

*М. М. ТОЙШИБЕКОВ, Р. К. ТУРСУНОВА*

(ТОО «Институт экспериментальной биологии им. Ф. М. Мухамедгалиева»,

Алматы, Республика Казахстан)

## **ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ КРИОКОНСЕРВАЦИИ**

### **НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ООЦИТОВ ОВЕЦ**

### **НА СТАДИИ МЕТАФАЗА II МЕЙОЗА**

**Аннотация.** В наших исследованиях по изучению влияния различных методов криосохранения на целостность цитоплазматических мембран ооцитов на стадии метафаза II мейоза выявлено, что при применении уравновешенной криоконсервации ооцитов МРЦ с использованием в качестве криопротектора 1,5 ДМСО наблюдается большое количество ооцитов с повреждениями цитоплазматической мембраны, наличие которых приводит к гибели клеток. Результаты показали, что наиболее эффективным методом для сохранения целостности мембран яйцеклеток после замораживания и оттаивания был признан метод при применении метода витрификации, при котором наблюдались наименьший процент повреждений цитоплазматических мембран ооцитов.

**Ключевые слова:** ДМСО – диметилсульфоксид, DPBS – Дульбекко фосфатно-солевым буфере, ООК – ооцит кумулюс комплекс, ЭГ – этиленгликоль.

**Тірек сөздер:** ДМСО – диметилсульфоксид, DPBS – Дульбекко тұзды-фосфатты буфер, ООЖ – ооцит кумулюсті жиынтық, ЭГ – этиленгликоль.

**Keywords:** DMSO – dimethyl sulfoxide, DPBS – Dulbecco's phosphate-buffered saline, COC – oocyte-cumulus complex, EG – ethylene glycol.

В настоящее время проблема сохранения и ускоренного воспроизводства высокопродуктивных особей пород и популяции сельскохозяйственных животных стала весьма актуальной. Это связано с тем, что катастрофическое сокращение численности основных видов сельскохозяйственных животных, в частности, овец, стало причиной безвозвратной потери наиболее ценной племенной их части [1]. Как известно, генетические ресурсы служат основой для создания новых и улучшения существующих пород овец, и являются национальным достоянием любой страны. Яйцеклетки часто используют в экспериментах, так у них достаточно большой размер (приблизительно 100 мкм), который облегчает точное измерение объема. Другое преимущество ооцитов состоит в том, что они могут использоваться как изолированные клетки в четырех различных и хорошо изученных физиологических состояниях: перед созреванием в профазе мейоза (стадия Germinal Vesicle, GV); после созревания (метафаза I мейоза) и

перед оплодотворением (метафаза II мейоза) и после оплодотворения в одноклеточной стадии (зигота). Эти четыре физиологических стадии соответствуют основным биологическим процессам, приводящим к началу эмбрионального развития. Также необходимо отметить важность сохранения ооцитов заключается в том, что они являются носителями цитоплазматической наследственности, что очень важно при сохранении биоразнообразия животных. Таким образом, консервация зрелых ооцитов представляет большой потенциальный интерес для практического применения, например связанного с оплодотворением *in vitro*. В ходе исследования нами ставилась задача выявить влияние разных методов криосохранения на выживаемость ооцитов на стадии метафаза II мейоза.

### **Материал и методы исследований**

Материал исследований – постмортальные ооциты овец. Для сбора незрелых ооцитов применяли метод сбора постмортальных ооцитов путем рассечения яичников и сбор ОКК (ооцит-кумулюс комплексов) из промывочного раствора DPBS, затем ооциты отмывали несколько раз в растворе DPBS для удаления кумулюсных клеток.

#### ***Культивирование in vitro незрелых ооцитов до стадии метафазы II мейоза.***

Для культивирования *in vitro* незрелых ооцитов до стадии метафазы II мейоза (МРП) использовали модифицированную среду TCM-199 [2].

Ооциты культивировали в 400  $\mu$ л среды, помещенных в одну из лунок 4-х луночной чашки Петри, покрытых минеральным маслом (mineral oil, Sigma, USA). Культивирование проводили в CO<sub>2</sub> инкубаторе Thermo II series (Thermo, USA), в увлажненной атмосфере с содержанием 5% CO<sub>2</sub>, при температуре 39°C в течение 24 часов.

Далее, ооциты помещали в среду, содержащую цитохалазин (Cytochalasin B), который необходим для перехода ооцита на стадию метафазы II мейоза, в которой формируется метафазная пластинка [3]. Как известно, все растворенные вещества в цитоплазме ооцита являются осмотически активными элементами, поэтому за счет формирования метафазной пластинки уменьшается объем цитоплазмы и уменьшается количество осмотически активных веществ. Таким образом, данный процесс позволит увеличить эффективность криосохранения ооцитов, за счет стабилизации цитоскелета яйцеклеток.

#### ***Уравновешенная криоконсервация ооцитов***

***Криопротекторы.*** В качестве криопротекторов использовали 1,5М диметилсульфоксид (Sigma, USA). Для замораживания ооцитов использовали соломинки (straws) производства IMV technologies емкостью 0,3 см<sup>3</sup>.

#### ***Охлаждение ооцитов, сидинг и замораживание***

Охлаждение ооцитов, сидинг и замораживание проводили с использованием программного замораживателя Planer Kryo-360 3,3 (Planer, UK). Замораживание ооцитов с

криопротектором, помещенных в соломинки, проводили по следующему температурному режиму охлаждения:

- стабилизация температуры соломинок с ооцитами в криопротекторе  $+20^{\circ}\text{C}$ , которая длится 5 мин;
- охлаждение соломинок с ооцитами в криопротекторе до температуры  $-7^{\circ}\text{C}$  со скоростью охлаждения  $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .
- сидинг достигается, когда соломинки охлаждаются до температуры  $-7^{\circ}\text{C}$ , происходит касанием рамки замораживателя тех областей соломинок, где расположены ооциты.
- замораживание соломинок до температуры  $-30^{\circ}\text{C}$  при скорости охлаждения  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .
- замораживание соломинок до температуры  $-150^{\circ}\text{C}$ , происходило при скорости охлаждения  $35^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , после чего соломинки с замороженными ооцитами переносятся в жидкий азот и хранятся в сосудах Дьюара до размораживания.

После хранения ооцитов в соломинках их размораживали по следующей схеме: 5 сек в атмо-сферном воздухе при комнатной температуре; размораживали замороженные ооциты в соломинках при температуре  $37,5^{\circ}\text{C}$  на водяной бане; извлекали ооциты с криопротектором и переносили в чашки Петри. Для удаления криопротекторов проводили обратную эквilibрацию в растворах с понижающейся концентрацией криопротектора с добавлением сахарозы (Sigma, USA).

### ***Витрификация ооцитов на стадии метафаза II мейоза.***

#### ***Растворы для витрификации и растворы для оттаивания ооцитов.***

В эксперименте применяли трех-ступенчатую процедуру насыщения ооцитов витрификацион-ными растворами:

- 1) 10% этиленгликоль (ЭГ) + 10% ДМСО + 0,25М сахарозы, экспозиция 5 мин.
- 2) 20% этиленгликоль (ЭГ) + 20% ДМСО + 0,5М сахарозы, экспозиция 5 мин.
- 3) Витрификационный раствор (VS): 40% этиленгликоль (ЭГ) + 40% ДМСО + 1М сахарозы на фосфатно-солевом буфере Дюльбекко (DPBS) –, экспозиция 30 сек.

Затем ооциты были заморожены с использованием витрификационного набора (High Security Vitrification Kit (HSV-Kit), Cryobiosystem (CBS), USA) при температуре жидкого азота  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Оттаивание витрифицированных ооцитов проводили помещая ооциты в растворы сахарозы 0,25М и 0,125М с экспозицией 5 мин [4-7]. После чего проведена морфологическая оценка качества девитрифицированных ооцитов. Ооциты без повреждений были использованы в дальнейших исследованиях.

### ***Индукция выделения второго полярного тельца ооцитов***

Для определения выживаемости ооцитов после криосохранения использовали метод активации выделения второго полярного тельца у ооцитов. Для активации выделения второго полярного тельца ооциты инкубировали в среде с  $7\mu\text{M}$  иономицином (Ionomycin,

Sigma, USA) в течение 5 мин. Затем ооциты отмывали в DPBS и культивировали в среде, содержащей 0,12mM 6-(диметиламино) пурин (6-DMAP, Sigma, USA) и 0.6µl/ml циклохексимида (Cycloheximide, Sigma, USA) в течение 4 часов [3]. После активации ооциты отмывали DPBS и культивировали в течение 24 часов. Ооциты, у которых было выявлено выделение второго полярного тельца, считали выжившими после замораживания и оттаивания.

## Результаты исследований

**Сбор постмортальных ооцитов овец.** В ходе проведенных работ по сбору постмортальных незрелых ооцитов были собраны ооциты, которые были культивированы до стадии созревания метафаза II мейоза (рисунок 1). Общее количество зрелых ооцитов на стадии метафаза II мейоза составило 336 яйцеклеток, которые были признаны пригодными для дальнейших исследований (рисунок 2). Эти ооциты были поделены на следующие три группы по принципу аналогов, включая контрольную группу.

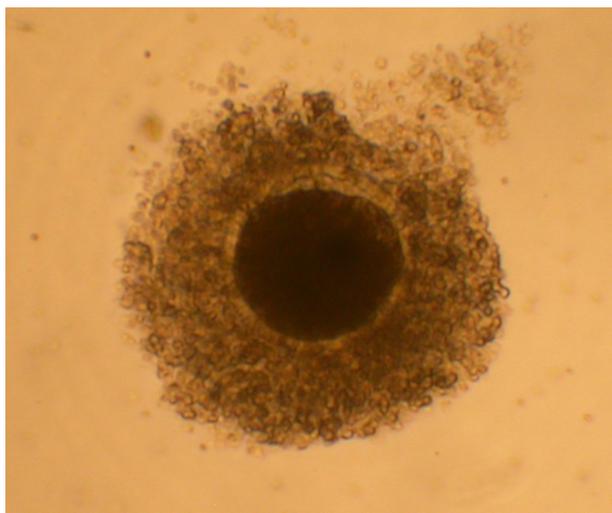


Рисунок 1 – Постмортальный ооцит-кумулюс комплекс

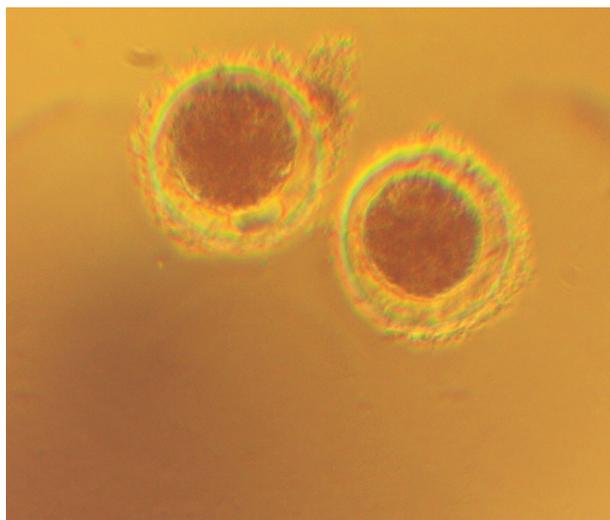


Рисунок 2 – Ооцит на стадии метафаза II мейоза

после культивирования *in vitro* (in vitro maturation),

первое полярное тельца

***Изучение влияния различных методов криосохранения на целостность цитоплазматических мембран ооцитов***

В ходе проведения исследований по изучению влияния различных методов криосохранения на целостность цитоплазматических мембран ооцитов на стадии метафаза II мейоза было выявлено, что при применении уравновешенной криоконсервации ооцитов МРП с использованием в качестве криопротектора 1,5 ДМСО наблюдается большое количество ооцитов с повреждениями цитоплазматической мембраны, наличие которых приводит к гибели клеток (таблица 1). Наиболее эффективным методом для сохранения целостности мембран яйцеклеток после замораживания и оттаивания был признан метод при применении метода витрификации, при котором наблюдались наименьший процент повреждений цитоплазматических мембран ооцитов. Статистический анализ  $\chi^2$  тест не выявил статистически достоверных отличий.

Таблица 1 – Влияние различных методов криосохранения на целостность цитоплазматических мембран ооцитов

Группы	Количество криосохраненных ооцитов, n	Количество ооцитов с неповрежденной цитоплазматической мембраной, n	Процент ооцитов с неповрежденной цитоплазматической мембраной, %
DMSO	110	43	39,9 <sup>a</sup>
HSV	111	55	49,5 <sup>b</sup>
Control	115	115	100 <sup>c</sup>

Примечание: *ac, bc P < 0,001.*

Как видно из таблицы 1, в ходе исследования наблюдалось, что применение метода витрификации более эффективно для сохранения целостности мембран ооцитов, чем применение метода медленного замораживания. Данное наблюдение, возможно, объясняется тем, что при быстром замораживании (витрификации) переход через опасную фазу образования кристаллов льда, которые могут повредить целостность мембран, происходит очень быстро и при этом опасные игловидной формы кристаллов льда не успевают сформироваться, так как происходит формирование единого стекловидного тела. А также при быстром замораживании уменьшается осмотическое давление при замораживании, за счет ускоренного процесса замораживания.

Исходя и вышеизложенного, можно предположить, что эффективным методом сохранения целостности мембран яйцеклеток после замораживания и оттаивания является метод витрификации при сверхнизкой температуре и ультрабыстрой скорости

замораживания с использованием криопетли, при котором наблюдались наименьший процент повреждений цитоплазматических мембран ооцитов.

***Изучение влияния различных методов криосохранения на активацию выделения второго полярного тельца ооцитов***

В ходе проведения эксперимента по выделению второго полярного тельца ооцитов после замо-раживания-оттаивания выявлено, что более высокий процент 38,2% ооцитов с активированным вторым полярным тельцем наблюдался при применении метода витрификации (таблица 2).

Таким образом, можно предположить, что применение методов быстрого замораживания (витрификации) более эффективны для криосохранения жизнеспособности ооцитов, так как после применения этих методов большее количество ооцитов сохраняют свою основную функцию – способность к дальнейшему оплодотворению и развитию.

Таблица 2 – Влияние различных методов криосохранения на выделение второго полярного тельца ооцитов

Группы	Количество ооцитов, n	Количество ооцитов со вторым полярным тельцем, n	Процент ооцитов со вторым полярным тельцем, %
DMSO	43	9	20,9 <sup>a</sup>
HSV	55	21	38,2 <sup>b</sup>
Control	58	36	62,1 <sup>c</sup>

Примечание: *ac, bc P < 0,001.*

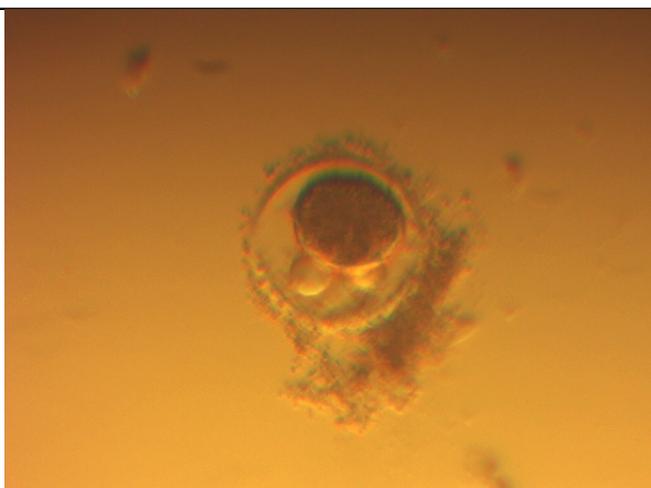


Рисунок 3 – Ооцит со вторым полярным тельцем после витрификации

## ЛИТЕРАТУРА

1 Отчет FAO «Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства», Комиссия по генетическим ресурсам в сфере продовольствия и сельского хозяйства / Продовольственная и сельскохозяйственная Организация Объединенных Наций. – Рим, 2007. – 38 с.

2 Dattena M., Pilichi S., Accardo C., Mara L., Chessa B., Chessa F., Cappai P. The vitrification of metaphase ii plate in sheep oocytes: Preliminary study // Role of biotechnology Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, 2005. – P. 167-168.

3 András Dinnyés, Yunping Dai, Shie Jiang, and Xiangzhong Yang. High Developmental Rates of Vitrified Bovine Oocytes Following Parthenogenetic Activation, In Vitro Fertilization, and Somatic Cell Nuclear Transfer // Biol. Reprod. – August 2000. – 63. – (2). – P. 513-518.

4 Arav A., Zeron Y., Ocheretny A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes // Theriogenology 2000. – 53. – P. 248-249.

5 Martino A., Songsasen N., and Leibo S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling // Biol. Reprod. – 1996. – 54. – (5). – P.1059-1069.

6 Michelle Lane, Barry D. Bavister, Elizabeth A. Lyons & Katrina T. Forest Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos // Nature Biotechnology – 1999. – 17. - P. 1234 – 1236.

Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P.J., Jacobsen H., Greve T., Callesen H. [Open pulled straw \(OPS\) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos // Mol. Reprod.Dev. – 1998. – 51. – P. 53-58.](#)

## REFERENCES

1 Отчет FAO «Sostojanie vsemirnyh geneticheskikh resursov zivotnyh v sfere prodovol'stvija i sel'skogo hozjajstva», Komissija po geneticheskim resursam v sfere prodovol'stvija i sel'skogo hozjajstva / Prodovol'stvennaja i sel'skohozejstvennaja organizacija Ob#edinennyh Nacij. – Rim, 2007. – 38 с.

2 Dattena M., Pilichi S., Accardo C., Mara L., Chessa B., Chessa F., Cappai P. The vitrification of metaphase ii plate in sheep oocytes: Preliminary study // Role of biotechnology Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, 2005. – P. 167-168.

3 András Dinnyés, Yunping Dai, Shie Jiang, and Xiangzhong Yang. High Developmental Rates of Vitrified Bovine Oocytes Following Parthenogenetic Activation, In Vitro Fertilization, and Somatic Cell Nuclear Transfer // Biol. Reprod. – August 2000. – 63. – (2). – P. 513-518.

4 Arav A., Zeron Y., Ocheretny A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes // Theriogenology 2000. – 53. – P. 248-249.

5 Martino A., Songsasen N., and Leibo S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling // Biol. Reprod. – 1996. – 54. – (5). – P.1059-1069.

6 Michelle Lane, Barry D. Bavister, Elizabeth A. Lyons & Katrina T. Forest Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos // Nature Biotechnology – 1999. – 17. - P. 1234 – 1236.

7 Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P.J., Jacobsen H., Greve T., Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos // Mol. Reprod.Dev. – 1998. – 51. – P. 53-58.

## Резюме

*М.М. Тойшыбеков, Р. К. Тұрсынова*

### МЕТАФАЗА ЖӘНЕ II МЕЙОЗА КЕЗЕҢІНДЕ ҚОЙДАҒЫ ООЦИТ ӨМІРШЕҢДІГІНЕ ӘРТҮРЛІ КРИОСАҚТАУ ӘДІСТЕРІНІҢ ӘСЕРІ

(«Ф. М. Мұхамедғалиев атындағы экспериментальды биология институты» ЖШС,

Алматы, Қазақстан Республикасы)

Біздің зерттеу жұмысымыз бойынша аналық жасушаның мембранасының цитоплазмалық бүтіндігінің метафаза II мейоз кезеңінде әртүрлі криосақтау әдістерінің әсерін зерттеу барысында, криопротектор ретінде 1,5 м ДМСО қолдану нәтижесінде цитоплазмалық мембранасы зақымданған аналық жасушаның өліміне алып келіп соқтырады. Зерттеу жұмысының нәтижесі бойынша қатыру мен ерітуден кейін аналық жасуша-лардың цитоплазмалық мембранасының бүтіндігін криосақтап қалудың ең тиімді әдістері витрификация әдісі болып табылды, яғни бұл жерде аналық жасушалардың цитоплазмалық мембранасының зақымдануы пайыз бойынша төмен болған.

**Тірек сөздер:** ДМСО – диметилсульфоксид, DPBS – Дульбекко тұзды-фосфатты буфер, ООЖ – ооцит кумулюсті жиынтық, ЭГ – этиленгликоль.

## Summary

*M. M. Toishibekov, R. K. Tursunova*

(LLP «Institute of experimental biology them F. M. Mukhamedgaliyeva», Almaty, Republic of Kazakhstan)

THE INFLUENCE OF DIFFERENT METHODS OF CRYOPRESERVATION  
ON THE SURVIVAL OF OOCYTES SHEEP ON STAGE METAPHAZA MEIOSIS II

In our studies on the effect of different methods of cryopreservation on the integrity of the cytoplasmic membrane of oocytes at metaphase of meiosis II revealed that the application of the balanced MPII oocyte cryopreservation using DMSO as cryoprotectant 1.5 has seen a large number of oocytes with cytoplasmic membrane damage, which can lead to cell death. The results showed that the most effective way to maintain the integrity of the membranes of eggs after freezing and thawing method was found in the application of the method of vitrification, in which there is the least percentage of damage of the cytoplasmic membrane of oocytes.

**Keywords:** DMSO – dimethyl sulfoxide, DPBS – Dulbecco's phosphate-buffered saline, COC – oocyte-cumulus complex, EG – ethylene glycol.

*Поступила 04.06.2013 г.*