

Замораживание ооцитов млекопитающих в широком диапазоне скоростей теплообмена

А.С. САЛИНА¹, П.А. ТРОЦКИЙ², О.Е. ГУЗЕВАТЫЙ², Л.В. ГОРБУНОВ¹, Е.Г. ЛИСИНА¹, Ю.М. СОБКО²

¹Институт животноводства УААН, г. Харьков

²Институт разведения и генетики животных УААН, г. Киев

Mammalian Oocytes Freezing Within a Wide Range of Heat Exchange Rates

A.S. SALINA¹, P.A. TROTSKY², O.E. GUZEVATYI², L.V. GORBUNOV¹, E.G. LISINA¹, YU.M. SOBKO²

¹Institute of Animal Breeding of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov

²Institute of Animal Breeding and Genetics of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kiev

В настоящее время существует проблема установления эффективности способов замораживания ооцитов млекопитающих в широком диапазоне скоростей охлаждения и нагрева. Решение этой задачи возможно при сравнительном анализе существующего многообразия методов криоконсервирования генетического материала, которые основаны на применении медленных, высоких и сверхвысоких скоростей замораживания.

Объектами исследования были ооциты мышей и коров, полученные по общепринятым методикам. Контейнерами для замораживания служили соломинки с разным внешним диаметром и пробирки Уленгута (объем около 0,75 мл). Ооциты замораживали при медленных скоростях (0,3°C/мин) в устройстве, основанном на пассивном охлаждении термоблока в горловине сосуда Дьюара X-34 (Пат. 60161А Украина. Л.В. Горбунов и др., 2003). Для замораживания с высокими скоростями (2×10³°C/мин, диаметр соломинок 2 мм) использовали эквilibрирующий раствор криопротектора – 10% этиленгликоля (ЭГ), а витрифицирующий – 40% ЭГ + 0,5М сахарозы. При криоконсервировании со сверхвысокими скоростями (6×10³°C/мин, диаметр соломинок 1 мм) применяли разные концентрации витрифицирующего раствора криопротектора, состоящего из глицерина и сахарозы или ЭГ и сахарозы. Сохранность замороженно-оттаянных ооцитов определяли по морфологическим показателям (П. Кауффольд, И. Тамм, 1990), а жизнеспособность – по результатам культивирования и оплодотворения *in vitro*.

При медленных скоростях замораживания морфологическая сохранность ооцитов мышей и коров составила 66,7±5,9 (n=63) и 68,2±9,9% (n=22) соответственно. После созревания и оплодотворения *in vitro* ооцитов коров получены 2-клеточные эмбрионы, сохранность составила 11,1±6,7 (n=22), а в контрольной группе – 18,7±10,0% (n=15).

После замораживания ооцитов млекопитающих при высоких скоростях теплообмена сохранность ооцитов мыши в группах с предварительной экспозицией 15, 10, 5 и 0 мин в эквilibрирующем растворе составила 54±7,90 (n=46); 68±9,00 (n=57); 63±6,25 (n=62); 60±7,90% (n=57), а для ооцитов коровы 42,8±18,7 (n=7); 71,4±16,0 (n=8); 81,8±11,6 (n=11); 77,7±6,2% (n=45) соответственно. В группах с предварительной выдержкой 5 и 0 мин после дозревания и оплодотворения *in vitro* получены 2-бластомерные эмбрионы крупного рогатого скота, их сохранность составила 9,1±8,7 (n=11); 7,1±3,8% (n=45) соответственно.

Сохранность деконсервированных ооцитов мышей при сверхвысоких скоростях замораживания с использованием витрифицирующего криопротектора, состоящего из ЭГ и сахарозы в концентрациях 58, 53, 48, 43 и 38%, составила 55,5±7,0 (n=50); 60±6,9 (n=50); 50±7,1

Nowadays there is a problem to establish the efficiency of ways for mammalian oocyte freezing within a wide range of cooling and heating rates. This task solving is possible when carrying-out a comparative analysis of existing methods of genetic material cryopreservation, based on applying slow, high and ultra-high cooling rates.

Investigation objects were murine and bovine oocytes, obtained by standard used methods. Straws with different external diameter and Uhlength vials (volume about 0.75 ml) served as containers for freezing. Oocytes were frozen under slow rates (0.3°C/min) in the device, based on passive cooling of thermoblock in X-34 Dewar vessel neck (Patent 60161A Ukraine. L.V. Gorbunov et al., 2003). To freeze with high rates (2×10³°C/min, 2 mm straw diameter) we used equilibrating solution of cryoprotectant: 10% ethylene glycol (EG) and vitrifying: 40% EG+0.5 M sucrose. When cryopreserving with ultra-high rates (6×10³°C/min, 1 mm diameter straw) there were applied different concentrations of vitrifying solution of cryoprotectant, consisting of glycerol and sucrose or EG and sucrose. Integrity of frozen-thawed oocytes was determined by morphological parameters (P. Kauffold, I. Tamm, 1990), and viability was done by the results of culturing and fertilisation *in vitro*.

During slow cooling rates the morphological integrity of murine and bovine oocytes made 66.7±5.9 (n=63) and 68.2±9.9 (n=22), correspondingly. After bovine oocyte maturity and fertilisation *in vitro* 2-cell embryos were obtained, the integrity made 11.1±6.7 (n=22) and 18.7±10.0% (n=15) in the control group.

After freezing mammalian oocytes under high heat exchange rates the integrity of murine oocytes in groups with preliminary exposure for 15, 10, 5 and 0 min in equilibrating solution made 54±7.90 (n=46); 68±9.00 (n=57); 63±6.25 (n=62); 60±7.90% (n=57) and for bovine oocytes it was 42.8±18.7 (n=7); 71.4±16.0 (n=8); 81.8±11.6 (n=11); 77.7±6.2 (n=45), correspondingly. In groups with preliminary exposure for 5 and 0 min after maturation and fertilisation *in vitro* 2-blastomere cattle embryos were obtained, their integrity made 9.1±8.7 (n=11); 7.1±3.8% (n=45), correspondingly.

Integrity of frozen-thawed murine oocytes at ultra-rapid freezing rate using vitrifying cryoprotectant, comprising EG and sucrose in 58, 53, 48, 43, 38% concentrations made 55.5±7.0 (n=50); 60±6.9 (n=50); 50±7.1 (n=50); 44.4±11.1 (n=20); 42.8±11.1 (n=20), correspondingly. For bovine oocytes all concentrations of cryoprotectant solution by morphological indices provided integrity approximately at the same level: 60.0±6.7% (n=20÷50), however after maturation and fertilisation *in vitro* only in group with 53% concentration the bovine oocyte development up to 4-cell embryo (11.1±9.5% (n=11)) was observed. When using vitrifying glycerol and sucrose-contained solution no viable oocytes were obtained.

(n=50); 44,4±11,1 (n=20); 42,8±11,1% (n=20) соответственно. Для ооцитов коров все концентрации растворов криопротекторов по морфологическим показателям обеспечили сохранность приблизительно на одном уровне (60,0±6,7%, n=20÷50), однако после созревания и оплодотворения *in vitro* только в группе с концентрацией 53% наблюдалось развитие ооцитов коровы до 4-клеточного эмбриона (11,1±9,5%, n=11). При использовании витрифицирующего раствора, состоящего из глицерина и сахарозы, жизнеспособных ооцитов не получено.

Таким образом, при замораживании ооцитов млекопитающих в широком диапазоне скоростей теплообмена наблюдаются приблизительно одинаковые уровни жизнеспособности деконсервированного биообъекта (7,1±11,1%, n=11÷45) с развитием до стадии 2-клеточного эмбриона, однако развитие до 4-клеточных эмбрионов указанного уровня жизнеспособности получено только при сверхвысоких скоростях теплообмена.

Thus, when freezing mammalian oocytes within a wide range of heat exchange rates nearly the same levels of viability of frozen-thawed bioobject (7.1±11.1%, n=11÷45) with development up to 2-cell embryo stage were observed, but development up to 4-cell ones with the mentioned viability level was obtained only under ultra-rapid heat exchange rates.

Влияние криопротекторов и замораживания на эритроциты млекопитающих

О.Н. ДЕНИСОВА

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Influence of Cryoprotectants and Freezing on Mammalian Erythrocytes

O.N. DENISOVA

Kharkov State Zooveterinary Academy

В последние годы в ветеринарии все чаще прибегают к трансфузионным операциям. Консервированная кровь, заготовленная на гемоконсерванте, может сохранять свои морфобиохимические показатели в течение 14 дней. Для сохранности эритроцитов на протяжении многих лет применяют криоконсервирование. Множество работ посвящено исследованию замораживания-отогрева эритроцитов человека. Для изучения методов криоконсервирования эритроцитов животных необходимы дополнительные эксперименты.

Цель данной работы – исследовать методы криоконсервирования эритроцитов некоторых животных (конь, бык, собака), определить эффективность эндоцеллюлярных (глицерин и ДМСО) и экзоцеллюлярного (ПЭО-1500) криопротекторов в процессе замораживания-отогрева эритроцитов млекопитающих.

Эритроциты животных замораживали со следующими растворами: 30%-м глицерином, 20%-м ДМСО и 30%-м ПЭО-1500. Криопротекторы добавляли к эритроцитам в соотношении 1:1, замораживали до -196°C погружением контейнера в жидкий азот, после хранения отогревали на водяной бане при 42-45°C.

Проведенные исследования показали, что глицерин (проникающий криопротектор), который наиболее часто используют для криоконсервирования эритроцитов человека, не оказывает криозащитного действия при замораживании-отогреве эритроцитов исследуемых животных. Степень повреждения эритроцитов животных при замораживании в присутствии глицерина составляет 60-90%.

Величина гемолиза эритроцитов животных после замораживания-отогрева под защитой ДМСО составляет от 20 до 30%, а под защитой ПЭО-1500 – 0,5-3%.

Recently transfusion operations have been getting frequently used in veterinary. Preserved blood procured with hemopreservative may keep its morphobiochemical indices for 14 days. Cryopreservation is used to preserve erythrocytes for many years. Numerous papers are devoted to studying freeze-thawing of human erythrocytes. To investigate cryopreservation method for animals' erythrocytes additional experiments are necessary.

The research aim was to investigate cryopreservation methods for mammalian erythrocytes (equine, bovine, canine), to examine the efficiency of endocellular (glycerol and DMSO) and exocellular (PEO-1500) cryoprotectants during freezing of erythrocytes.

Erythrocytes of animals were frozen with 30% glycerol, 20% DMSO and 30% PEO-1500. Cryopreservatives were added to erythrocytes in the 1:1 ratio, they were frozen down to -196°C by plunging a container into liquid nitrogen. After storage they were thawed on water bath at 42-45°C.

Performed studies showed that glycerol (penetrating cryoprotectant) being the most frequently used for cryopreservation of human erythrocytes did not cause a cryoprotective effect during freeze-thawing of the erythrocytes of animals under studying. In glycerol presence animal erythrocytes have 60-90% injury degree.

Hemolysis value of animals' erythrocytes after freeze-thawing under DMSO protection makes from 20 to 30% and under PEO-1500 one is 0.5-3%.

When transferring animals' erythrocytes after thawing into isotonic NaCl solution at 37°C (transfusion model) there are observed statistically significant differences of injury depth for the cells cryopreserved with PEO-1500 in comparison with the control group. Injury degree for equine, bovine, canine erythrocytes makes 32-36% and rises during