

УДК 632.2.082.591.15.16

Шаран М. М., доктор сільськогосподарських наук, mm_sharan@yahoo.com**Яремчук І. М.**, кандидат сільськогосподарських наук*Інститут біології тварин НААН України, м. Львів***Шаловило С. Г.**, доктор сільськогосподарських наук, професор, **Гримак Х. М.** ©*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького*

ПІДВИЩЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ЕМБРІОНІВ КОРІВ ПРИ НАДШВИДКОМУ ЗАМОРОЖУВАННІ

Наведено дані про криозахисні властивості інсолвіту, фосфоліпідного препарату «Філомек», лінолевої кислоти, холестеролу лінолеату, олеату і стеарату при додаванні їх у середовища для надшвидкого заморожування ембріонів корів. Встановлено, що введення вказаних мембраностабілізуючих речовин у середовище для заморожування ембріонів методом вітрифікації в оптимальних концентраціях знижує кількість морфологічно пошкоджених клітин після деконсервування, що підтверджується високим показником збереження деконсервованих ембріонів (понад 80,0%), а також підвищує їх приживлюваність на 7,2–17,0%.

Ключові слова: *кріоконсервування, ембріон, лінолеат, олеат, стеарат холестеролу, «Філомек», надшвидке заморожування, вітрифікаційне середовище*

Вступ. Новим і перспективнішим методом кріоконсервування ембріонів є їх надшвидке заморожування у рідкому азоті в середовищах з високими концентраціями проникаючих кріпротекторів. При цьому через сильне підвищення в'язкості розчинів цитоплазма ембріонів разом з висококонцентрованими розчинами переходить у твердий склоподібний стан без кристалізації, тобто вони вітрифікуються [1, 2]. Головним місцем кріопошкоджень є цитоплазматична мембрана та специфічні ліпіди в ній. Ліпіди при низьких температурах проходять стадії від рідкокристалічної до фази гелю, в результаті чого може порушуватися цілісність мембран і настає загибель клітин, якщо проходять незворотні процеси. Даний феномен пояснюється композицією мембран. Мембрани з високим співвідношенням холестерол: фосфоліпід менш чутливі до дії субфізіологічних температур. Ці біофізичні і біохімічні параметри можуть пояснити відмінності результатів кріоконсервування ембріонів як і розбіжності, викликані сезоном і живленням [3–5]. Тому важливим фактором підвищення ефективності кріоконсервування ембріонів є зміна співвідношення холестерол: фосфоліпід в сторону останнього.

Оскільки лінолева кислота як ненасичена жирна кислота є структурним компонентом фосфоліпідів мембран, ми вирішили застосувати її для зміни пластичності мембран ембріонів. Крім того, доведено, що лінолева кислота

зміцнює клітинні мембрани і слизові оболонки [6]. Заморожування статевих клітин викликає втрату мембранами холестеролу [7], що спонукало до використання різних форм холестеролу для стабілізації співвідношення холестерол: фосфоліпіди у мембранах ембріонів.

Антиоксидантна система ембріонів включає різні природні антиоксиданти (вітаміни А, Е, аскорбінова кислота, убіхінони, каротиноїди) та антиоксидантні ферменти [8, 9]. Вважають, що головним жиророзчинним антиоксидантом є вітамін Е, який здатний в низьких концентраціях ефективно виконувати захисні функції [9, 10]. Разом з вітаміном А він виконує функцію стабілізатора клітинних мембран, захищаючи їх від окиснення [11]. Також встановлено, що фракція поверхнево-активних фосфоліпідів виявляє антиоксидантну та мембраностабілізуючу дію [12].

Метою даної роботи було дослідження ефективності дії лінолевої кислоти, різних форм холестеролу, вододисперсної форми вітамінів А, D, Е та фосфоліпідного препарату «Філомек» при додаванні їх до середовищ для надшвидкого заморожування ембріонів корів.

Матеріал і методи. Дослідження проводили у ТзОВ «Городище» Луцького району Волинської області. Ембріони одержували від корів української чорно-рябої молочної породи віком 4–7 років. Відбір і підготовку корів-донорів проводили за загальноприйнятими методами, поліовуляцію індукували використанням фолікулостимулюючого гормону «Фолікотропін» (Чехія) за 4-денною схемою [13]. Якість ембріонів 7–8-денного віку визначали за морфологічними ознаками з врахуванням стадії їх розвитку [14].

При заморожуванні ембріонів надшвидким методом використовували еквілібраційне і вітрифікаційне середовища. Ембріони після промивання в культуральному середовищі від механічного забруднення поміщали в еквілібраційне середовище, яке складалося з 10 % гліцерину (1,4 М; експозиція 7–10 хв). Надалі ембріони переносили у вітрифікаційне середовище, яке містило 30 % гліцерину і 50 % сахарози на 60 секунд. Потім ембріони тонкою піпеткою переносили у попередньо заповнену вітрифікаційним середовищем запаяну пайєту. Першу половину пайєти (з ембріонами) занурювали у рідкий азот швидко, а другу повільно для запобігання розриву пайєти.

Далі провели чотири серії експериментів, у яких вивчали вплив інсолвіту, лінолевої кислоти, сполук холестеролу та препарату «Філомек» на стабілізацію мембран ембріонів. У 1 серії експериментів при заморожуванні ембріонів дослідних груп до вітрифікаційного середовища додавали лінолеву кислоту (Linoleic acid 27908, Serva). У 2 серії експериментів при заморожуванні ембріонів дослідних груп до вітрифікаційного середовища додавали різні форми холестеролу (Cholesteryl linoleat 17112, Cholesteryl oleat 17121, Cholesterol stearat 17124, Serva). У 3 серії дослідів при заморожуванні ембріонів дослідних груп до вітрифікаційного середовища додавали препарат «Інсолвіт» виробництва Київського вітамінного заводу, у склад якого входили вітаміни: А — 80000 МО, D — 13000 МО, Е — 14 мг. У 4 серії експериментів при заморожуванні ембріонів дослідних груп до вітрифікаційного середовища

додавали різні концентрації «Філомеку» (0,1 %; 0,2 %; 0,3 %). «Філоmek» є природною субстанцією із тканин морських організмів на основі фосфоліпідного комплексу, головним компонентом препарату є фосфатидилхолін (70 % лецитину).

Контролем слугували нативні ембріони, які зразу після вимивання культивували 24–48 годин при температурі 38°C. Життєздатними вважали ембріони, які розвинулись в культурі до стадії пізньої бластоцисти.

При заморожуванні ембріонів великої рогатої худоби дослідних груп до вітрифікаційного середовища додавали інсолвіт, «Філоmek», лінолеву кислоту, холестеролу олеат, лінолеат і стеарат у концентраціях, які проявили високий відсоток збереження ембріонів мишей (0,1, 0,2 і 0,3 %) у наших попередніх дослідженнях. Контрольну групу ембріонів великої рогатої худоби заморожували методом вітрифікації без додавання вказаних речовин.

Розморожування ембріонів мишей проводили на повітрі при температурі 18–22°C і розміщали в 0,5 М розчин сахарози на 10 хвилин. Після 24–48-годинного культивування ембріони, які досягли стадії пізньої бластоцисти, вважали життєздатними.

Виведення кріопротекторів з деконсервованих ембріонів великої рогатої худоби проводили в двох розчинах по 5 хвилин. Перший розчин містив 5 % гліцерину і 0,5 М сахарозу. Для його виготовлення брали: води бідистильованої — 2 мл, маточного розчину — 7 мл, гліцерину — 1 мл, середовища MEM — 10 мл. Друге середовище складалося з 0,25 М сахарози і містило: води бідистильованої — 1,5 мл, маточний розчин — 3,5 мл, середовище MEM — 15 мл.

До вищенаведених розчинів у дослідних групах додавали досліджувані речовини у концентраціях, які проявили високу ефективність. Надалі ембріони багаторазово промивали в культуральному середовищі, яке складалося з ФБС Дюльбекко та 0,4 % БСА і заправляли в пайети для трансплантації.

Життєздатність деконсервованих ембріонів великої рогатої худоби визначали за результатами їх приживлення ректальним дослідженням реципієнтів через 2 місяці після трансплантації.

Результати дослідження. При вивченні кріозахисних властивостей інсолвіту на ембріонах великої рогатої худоби встановлено підвищення відсотка збереження деконсервованих ембріонів у всіх дослідних групах, а, особливо, в 3 дослідній групі з концентрацією інсолвіту 0,4 мл, де він становив 88,9 %, що майже на 10,0 % вище від контролю (рис. 1).

З отриманих даних можна зробити припущення, що інсолвіт при додаванні його у середовища для заморожування ембріонів корів методом вітрифікації, починаючи з концентрації 0,2 мл, значно «пом'якшує» вплив надшвидкого охолодження на ембріони, про що свідчить високий показник збереження деконсервованих ембріонів, який був на рівні 80 відсотків. Це можна пояснити захисною дією вітаміну Е у відношенні до поліненасичених жирних кислот фосфоліпідів клітинних мембран. Крім цього, він взаємодіє також з інтегральними білками ліпопротеїнових комплексів. Отже, вітамін Е,

взаємодіючи з ліпідами і білками в клітинних мембранах, стабілізує та забезпечує їх нормальне функціонування [11].

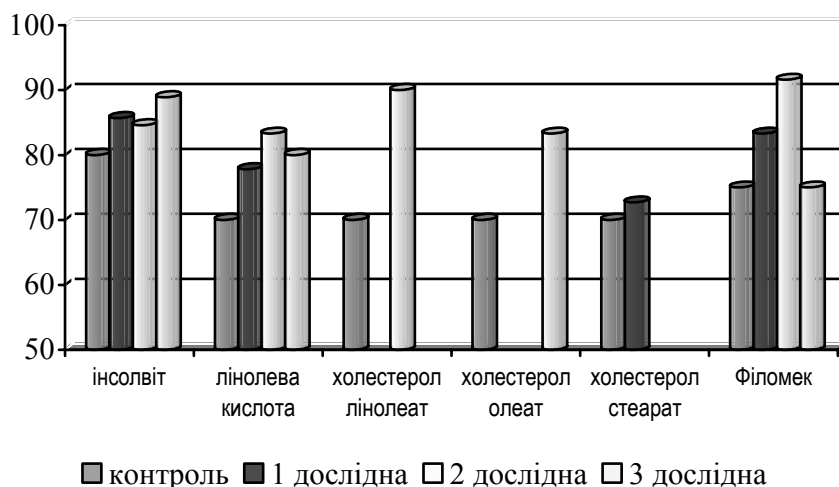


Рис. 1. Життєздатність деконсервованих ембріонів великої рогатої худоби

Введення лінолевої кислоти у вітрифікаційне середовище підвищило збереженість деконсервованих ембріонів у всіх дослідних групах, а, особливо, у 2 і 3 дослідних групах з концентрацією лінолевої кислоти 0,2 % і 0,3 %, де вона становила відповідно 83,3 % і 80,0 %, що на 13,3 % і 10,0 % більше від контролю.

Підвищення збереженості ембріонів очевидно пов'язано із тим, що лінолева кислота, як одна з ненасичених жирних кислот, є структурним елементом фосфоліпідів мембран і додавання її до вітрифікаційного середовища дозволяє змінити співвідношення фосфоліпідів:холестерол в сторону перших. А це у свою чергу призводить до зміни композиції мембран (вони стають еластичнішими), що дозволяє їм лабільніше реагувати на дію низьких температур. На думку ряду дослідників співвідношення фосфоліпідів:холестерол визначає текучість, проникність і термотропну поведінку мембран. Оскільки швидке охолодження мінімізує час дії критичних температур на клітину, необхідно змінити композицію мембран і оптимізувати кріоконсервування [4, 5].

Найвищі показники збереження деконсервованих ембріонів корів отримали при застосуванні холестеролу лінолеату 1,0 мг/мл — 90,0 %. Деяко нижчий відсоток збереження розморожених ембріонів (83,3 %) одержали при використанні 1,5 мг/мл холестеролу олеату. При застосуванні стеарату холестеролу збереженість відталених ембріонів майже не відрізнялася від контролю.

Отже, додавання лінолеату і олеату холестеролу в оптимальних дозах у вітрифікаційне середовище підвищує збереженість деконсервованих ембріонів на 13,3–18,2 %. Очевидно, це пов'язано із тим, що додаткове введення

холестеролу зменшує його втрати мембранами ембріонів протягом кріоконсервування, і тим самим знижує кріопошкодження та підвищує виживаність ембріонів після розморожування. Аналогічні дані отримані вченими при кріоконсервуванні сперми [7].

Найвищий відсоток виживання ембріонів (91,6 %) був у другій дослідній групі, де у середовище для культивування було введено 0,2 % препарату “Філомек”.

Вища якість деконсервованих ембріонів, обумовлена використанням мембрано стабілізуючих речовин у складі середовищ для вітрифікації та розморожування, забезпечила підвищення результативності трансплантації ембріонів. Результати нехірургічної пересадки ембріонів свідчать про досить високий рівень приживлення деконсервованих ембріонів. Так, при застосуванні інсолвіту у всіх дослідних групах він був на рівні 50 %, а в 2-й групі становив 54,5 %, що на 17 відсотків вище від контролю (рис. 2).

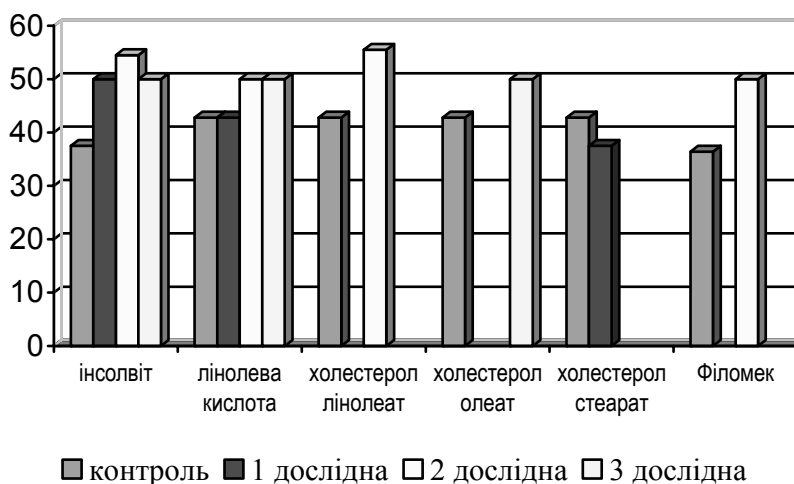


Рис.2. Приживлюваність деконсервованих ембріонів великої рогатої худоби

Використання лінолевої кислоти у складі середовищ для вітрифікації та розморожування забезпечило підвищення приживлюваності ембріонів у 2 і 3 дослідних групах на 7,2 % порівняно з контрольними реципієнтами.

При застосуванні лінолеату холестеролу в дозі 1,0 мг/мл приживлюваність трансплантованих ембріонів становила 55,5 %, що на 12,7 % більше порівняно з контрольними реципієнтами. Аналогічно використання холестеролу олеату в дозі 1,5 мг/мл підвищило приживлюваність ембріонів у телиць-реципієнтів на 7,2 %. В той же час застосування оптимальної концентрації холестеролу стеарату (0,5 мг/мл) дещо знизило рівень приживлення ембріонів — на 5,3 %.

Короткотривале культивування деконсервованих ембріонів, заморожених надшвидким методом, у середовищі з фосфоліпідним комплексом

сприяло відновленню фізіологічних властивостей ембріонів та підвищило їх приживлення після трансплантації на 13,6 %.

Підсумовуючи вищенаведені дані, можна зробити висновок, що введення вказаних мембраностабілізуючих речовин у середовище для заморожування ембріонів методом вітрифікації в оптимальних концентраціях знижує кількість морфологічно пошкоджених клітин після деконсервування, що підтверджується високим показником збереження деконсервованих ембріонів (понад 80,0 %), а також підвищує їх приживлюваність на 7,2–17,0 %.

Висновки.

1. Введення мембраностабілізуючих речовин (інсолвіт, препарат «Філомек», ліолева кислота, ліолеат та олеат холестеролу) у вітрифікаційні середовища для заморожування ембріонів великої рогатої худоби надшвидким методом значно знизило кількість морфологічно пошкоджених клітин після їх деконсервування, що зумовило краще їх збереження (до 90 %) за дії низьких температур.

2. Застосування інсолвіту, препарату «Філомек» ліолевої кислоти, ліолеату та олеату холестеролу в оптимальних дозах у складі вітрифікаційного середовища підвищує приживлюваність трансплантованих ембріонів великої рогатої худоби на 7,2–17,0 %.

3. Використання стеарату холестеролу у складі вітрифікаційного середовища не покращує життєздатність і приживлюваність деконсервованих ембріонів, а тому недоцільне для практики.

Література

1. Кривохарченко А. С. Сверхбыстрое замораживание мышинных эмбрионов, хранившихся при 4°C в течении суток /Кривохарченко А. С., Вильянович А. И., Рябых В. П./ Онтогенез. — 1992. — Т. 23. — № 2. — С. 146–149.

2. Грищенко В. И. Сверхбыстрые скорости охлаждения и витрифицирующие растворы в криобиологии /Грищенко В. И., Калугин Ю. В./ Проблемы криобиологии. — 1993. — № 3. — С. 3–13.

3. Zeron Y. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles /Zeron Y., Ocheretny A., Kedar O., Borochoy A., Sklan D., Arav A./ Reproduction — 2001. — V. 121 — P. 447–454.

4. Arav A. Does lipid profile explain chilling sensitivity and membrane lipid phase transition of spermatozoa and oocytes? /Arav A., Pearl M., Zeron Y./ Cryoletters — 2000. — V. 21 — P. 179–186.

5. Zeron Y. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes /Zeron Y., Sklan D., Arav A./ Mol. Reprod. Dev. — 2002. — V. 61 — P. 271–278.

6. Казимирко В. К. Функция ненасыщенных жирных кислот в организме /Казимирко В. К., Мальцев В. И./ Новости медицины — 2004. — № 95 — С. 35–39.

7. Cormier N. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation. /Cormier N., Bailey J. I./ Biol. Reprod. 69 (2003) 177-185.

8. Кривохарченко А.С. Влияние способа оттаивания эмбрионов мышей, замороженных сверхбыстрым методом или на программном замораживателе, на их жизнеспособность /Кривохарченко А.С., Бахитов К.И., Рябых В.П./ Онтогенез.—1992 а.— т. 23.—№ 1.—С. 67-70.

9. Armbryst T.A. Effect of cryoprotectant and genetic selection for body fat content on embryonic cryosurvival in mice /Armbryst T.A., Eisen E.J./ Treor. Ahhl. Cenet.—1994.—Vol. 88.—№ 3-4. —P. 479-485.

10. Agca Y. Effects of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics /Agca Y., Lin J., Peter A.T., Crister E.S., Crister J.K./ Molecular Reproduction and Development.—1998. —Vol. 49 (4). — P. 408-415.

11. Янович В.Г. Жиророзчинні вітаміни у ветеринарній медицині і тваринництві /Янович В.Г., Куртяк Б.М./ – Львів. – 2004. – 425 с.

12. Wolfe J, Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems // Cryobiology. – 1999;39. – P. 103–29.

13. Довідник з репродуктивної біотехнології великої рогатої худоби довідник /За редакцією Шаловила С. Г. — Львів. — 2004. — 150 с.

14. Кауффольд П. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота /Кауффольд П., Тамм И., Шихов И. Я. и др./ М.: Агропромиздат. — 1990 — 56 с.

Summary

M. Sharan, I. Yaremchuk, S. Shalowylo, H. Grymak

INCREASE THE VIABILITY EMBRYOS IN COWS AT THE SUPERFAST TO FREEZING

Data are resulted about crioprotective properties of insolvit, phospholipids preparation "Filomek" linoleic acids, holesterol of linoleat, oleat and stearat at addition of her on medium for the ultrafreezing of embryos of mice and cows. It is set, that introduction of the indicated membrano stabilizing matters to the environment for freezing of embryos by the method of vitrification in optimum concentrations lowers the quantity of the morphologically damaged cells after deconservation, that is confirmed by the high index of saving of deconservation embryos (over 80,0 %), and also promoted them implantation on 7,2–17,0 %.

Стаття надійшла до редакції 12.04.2011