

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ РІЗНИХ ЕКВІЛІБРАЦІЙНИХ РОЗЧИНІВ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ СВИНОК ТА ПОДАЛЬШИЙ РОЗВИТОК ЕМБРІОНІВ IN VITRO

П. А. Троцький
trotskyi_pa@ukr.net

Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця
Національної академії аграрних наук України
вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н.,
Київська обл., 08321, Україна

Метою досліджень було порівняти вплив різних еквілібраційних розчинів при кріоконсервуванні на життєздатність деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК) свинок і подальший розвиток ембріонів in vitro. Для заморожування використовували ОКК з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом. На першому етапі ОКК витримували протягом 10 хв у різних варіантах еквілібраційного розчину: вар. А – 10% DMSO + 10% гліцерин (G) + 10% пропандіол (PD), вар. Б – 10% G + 20% PD, вар. В – 30% PD. Потім комплекси переносили у вітрифікаційний розчин (25% G + 25% PD) і фасували у пайети, які заморожували прямим зануренням в азот. Ефективність кріоконсервування визначали за коефіцієнтом та індексом дроблення. Встановлено, що тип та концентрація кріопротекторів у еквілібраційному розчині обумовлюють неоднаковий рівень збереження гамет при кріоконсервуванні. Коефіцієнт дроблення ембріонів показав незначні коливання. Індекс дроблення ембріонів в різних групах коливався по різному. При вар. А він становив від 0,0 до 100,0%. Серед дослідних груп найбільш стабільний індекс дроблення був при вар. Б – від 52,9 до 88,9%. За результатами досліджень доведено наявність взаємозв'язку між вмістом кріопротекторів у еквілібраційному розчині та життєздатністю деконсервованих ОКК свинок, зокрема з такими показниками, як кількість отриманих зародків, коефіцієнт та індекс дроблення ембріонів. Використання для заморожування ОКК свинок двокомпонентного еквілібраційного розчину сприяло

не тільки збільшенню загальної кількості ембріонів, але й частки зародків на більш просунутих стадіях розвитку.

Ключеві слова: кріоконсервування, ооцит-кумулюсний комплекс, еквілібраційний розчин, кріопротектор, дозрівання *in vitro*, ембріон.

THE COMPARATIVE ANALYSIS INFLUENCE of VARIOUS EQUILIBRATION SOLUTIONS in the PIGS' OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES CRYOPRESERVATION and the EMBRYOS' LARGER DEVELOPMENT In Vitro

P. A. Trotskiy
trotskiy_pa@ukr.net

Institute of animal breeding and genetics nd. a. M.V.Zubets of NAAN
Pogrebnyak Street, 1, v. Chubinske, Boryspil district,
Kyiv region, 08321, Ukraine

The aim of the research was to conduct a comparative analysis of various equilibration solutions for cryopreservation of the preserved oocyte-cumulus complexes (OCC) pig and the further development of embryos in vitro. Oocytes of pigs with a homogeneous fine-grained ooplasm, an intact, transparent membrane, a dense or partially loose cumulus were used for freezing. Before freezing, the gametes were treated for 10 minutes. equilibration solution var. A - 10% DMSO + 10% G + 10% PD, var. B - 10% G + 20% PD, var. V - 30% of PD were then transferred to a vitrification solution (25% glycerin + 25% propandiol). According to the results of experimental studies, it has been established that the composition and concentration of cryoprotectants in the equilibration solution provide an unequal level of conservation of gametes in cryopreservation. Analyzing changes in the dynamics of crushing of embryos of pigs, minor fluctuations of the crushing coefficient were established. In addition to the breakdown index of embryos, we analyzed the index of embryonic crushing. It was found that the crushing index varies in different groups in different groups, so in group A it was from 100.0 to 0.0%. Among the experimental groups, the most stable index of crushing was in experimental group B from 88.9 to 52.9%. According to the results of experimental studies, the correlation between the content of cryoprotectants in the equilibration solution during cryopreservation and viability of the preserved oocyte-cumulus complexes of piglets has

been proved for such parameters as the number of germs obtained, the dynamics and the embryo crushing index. The use of two-component equilibration solution for the freezing of OCC pigs leads to an increase not only in the total number of embryos but also in the larger number of embryos at other stages of crushing.

Keywords: cryopreservation, oocyte-cumulus complexes, equilibration solution, cryoprotectant, in vitro maturation, embryos.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЭКВИЛИБРАЦИОННЫХ РАСТВОРОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ СВИНОК И ДАЛЬНЕЙШЕЕ РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ IN VITRO

П. А. Троцкий
trotskiy_pa@ukr.net

Институт разведения и генетики животных имени. М. В. Зубца
Национальной академии аграрных наук Украины
ул. Погребняка, 1, с. Чубинское, Бориспольский р-н,
Киевская обл., 08321, Украина

Целью исследований было провести сравнительный анализ различных эквilibрационных растворов при криоконсервировании на жизнеспособность деконсервированных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) свинок и дальнейшее развитие эмбрионов in vitro. Для замораживания использовали ооциты свинок с гомогенной тонкозернистой ооплазмой, невредимой прозрачной оболочкой, плотным или частично разрыхленным кумулюсом. Перед замораживанием гаметы обрабатывали 10 мин. эквilibрационным раствором вар. А – 10% DMSO + 10% G + 10% PD, вар. Б – 10% G + 20% PD, вар. В – 30% PD затем переносили в витрификационный раствор (25% глицерин+25% пропандиол). По результатам экспериментальных исследований установлено, что состав и концентрация криопротекторов в эквilibрационном растворе обеспечивают неодинаковый уровень сохранения гамет при криоконсервировании. Анализируя изменения динамики дробления эмбрионов свиной, установили незначительные колебания коэффициента дробления. Кроме показателя дробления зародышей был проанализирован индекс дробления эмбрионов. Установлено, что

индекс дробления в различных группах колеблется по-разному: так в группе А он был от 100,0 до 0,0%. Среди опытных групп наиболее стабильный индекс дробления был в опытной группе Б - от 88,9 до 52,9%. Результатами экспериментальных исследований доказано наличие взаимосвязи между содержанием криопротекторов в эквilibрационном растворе при криоконсервировании и жизнеспособностью деконсервированных ооцит-кумулюсных комплексов свинок для таких показателей как количество полученных эмбрионов, динамика и индекс дробления эмбрионов. Использование для замораживания ОКК свинок двухкомпонентного эквilibрационного раствора приводит к увеличению не только общего количества эмбрионов, но и к большему количеству эмбрионов на других стадиях дробления.

Ключевые слова: криоконсервирование, ооцит-кумулюсные комплексы, эквilibрационный раствор, криопротектор, созревание in vitro, эмбрионы.

Застосування методу тривалого зберігання кріоконсервованих гамет сільськогосподарських тварин створює сприятливі умови для регулювання відтворювальної функції у тварин біотехнологічними методами. При заморожуванні репродуктивних клітин повільним (програмним) способом у клітинах утворюється велика кількість кристалів льоду. Застосування методу вітрифікації (швидкого заморожування) дозволяє значною мірою усунути цю проблему. Важливою умовою успішного кріоконсервування репродуктивних клітин шляхом прямого занурення у рідкий азот є правильний вибір кріопротекторів – речовин, здатних запобігати формуванню внутрішньоклітинного льоду та попереджувати пошкодження біологічних об'єктів. Кріопротектори відіграють роль стабілізаторів води та знижують точку замерзання розчину. Також вони захищають мембранні структури клітини та запобігають утворенню високих концентрацій біологічних і хімічних сполук внаслідок вимерзання води у суспензійному середовищі. На сьогодні, серед науковців немає єдиної думки щодо оптимальних типів та концентрацій кріопротекторів, причиною чого є те, що при застосуванні різних типів кріопротекторів гамети тварин проявляють неоднакову кріорезистентність під час кріоконсервування [1,2,3,4]. Отже, питання пошуку найбільш ефективних кріопротекторів та їх концентрацій у еквilibраційному середовищі є актуальним.

Метою досліджень було провести порівняльний аналіз впливу різних еквilibраційних розчинів при кріоконсервуванні на життє-

здатність деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) свинок і подальший розвиток ембріонів *in vitro*.

Матеріал і методика досліджень. ОКК свинок отримували після надрізу лезом видимих антральних фолікулів яєчників, відмивали у середовищі Дюльбекко та оцінювали за морфологічними ознаками. Для заморожування використовували ОКК свинок із гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом. Для наступного заморожування гамети витримували протягом 10 хв. в одному з еквілібраційних розчинів: вар. А – 10% DMSO + 10% гліцерин (G) + 10% пропандіол (PD), вар. Б – 10% G + 20% PD, вар. В – 30% PD. Потім комплекси переносили у вітрифікаційний розчин (25% G + 25% PD) і фасували у пайєти, які заморожували прямим зануренням в азот. Еквілібраційний та вітрифікаційний розчини виготовляли на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20% сироватки крові корів, яку попередньо інактивували при +56°C протягом 30 хв. Після розморожування для виведення кріопротекторів гамети переносили на 10 хв. у 1,0 М розчин сахарози. Потім клітини тричі відмивали середовищем ТС-199, оцінювали за морфологічними ознаками і переносили в середовище для мейотичного дозрівання. Тривалість етапу дозрівання становила 44 год. ОКК культивували в 4-лункових планшетах за температури +38,5°C та 5% CO₂ у повітрі. Середовище мейотичного дозрівання на основі ТС-199 містило 20% попередньо інактивованої еструсної сироватки крові корів, 2,0 мМ натрію пірувату, 2,92 мМ кальцію лактату, 40 мкг/мл гентаміцину. Після етапу мейотичного дозрівання ОКК піддавали заплідненню *in vitro*. Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 ОД/мл) за методикою Parrish J.J. et al. [5]. Після 12-18 год. спільного інкубування яйцеклітин та сперміїв передбачувані зиготи відмивали від прилиплої сперми і переносили в краплі середовища CDM для подальшого дорощування.

Ефективність використання різних варіантів еквілібраційних розчинів оцінювали за: 1) коефіцієнтом дроблення, який визначали за часткою ембріонів певної стадії розвитку, отриманих після 24, 48, 72 та 96 годин дорощування, 2) індексом дроблення, який визначали за часткою ембріонів, які розвинули до наступної стадії.

Результати досліджень. За результатами досліджень встановлено, що тип та концентрація кріопротекторів у еквілібраційному розчині обумовлюють неоднаковий рівень збереження гамет при кріоконсервуванні (рис. 1).

Аналізуючи показники дроблення отриманих ембріонів, встановлено незначні коливання коефіцієнта дроблення (рис. 2).

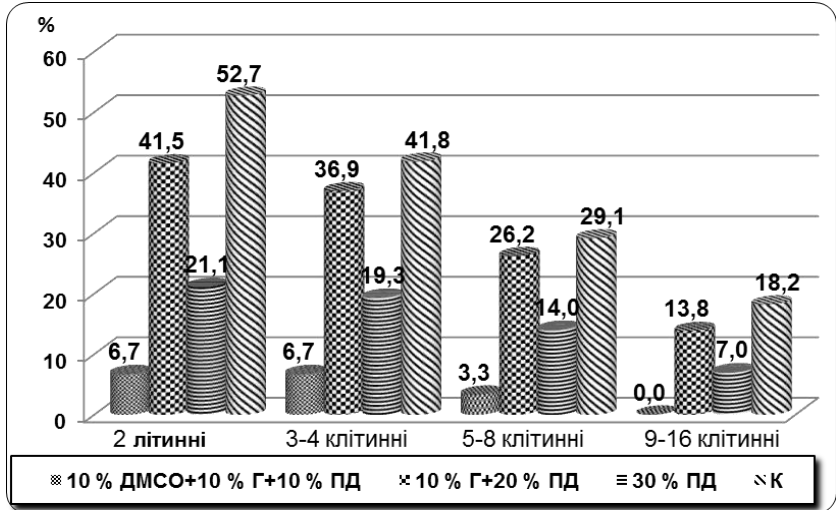


Рис. 1. Результати запліднення *in vitro* деконсервованих яйцеклітин свинок при використанні різних варіантів еквілібраційних розчинів

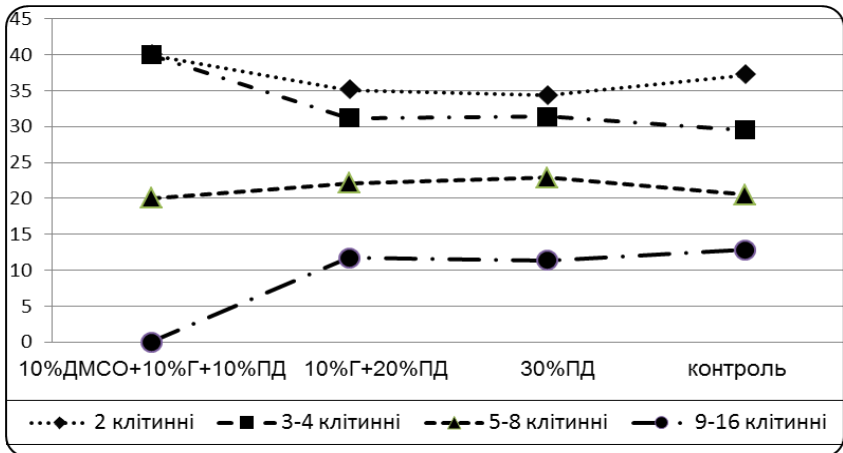


Рис. 2. Показники коефіцієнтів дроблення *in vitro* деконсервованих і прокультивованих ОКК свинок при використанні різних варіантів еквілібраційних розчинів

Після першої доби дорощування зигот, отриманих з деконсервованих, дозрілих і запліднених поза організмом ОКК свинок, коефіцієнт дроблення був у межах від 34,3 до 40,0%. Після 48 год. культивування спостерігали незначне зменшення коефіцієнта дроблення в дослідних Б і В та контрольній групі порівняно з групою А. При збільшенні терміну культивування ембріонів до 72 год. коефіцієнт дроблення в дослідних (А-В) і контрольній (К) групах був майже однаковим і становив від 20,0 до 22,9%. На четверту добу дорощування коефіцієнт дроблення в групі А був найменшим та дорівнював 0,0%.

Проведений аналіз показав, що індекс дроблення в різних групах змінювався порізно (рис. 3). Так, в групі А він був від 0,0 до 100,0%. Серед дослідних груп найбільш стабільний індекс дроблення був в групі Б – від 52,9 до 88,9%. У контрольній групі аналогічний показник був у межах від 62,5 до 79,3%.

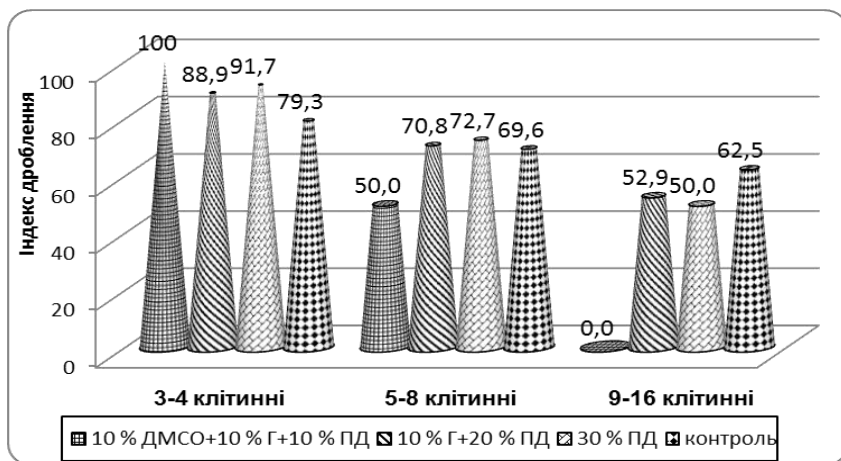


Рис. 3. Індеси дроблення *in vitro* деконсервованих і прокультивованих яйцеклітин свинок при використанні різних варіантів еквілібраційних розчинів

Отже, проведеним порівняльним аналізом впливу різних варіантів еквілібраційних розчинів, які відрізняються між собою за типом та концентрацією кріопротекторів, доведено наявність взаємозв'язку між типом та вмістом кріопротекторів у еквілібраційному розчині та життєздатністю деконсервованих ОКК свинок, зокрема за такими показниками, як загальна кількість отриманих зародків, коефіцієнт та індекс дроблення ембріонів.

Висновки. Стійкість ооцитів свинок до дії низьких температур залежить від складу та концентрації кріопротекторів у еквілібраційному розчині. Використання при заморожуванні ооцит-кумуляюсних комплексів свинок двокомпонентного еквілібраційного розчину сприяє збільшенню не тільки загальної кількості ембріонів, але й частки зародків на просунутих стадіях розвитку.

Список використаної літератури.

1. Elliott G. D., Shangping Wang, Barry J.Fuller Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*. 2017. Vol.76. P. 74–91.
2. Vitrification of porcine immature oocytes: Association of equilibration manners with warming procedures, and permeating cryoprotectants effects under two temperatures / Guoquan Wu, Baoyu Jia, Guobo Quan, et al. *Cryobiology*. 2017. Vol.75. P. 21–27.
3. Троцький П.А. Кріоконсервування ооцит-кумуляюсних комплексів як метод збереження різноманіття сільськогосподарських тварин. *Розведення і генетика тварин*. Київ : Аграрна наука, 2010. Вип. 44. С 200-203.
4. Галицька Т. В., Троцький П.А. Особливості отримання ембріонів свиней *in vitro* в системі збереження біорізноманіття тварин. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2015. Вип.49. С. 243-247.
5. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid / Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Handron R.R. [et al.]. *Biol.Reprod*. 1989. V.40. P. 1020–1025.