

Е.М. ТОЙШИБЕКОВ

ИЗУЧЕНИЕ ПРИЖИВЛЯЕМОСТИ ЗАМОРОЖЕННЫХ ЭМБРИОНОВ ОВЕЦ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ СВЕРХНИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И УЛЬТРАБЫСТРОЙ ВИТРИФИКАЦИИ

(Институт экспериментальной биологии им. Ф.М.Мухамедгалиева МОН РК)

Использована новая методика консервации эмбрионов овец при сверхнизкой температуре и ультрабыстрой витрификации. Изучена жизнеспособность ранних эмбрионов овец при воздействии сверхнизкой температуры и ультрабыстрой витрификации при использовании нового оборудования VIT-Master. Полученные данные расширяют фундаментальные научные знания криобиологии и помогут в дальнейшем решить проблему сохранения ценных и исчезающих пород овец Казахстана.

В настоящее время для консервации эмбрионов применяют в основном два метода: криоконсервация и витрификация, которые различаются не только используемыми составами сред для замораживания, но и по скорости замораживания.

Так, криоконсервация эмбрионов проводится с использованием криопротекторов (сред): с меньшей концентрацией компонентов, например, 1,5 М этиленгликоля + 1М глицерин в фосфатно-солевом буфере и проводится «медленное» поэтапное охлаждение со скоростью замораживания от 0,1 °С в минуту с последующим хранением в жидком азоте [1]. А витрификация эмбрио-

нов проводится в витрификационном растворе (VS), содержащим «большие» концентрации, например, 38% этиленгликоль + треха-лоз и «быстрое» охлаждение до – 196°С, при этом исключается образование кристаллов льда [2]. Процесс затвердевания при быстром охлаждении и называется витрификацией (стеклование).

Однако в связи развитием научных технологий появился новый подход к витрификации, который отличается от известных методов использованием сверхнизких температур (-205°С до -210°С) и ультрабыстрой витрификацией. Эти режимы достигаются при применении нового обо-

рудования VIT Master Vitrificator (Germany). В процессе замораживания переохлажденный LN облегчает теплообмен между поверхностью витрификационного раствора и LN [3]. Эта методика оказалась эффективной для витрификации гамет и эмбрионов КРС [3].

Исходя из вышеизложенного, нами ставилась задача изучения жизнеспособности эмбрионов овец при таком режиме замораживания.

Материал и методика

Индукция суперовуляции и оплодотворение. В качестве доноров эмбрионов были использованы ярки казахской полутонкорунной породы в количестве 30 голов. Живая масса подопытных маток находилась в пределах 47,5-49,0 кг и составляла в среднем $48,05 \pm 1,8$ кг.

Индукцию суперовуляции у овец-доноров проводили по следующей схеме. На 12- день полового цикла внутримышечно вводили гонадотропный гормон Folligon (Intervet International, Netherlands) в дозе 1200 ИЕ. Через 48 часов внутримышечно инъецировали 125 мг простагландина $F_{2\alpha}$ (Эстрофан) [4]. После применения данной схемы гормональной обработки животные приходили в эструс в течение 48 часов. Животным с наличием эструса вводили внутривенно хорионический гонадотропин человека в дозе 1000 ИЕ и оплодотворяли [5].

Извлечение и морфологическая оценка эмбрионов. Извлечение эмбрионов проводили методом лапаротомии на 0-5-6 сутки после оплодотворения [4]. Полученные эмбрионы после обнаружения оценивали по морфологическим признакам, для чего использовали фазово-контрастный микроскоп Axiostar plus с объективами Achromat 20LD и 40 LD (Zeiss, Germany).

Полноценными эмбрионами считались эмбрионы, которые имели правильную шарообразную форму, гомогенную светлую цитоплазму, целостную прозрачную оболочку, одинаковый размер blastomeres с определенным характером их расположения (плотность межклеточных контактов) [6].

Полноценные эмбрионы на стадии развития морула были поделены на три группы:

1-ая группа, эмбрионы были заморожены с применением сверхнизкой температуры (VitMaster).

2-ая группа эмбрионов была витрифицирована без использования сверхнизкой температуры LN.

3-я группа эмбрионов (контрольная) была трансплантирована реципиентам, находящимся на одинаковой стадии полового цикла по срокам развития трансплантируемых эмбрионов.

Витрификация при сверхнизкой температуре и оттаивание эмбрионов.

Для витрификации эмбрионов 1-ой группы была применена процедура витрификации по методике Lane et al. [7, 8]. В эксперименте применяли двух-ступенчатую процедуру насыщения эмбрионов витрификационным раствором:

1) 10% этиленгликоль + 10% диметилсульфоксид на фосфатно-солевом буфере Дюльбекко (DPBS), экспозиция 2 мин.

2) 20% этиленгликоль + 20% диметилсульфоксид на фосфатно-солевом буфере Дюльбекко (DPBS) – витрификационный раствор (VS), экспозиция 30 сек.

Эмбрионы первой группы после насыщения витрификационным раствором были перенесены на поверхность нейлоновой петли (объем $\approx 20 \mu\text{l}$, диаметр $\approx 0,5$ мм.) При использовании рассеивающего давления температура жидкого азота в камере для замораживания VIT-Master (Germany) (Рис. 1) достигает температуры -205°C . После чего петли с эмбрионами были помещены в охлажденные криобирки (объем 1,8 мл.), которые находились в камере для замораживания VIT-Master (Germany), непосредственно в переохлажденный LN.



Рис. 1. VIT-Master Vitrificator

Для витрификации эмбрионов 2-ой группы использовали вышеописанную процедуру по насыщению эмбрионов витрификационным раство-

ром. Однако для витрификации мы не применяли сверхнизкую температуру LN. Температурные режимы охлаждения при использовании вышеуказанных методов представлены на графике 1.

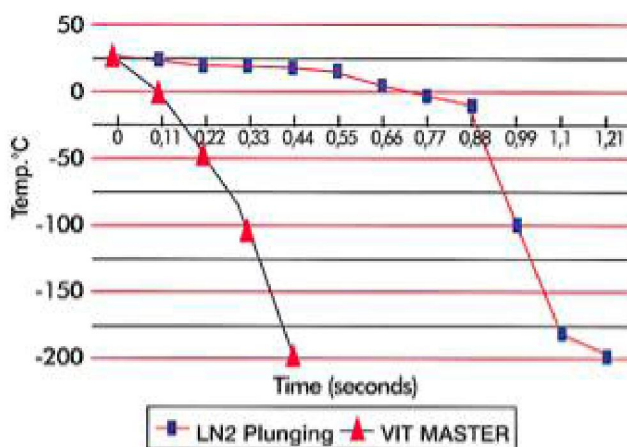


График 1. Температурные режимы охлаждения при использовании различных методов (График предоставлен изготовителем VIT-Master).

Оттаивание эмбрионов и удаление витрификационного раствора. Оттаивание витрифицированных эмбрионов проводили следующим способом: помещая петли с витрифицированными эмбрионами в растворы сахарозы 0,25M и 0,125M с экспозициями 2 и 3 мин. соответственно. После чего была проведена морфологическая оценка качества девитрифицированных эмбрионов.

Эмбрионы признанные годными для дальнейшей трансплантации были трансплантированы реципиентам.

Результаты исследований и их обсуждение.

В результате индукции суперовуляции, оплодотворения, хирургического извлечения и морфологической оценки качества вымытых эмбрионов, нами были получены следующие результаты. Процент вымываемости эмбрионов от числа желтых тел составил 91,6 %. Из 197 зародышей, полученных от маток-доноров, 12 оказались, неоплодотворенных, 18 - дегенерированных, 16 – на 2-х клеточной стадии развития, 30 находились на 4-8 клеточной стадии развития и 121 эмбрион на стадии морулы (табл. 1).

Таблица 1. Количество и качество эмбрионов, полученных после обработки гормональными препаратами

Показатели	Количество
Количество животных, n	30
Общее количество желтых тел, n	215
Получено яйцеклеток и эмбрионов (n,(%) от к-ва желтых тел)	197 (91,6)
из них:	
Неоплодотворенных яйцеклеток, n,(%)	12 (6,1)
Дегенерированных, n,(%)	18 (9,1)
2-х клеточных, n,(%)	16 (8,1)
4-8-клеточных, n,(%)	30 (15,2)
Морулы, n,(%)	121 (61,4)

Для проведения дальнейших исследований мы использовали только морулы, которые были поделены на три группы. Общее количество морул в первой группе составило 42 эмбриона, во второй группе – 49 эмбрионов и в третьей группе (контроль) – 30 эмбрионов.

После проведения витрификации, оттаивания и морфологической оценки качества девитрифицированных морул нами были получены следующие результаты (табл. 2.). В первой группе эмб-

рионов, которая была витрифицирована с применением сверхнизкой температуры LN, были признаны пригодными для дальнейшей трансплантации реципиентам 85,7% девитрифицированных морул от общего количества витрифицированных эмбрионов, во второй группе – 93,9%. При проведении морфологической оценки качества эмбрионов наблюдается большее количество морул пригодных для дальнейшей трансплантации во второй подопытной группе витрифицированной

без использования сверхнизкой температуры LN. Однако дальнейшие исследования показали, что эти результаты не являются абсолютными показателями выживаемости эмбрионов при витрификации. Однако стоит признать, что ни один из

известных методов оценки качества не является универсальным и необходимо применять комплексный подход, применяя различные методы для выбраковки нежизнеспособных эмбрионов.

Таблица 2. Результаты оценки эмбрионов

Показатели	Группа I	Группа II	Контроль
Общее количество морул, n	42	49	30
Количество эмбрионов пригодных для трансплантации, n (%)	36 (85,7)	46 (93,9)	30 (100)
Количество эмбрионов непригодных для трансплантации, n (%)	6 (14,3)	3 (6,1)	-
Уровень первичной приживляемости, n (%)	17 (47,2)	16 (34,8)	27 (90,0)
Количество ягнят трансплантатов, n (%)	10 (27,8)	10 (23,9)	20 (66,6)

После трансплантации девитрифицированных морул из двух подопытных

групп и трансплантации эмбрионов из третьей (контрольной) группы реципиентам, нами была установлен уровень первичной их приживляемости. Первичную приживляемость устанавливали по отсутствию эструсов у реципиентов в течение двух эстральных циклов. Таким образом, уровень первичной приживляемости составил в первой группе 47,2% от общего количества трансплантированных эмбрионов, во второй группе – 34,8% и в третьей (контрольной) группе (90%). Полученные результаты по первичной приживляемости эмбрионов наглядно показывают некоторое преимущество применения сверхнизкой температуры для витрификации эмбрионов, но первичная приживляемость не может служить окончательным показателем их приживляемости. Это связано с уровнем эмбриональной смертности, которая зависит от множества факторов.

Эффективность примененных методов мы определяли по результатам ягнения, т.е. при рождении ягнят-трансплантатов. Количество рожденных ягнят-трансплантатов в первой группе 10 голов, что составляет 27,8% от общего количества 36 трансплантированных девитрифицированных эмбрионов. Во второй группе количество ягнят-трансплантатов 10 голов, что составляет

23,9% от общего количества 46 трансплантированных девитрифицированных эмбрионов. В контрольной группе были получены ягнят-трансплантатов 20 голов (плодотворная приживляемость составила 66,6%).

Полученные результаты были обусловлены тем, что факторы необходимые для успешного витрификации заключались в быстрой скорости замораживания, более высокой вязкости витрификационного раствора и малого объема витрификационного раствора, в котором витрифицировали эмбрионы. Все эти факторы необходимы для уменьшения формирования кристаллов льда как внутриклеточном так и в межклеточном пространстве ([9] Rall, 1987; [1] Arav et al., 2002; [10] Kasai et al., 2002; [11] Liebermann et al., 2002). Сверхбыстрый режим замораживания, который обусловлен сверхнизкой температурой LN, которая достигается при применении нового оборудования VIT-Master, предоставил два преимущества перед негативными факторами более медленного режима замораживания (см. график 1).

Первый фактор токсическое влияние высоких концентраций витрификационных растворов. При применении сверхбыстрой витрификации используемая концентрация витрификационного раствора может быть уменьшена, что повлечет уменьшение токсического влияния на эмбрионы.

При обычной витрификации эмбрионы погружены в большие концентрации витрификационных растворов (5М-8М) ([12] Rall and Fahy, 1985). В своих работах Yeoman *et al.* [13] (2001) исследовал два различных уровня витрификационных растворов с использованием криопетли (cryoloop) на бластоцистах макаки Резус. Один витрификационный раствор содержал 25 % (4,5 М) этиленгликоля и 25 % (3,4 М) глицерина и оказался более эффективным, однако, другой витрификационный раствор, который содержал 20 % (3,6 М) этиленгликоля, 20 % (2,4 М) диметилсульфоксида, 0,65 М сахарозы и 25 μ М Фиколла, оказался неэффективным. В этой публикации автор (Yeoman *et al.*, 2001) указал, что более высокая концентрация витрификационного раствора была необходима для успешной витрификации даже при использовании криопетли (cryoloop) [13].

В наших исследованиях, мы использовали витрификационный раствор, составленный из 20 % (3,6 М) этиленгликоля, 20 % (2,4 М) диметилсульфоксида. Это показывает, что при ультра быстрой скорости замораживания, вязкость используемого витрификационного раствора может быть снижена, при этом, сохраняется ее криозащитная функция, и, таким образом, уменьшается токсичность витрификационного раствора для эмбрионов и гамет.

Второй фактор, быстрый переход через опасную температурную зону приводит к пугающим повреждениям клеток [14]. Этот фактор обусловлен скоростью охлаждения при обычной витрификации, которая составляет 2500 $^{\circ}$ С [12]. Ультрабыстрая скорость витрификации является специфическим показателем характеристикой сверхбыстрого замораживания и она позволяет дальнейшее увеличение скорости замораживания до 24 000 $^{\circ}$ С/мин при использовании EM сетки (EM grid) [15], до 20 000 $^{\circ}$ С/мин когда используются соломинки OPS-процедура [14], и до 20000 $^{\circ}$ С/мин используя криопетлю (cryoloop) [16]. Достижимая скорость замораживания в переохлажденном LN составляет 100 000 $^{\circ}$ С/мин (согласно инструкции изготовителя) и превышает в 5 раз скорость замораживания, которую можно достичь при использовании криопетли (cryoloop). Наши исследования показали, что эмбрионы овец способны перескочить через опасную температурную зону при ультра быстрой скорости замораживания и эмбрионы сохранили свою способность к дальнейшему развитию.

Для уменьшения объема витрификационного раствора в процессе витрификации А.Арав [17] разработал метод витрификации коровьих эмбрионов, суть которой заключается в использовании «минимального объема капли» (“minimum drop size” (MDS)) объемом 0,1-0,5 μ Л витрификационного раствора в сверх охлажденном LN (-210 $^{\circ}$ С). Этот подход максимизировал скорость замораживания до самого высокого физически возможного (24000-130000 $^{\circ}$ С/мин). Таким образом, использование криопетли (cryoloop) является эффективным решением для уменьшения объема витрификационного раствора, используемого в процессе витрификации [7, 8]. Объем витрификационного раствора в пределах тонкого слоя пленки в криопетле (cryoloop) составляет 0,1-0,2 μ Л. Поэтому, мы использовали криопетлю (cryoloop) для достижения сверх охлажденной витрификации. Объем витрификационного раствора, используемого в витрификации с применением криопетли (cryoloop) является достаточно небольшим, чтобы усилить успех витрификации и также избежать возникновения потенциальных повреждений эмбрионов в процессе замораживания [10].

Таким образом, ультрабыстрое замораживание уменьшает вероятность формирования кристаллов льда. Комбинация «криопетля-ультрабыстрое замораживание» значительно уменьшает формирование кристаллов льда.

В этом исследовании показана эффективность витрификации при комбинированном использовании сверх охлажденного LN и криопетли (cryoloop). Предложенный метод является быстродействующим и эффективным для криосохранения эмбрионов в программах по сохранению генетических ресурсов животных.

Выводы:

1. Наши исследования показали, что эмбрионы овец способны перескочить через опасную температурную зону при ультра быстрой скорости замораживания, сохраняя свою способность к дальнейшему развитию.

2. Объем витрификационного раствора, используемый в витрификации с применением криопетли (cryoloop) является достаточно небольшим, чтобы усилить успех витрификации и также избежать возникновения потенциальных повреждений эмбрионов в течение процесса замораживания.

3. Ультрабыстрое замораживание значительно уменьшает, а также комбинация «криопетля-ультрабыстрое замораживание» еще больше уменьшает вероятность формирования кристаллов льда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kaidi S., Donnay I., Lambert P. Osmotic behavior of in vitro produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions predictive test of survival // *Cryobiology* // 2000. V.41. P. 106-115.
2. Baril G., Traldi A-L., Cognie Y. et. al. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos // *Theriogenology* // 2001. V.56. P.299-305.
3. Arav A., Yavin S., Zeron Y., Natan D., Dekel I and Gacitua H (2002) New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2, 77–81.
4. Ф.М. Мухамедгалеев, М.М. Тойшибеков и др. Трансплантация эмбрионов в племенном овцеводстве // Алматы, Изд-во «Наука». 1981. 169 с.
5. М.М. Тойшибеков, Даминов Б. Трансплантация эмбрионов каракульских овец. // В кн. Генетика и биотехнология животных // Алматы. 1998. С. 19-23.
6. Б. Даминов. Повышение приживляемости ранних эмбрионов овец при трансплантации путем отбора их жизнеспособности методом культивирования // *Известия АН КазССР, сер. биол.* 1990 № 2. С. 81-87.
7. Lane M, Bavister BD, Lyons EA and Forest KT (1999a) Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nature Biotechnol* 17, 1234–1236.
8. Lane M, Schoolcraft WB and Gardner DK (1999b) Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 72, 1073–1078.
9. Rall WF (1987) Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24, 387–402.
10. Kasai M, Ito K and Edashige K (2002) Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum Reprod* 17, 1863–1874.
11. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G and Tucker MJ (2002) Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 67, 1671–1680.
12. Rall WF and Fahy GM (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313, 573–575.
13. Yeoman RR, Gerami-Naini B, Mitalipov S, Nusser KD, Widmann-Browning AA and Wolf DP (2001) Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts. *Hum Reprod* 16, 1965–1969.
14. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T and Callesen H (1998) Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 51, 53–58.
15. Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner L, Bronshteyn V, Leibo SP, Rall WF, Pitt RE, Lin TT and MacIntyre RJ (1990) Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature* 345, 170–172.
16. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M and Takahashi K (2001) Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil Steril* 76, 618–620.
17. Arav A., Zeron Y. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions // *Theriogenology* // V.47. 1997. P.341.

Резюме

Қазақстанда жоралып бара жатқан және бағалы қой тұқымдарын сақтап қалу үшін авторлар ерекше суық температура және ультрашапшаң витрификациялауды қолдана отырып, қой эмбриондарын консервациялаудың жаңа тәсілі пайдаланылды.

Алынған деректер криобиология ғылымының негізгі саласын толықтыра түседі.

Summary

The authors was used new method of sheep embryo conservation with using super-cooling ultra-rapid vitrification. Researchers were study survey embryos after using super-cooling temperature -205°C and ultra-rapid vitrification on new device VIT-Master. This research will help on fundamental aspects of cryobiology and help of preservation genetic resource sheep breeds of Kazakhstan.