних витрат часу і матеріальних коштів [8].

Щоб знизити вплив різноякісності ооцитів на рівень оцінки ефективності технології їх кріоконсервування і складових її операцій, зокрема культивування, рекомендується застосовувати відносний показник зміни життєздатності біооб'єкта – виживаність (W):

$$W = \frac{C_{dk}}{C_k} \cdot 100\% = \frac{n_{dk}}{n_{c1}} \cdot \frac{n_{c2}}{n_k} \cdot 100\%, \quad (4)$$

де: C_k и C_{dk} – показники схоронності культивованих ооцитів відповідно свіжоотриманих і деконсервованих, ($C_k = n_k / n_{c2} \cdot 100\%$, $C_{dk} = n_{dk} / n_{c1} \cdot 100\%$);

n_{c1} - кількість придатних ооцитів для заморожування, n_{c2} - кількість придатних ооцитів для культивування,

n_k - кількість придатних свіжоотриманих ооцитів після культивування,

n_{dk} - кількість придатних ооцитів після заморожування і культивування.

Перевірити застосовність запропонованого способу можна за допомогою аналізу даних, представлених у літературі [1-4]. Розглянемо для прикладу різницю досліджуваних параметрів життєздатності ооцитів при заморожуванні з повільними швидкостями при використанні різних добавок до кріопротектора [3]. У даному однофакторному дослідженні (номер групи $N=I$, табл. 1) кріоконсервація ооцитів корови на стадії ЗП (зародкового

пухирця) проводилася в пластикових соломінах 0,25 мл при використанні програмного заморожувача (СТ-1).

1. Порівняльний аналіз абсолютного – С та відносного – W параметрів оцінки технології заморожування ооцитів ссавців

№	Досліджуваний параметр, $\overline{M}$	$M1 \pm m1, \% (n)$	$M2 \pm m2, \% (n)$	$\Delta M, \%$	td	$\alpha, \%$
I	Схоронність C_{dk}	20,0 $\pm$ 3,1 (170)	9,5 $\pm$ 2,2 (168)	10,5	2,8	40
	Виживаність W	44,4 $\pm$ 4,2 (135)	20,7 $\pm$ 3,5 (134)	23,3	4,2	
II	Схоронність C_{dk}	53,8 $\pm$ 5,5 (80)	68,8 $\pm$ 5,1 (80)	15	2	29,8
	Виживаність W	65,2 $\pm$ 5,3 (80)	83,4 $\pm$ 4,1 (80)	18,2	2,7	
III	Схоронність C_{dk}	16,2 $\pm$ 2,5 (216)	4,9 $\pm$ 1,3 (286)	11,3	4,04	34,1
	Виживаність W	39 $\pm$ 4,0 (150)	12 $\pm$ 2,4 (185)	27	5,7	
IV	Схоронність C_{dk}	11 $\pm$ 1,4 (483)	13 $\pm$ 2,2 (235)	2	0,8	25
	Виживаність W	23 $\pm$ 2,3 (316)	27 $\pm$ 3,2 (192)	4	1,0	

Відповідність номера групи і літературного джерела: I-[3], II-[1], III-[2], IV-[4],

У досліді було дві групи: у першій (M_1) у якості кріопротектора виступав 1,8 М ЕГ+0,05 М Т(тріхалози) + 5% PVP (полівінілпіролідон), у другій (M_2) – 1,8 М ЕГ+0,05 М Т + 10% PVP. Показник схоронності свіжоотриманих ооцитів, культивованих до стадії бластоцисти, для обох груп становив $C_k=45,8\pm5,0\%$, ($n=100$). З таблиці 1 видно, що при переході від показника схоронності до виживаності збільшується величина вірогідності різниці результатів порівнюваних вибірок, оцінених за допомогою відносного показника розбіжності критерію Стюдента – $\alpha=40\%$. Це стало можливим унаслідок значимого збільшення різниці порівнюваних вибірок.

Наступний приклад (група II) заснований на використанні високих швидкостей заморожування – вітрифікації [1]. Ооцити миші на стадії МП були заморожені у французьких соломінах 0,25 мл. У досліді було дві групи: у першій (M_1) в якості кріопротектора виступав 6,0 М ЕГ + 0,3 М рафінози + 10% телячої фетальної сироватки, час витримки 2 хвилини, у другій (M_2) – еквілібуючий розчин кріопротектора 2,0 М ЕГ з часом витримки 2 хвилини і вітрифікуючий розчин (6,0 М ЕГ + 0,3 М рафінози + 10% телячої сироватки). Схоронність свіжоотриманих ооцитів, культивованих до стадії бластоцисти, для обох груп становила $C_k=67,5\pm5,2\%$, ($n=80$). Показник відносної розбіжності за критерієм Стюдента становив $\alpha=29,8\%$.

У випадку, коли змінювалося кілька параметрів (група III) - швидкість і концентрація розчину кріопротектора [2], отримані подібні результати. Заморожування ооцитів корови проводили на стадії дозрівання *in vitro* (IVM) до МП із щільним шаром кумулюса. Контейнерами служили французькі соломіни 0,25 мл. У досліді було дві групи: перша група (M_1), де заморожування проводили з використанням повільної швидкості в програмному заморожувачі (MPF-40), а кріопротектор складався з 2,0 М 1,2-пропандіол + 0,4% бичачої сироватки. Друга – (M_2), де заморожування проводили при високій швидкості (вітрифікація) – з кріопротектором у складі 2,0 М ДМСО + 1,0 М

ацетаміду + 3,0 М пропандіола. Процент розвитку свіжоотриманих ооцитів у культурі до стадії 2-клітинного ембріона становив $C_k=41,7\pm5,3\%$, ($n=84$). При переході від абсолютних значень оцінки життєздатності деконсервованого біооб'єкта до відносного показник відносної різниці за критерієм Стюдента склав $\alpha=34,1\%$.

В останньому прикладі [4], (номер групи $N=IV$ табл. 1) використовували надвисоку швидкість заморожування для кріоконсервації ооцитів корови, у відкритих витягнутих соломинах. У досліді було дві групи: у першій (M_1) – еквілібуючий розчин 7,5 % ЕГ+ 7,5 % ДМСО, час еквілібрації 7 хвилин, вітрифікуючий розчин 16,5 % ЕГ+ 16,5 % ДМСО, час витримки 25 секунд; у другій (M_2) – еквілібуючий розчин 10 % ЕГ+ 10 % ДМСО, час еквілібрації 30-45 секунд, вітрифікуючий розчин 20 % ЕГ+ 20 % ДМСО, час витримки 25 секунд. Показник схоронності свіжоотриманих ооцитів культивованих до стадії бластоцисти для обох груп становив $C_k=48,0\pm4,2\%$, ($n=150$). З таблиці 1 видно, що при переході від показника схоронності до виживаності збільшується величина вірогідності різниці результатів порівнюваних вибірок, оцінених за допомогою відносного показника розбіжності критерію Стюдента – $\alpha=25\%$.

Це означає, що для одержання вірогідності різниці отриманих результатів необхідна менша кількість ооцитів, унаслідок зниження коефіцієнта варіації аналізованих вибірок у 1,5-2 рази (у середньому від 188 до 112 %). Щоб оцінити на скільки знижується необхідна кількість ооцитів як в одній – n , так і в порівнюваних – n_Δ вибірках, за умови вірогідності отриманого результату $P=0,95$, необхідно підставити значення аналізованих вибірок у формули (2) і (3).

Встановлено (табл. 2), що при переході від абсолютних до відносних величин оцінки життєздатності деконсервованих ооцитів, можна скоротити мінімальну кількість біооб'єкта у 2-3 рази, за умови одержання вірогідності різниці порівнюваних вибірок. Таким чином, метод оцінки життєздатності ооцитів ссавців по

виживаності знижує величину середньоквадратичного відхилення досліджуваної вибірки, зменшує вплив варіації параметрів біологічної різноякісності біооб'єкта й умов їхнього культивування і, тим самим, підвищує точність її оцінки.

2. Зменшення кількості ооцитів при переході від абсолютних до відносних показників оцінки їхньої життєздатності після деконсервації

№	Досліджуваний параметр - М	$C_v, \%$	n - мінімальна кількість вимірів			
			Для оцінки середнього М		Для різниці середніх ΔM	
			n	n_w/n_c	n_Δ	n_w/n_c
I	Схоронність C_{dk}	200	6400	3	116	3
	Виживаність W	113	2036		36	
II	Схоронність C_{dk}	67	726	2	76	2
	Виживаність W	45	318		33	
III	Схоронність C_{dk}	227	8276	3	85	3
	Виживаність W	126	2502		26	
IV	Схоронність C_{dk}	258	10708	2,5	2262	2,3
	Виживаність W	164	4326		985	

Відповідність номера групи і літературного джерела:

I – [3], II – [1], III – [2], IV – [4].

Висновок. Метод оцінки технології кріоконсервації ооцитів ссавців, заснований на використанні як абсолютних, так і відносних значень їхньої життєздатності, дає змогу зменшити кількість біооб'єкта в 2-3 рази, за умови одержання достовірного результату, тим самим знижуючи в стільки ж разів витрати часу і коштів, необхідних на проведення дослідження.

Бібліографічний список

1.E.C. dela Pena, Y.Takahashi, E.C. Atabay, and M.Nagano. Vittrification of mouse oocytes in ethylene glycol-raffinose solution: effects of preexposure to ethylene glycol or raffinose on oocyte vability //Cryobiology.- 2001.-№42.- P.103-111.

2.Fuku E Kojima T Shioya Y Marcus GJj Downey BR. In vitro fertilization and development of frozen/thawed bovine oocytes // Cryobiology.- 1992.- №29.- P.485-492

3.T. Suzuki, A. Boediono, M. Takagi, S. Saha, and C. Sumantri. Fertilization and development of frozen-thowed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method in vitro// Cryobiology.- 1996.- №33.- P.515-523.

4.Vajta P. Holm and H. Callesen. Open Pulled Straw [OPS] Vittrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos // Molecular reproduction and development.-1998.-V.51.-P.53-58.

5.Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Е.В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий.- М.: Наука, 1976.- 279 с.

6.Горбунов Л.В., Бугров А.Д., Горбунова Н.І. Спосіб оцінки ефективності проведення біотехнологічних операцій, які пов'язані з кріоконсервацією сперматозоїдів та ембріонів ссавців //Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. - Біла Церква.-2000. - №14.- С. 178-183.

7.Лакин Б. Ф. Биометрия М.:Высшая школа, 1990.- 254 с.

8.Горбунов Л.В., Салина А.С., Кот В.С. Методические рекомендации по способам получения необходимой точности определения жизнеспособности ооцитов и эмбрионов млекопитающих, на основе их оценки посредством видеофиксации.- Луганск, 2003. – 20 с.

9.Горбунов Л.В. Определение минимального количества измерений, обеспечивающего достоверный научный результат //Агроекологічний журнал . – К. – 2002. – Вип. 1. –С. 69-71.

Предложен метод оценки технологии криоконсервации ооцитов млекопитающих, основанный на использовании как абсолютных, так и относительных значений их жизнеспособности. Понижение влияния неучтенных факторов при переходе к относительным величинам дает возможность уменьшить количество биообъекта, необходимого для получения достоверного результата в 2÷3 раза, тем самым сократить затраты времени и денежных средств на проведение исследования приблизительно во столько же раз.

The method of an estimation cryopreservation of mammalian oocytes based on use both terrain clearance, and relative values of their viability is offered. The lowering of influence of the unaccounted factors at passage to relative magnitudes enables to lower an amount biological object -that of reliable outcome, necessary for deriving, in 2÷3 times, that most to reduce expenditures of time and money resources examinations, necessary on carrying out, approximately in as much time.