

Оценка эффективности технологий криоконсервирования ооцитов млекопитающих в широком диапазоне скоростей теплообмена

А.С. САЛИНА, Л.В. ГОРБУНОВ
Институт животноводства УААН, г. Харьков

Estimation of Cryopreservation Technology Efficiency for Mammalian Oocytes within a Wide Range of Heat Exchange Rates

A.S. SALINA, L.V. GORBUNOV
Animal Breeding Institute, Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kharkov

При использовании абсолютного показателя оценки сохранности деконсервированных ооцитов для получения достоверного результата необходимо большое количество биоматериала ($n \geq 100$), что усложняет установление эффективной технологии криоконсервирования и исследование всех ее этапов. Для решения этой проблемы предложен метод нейтрализации разного качества биообъекта при помощи перехода к относительным величинам (Горбунов Л.В., Салина А.С., 2005).

Цель работы – сравнительный анализ методов криоконсервирования ооцитов коров и мышей в широком диапазоне скоростей теплообмена на основе использования относительных величин.

Объектом исследования служили ооциты коров и мышей, полученные по общепринятым методикам. Замораживание проводили при медленных, высоких и сверхвысоких скоростях. Сохранность замороженно-оттаянных ооцитов определяли морфологически, а также по результатам культивирования и оплодотворения *in vitro*. Показатели выживаемости клеток устанавливали по специально разработанным прикладным программам.

Для оценки эффективности существующих технологий криоконсервирования по абсолютным показателям проведен анализ литературных и собственных данных, при котором наблюдался разброс значений сохранности. Переход к относительным показателям дает возможность оценивать не только эффективность технологии в целом, но и отдельные ее элементы. Показано, что относительный показатель выживаемости (ПВ), отражающий эффективность способа культивирования, изменяется от $13,8 \pm 8,8$ до $82,5 \pm 1,7\%$ и имеет также большой разброс (68,7%), обусловленный применением разных культуральных сред. Аналогичную высокую вариабельность (92,0%) имеет ПВ, характеризующий влияние криопротекторов на биообъект (от $5,3 \pm 1,8$ до $97,3 \pm 2,0\%$), что можно объяснить длительностью пребывания клеток в растворе криопротектора.

Показатель выживаемости, определяющий эффективность способа криоконсервирования (от $11,6 \pm 2,6\%$ до $100 \pm 4,6\%$), имеет разброс 88,4%, который обусловлен вариацией скорости охлаждения ($0,1 \div 10000^\circ\text{C}/\text{мин}$), отношением скорости оттаивания к скорости замораживания ($v_{\text{от}}/v_{\text{з}} = 0,8 \div 2,7$). При замораживании ооцитов коровы в закрытых вытянутых пластиковых капиллярах диаметром 1 мм ($v_{\text{з}} = 6000^\circ\text{C}/\text{мин}$, $v_{\text{от}}/v_{\text{з}} = 1,2$), тогда как сохранность составляет $9,1 \pm 8,7\%$ (Салина А.С. и соавт., 2006), мы получили ПВ 100% из-за низкой эффективности технологии культивирования.

При сопоставлении показателей эффективности отдельных составляющих этапов технологии установлено, что ПВ, определяющий эффективность способа криоконсервирования, соответствует максимальному уровню 100%, при выборе криопротектора – 97,3%, после применения культуральных сред – 90,0%. Следовательно, возможна дальнейшая оптимизация процессов подбора культуральных сред и криопротектора.

Use of absolute index to estimate the survival of frozen-thawed oocytes for obtaining statistically significant result a large amount of biological material is necessary ($n \geq 100$), that complicates the creation of effective cryopreservation technology and studying all its stages. To solve this task there has been proposed the method of neutralizing various qualities of biological objects with using relative values (Gorbunov L.V., Salina A.S., 2005).

The research goal is a comparative analysis of cryopreservation methods of mouse and cow oocytes within the range of heat exchange rates by means of application of relative values.

Mouse and cow oocytes, derived according to traditional methods, served as research objects. Freezing was conducted at low, high and ultrahigh rates. The survival of frozen-thawed oocytes was examined morphologically as well as using the results of culturing and fertilization *in vitro*. Cell survival indices were found with specially designed applied programmes.

To estimate the efficiency of existing cryopreservation technologies on absolute indices there has been analyzed the literature and own data, herewith the data were found as having a certain variation. Using of relative indices gives the possibility to assess not only the efficiency of a technology in a whole but also of its separate elements. It has been shown that relative survival index (SI) reflecting the efficiency of the culturing method changes from 13.8 ± 8.8 to $82.5 \pm 1.7\%$ and also has a big dispersion (68.7%), stipulated by the application of different culturing media. The same high variability (92.0%) is also inherent to SI, characterizing the effect of cryoprotectants on biological object (from $5.3 \pm 1.8\%$ to $97.3 \pm 2.0\%$) that could be explained by the duration of cell staying in the solution of cryoprotectant.

Survival index, determining the efficiency of cryopreservation method (from $11.6 \pm 2.6\%$ to $100 \pm 4.6\%$) has a dispersion of 88.4% which is stipulated by the variation of cooling rate ($0.1 \div 10,000^\circ\text{C}/\text{min}$), ratio of thawing rate to freezing rate ($v_{\text{th}}/v_{\text{f}} = 0.8 \div 2.7$). When freezing cow oocytes in closed elongated plastic capillaries with 1mm diameter ($v_{\text{f}} = 6,000$, $v_{\text{th}}/v_{\text{f}} = 1.2$), meanwhile the survival makes $9.1 \pm 8.7\%$ (Salina A.S. et al., 2006) because of low efficiency of culturing technology we obtained 100% SI.

When comparing the efficiency indices of separate components of technology it has been found that the SI determining the efficiency of cryopreservation protocol corresponds to a maximum level 100%, when selecting a cryoprotectant it makes 97.3%, after use of culturing media this was 90.0%. Therefore there is a possibility to further optimization of selection processes of cultural media and cryoprotectant.