

ОПТИМИЗАЦИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ МЫШИ

Л. В. Горбунов¹

А. С. Салина²

Н. Ф. Клещев¹

¹Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», Харьков

²Институт животноводства УААН, Харьков

E-mail: Lab_cryo@ukr.net

С целью выявления закономерностей взаимодействия оптимизируемых параметров криоконсервирования эмбрионов мыши проведено многофакторное исследование. Оптимальные значения параметров составили: концентрация глицерола 10%; скорость охлаждения $0,3 \div 0,6$ °С/мин; конечная температура охлаждения $-30 \div -35$ °С; время выдержки перед погружением в жидкий азот $0 \div 5$ мин. При помощи дисперсионного анализа определена сила влияния исследуемых параметров на сохранность деконсервированного объекта: 0,18; 0,71; 0,45; 0,40, соответственно. Для описания взаимосвязи параметров построены поверхности отклика с использованием векторного метода и определены коэффициенты регрессии: 26; 63; 10; 45 у.е., соответственно. На основании проведенных исследований предложен способ замораживания эмбрионов. Многофакторная оптимизация параметров криоконсервирования эмбрионов мыши обеспечила их сохранность на уровне 88% при эффективности реализации процедуры 85%.

Ключевые слова: эмбрионы мыши, режим охлаждения, эффективность криоконсервирования, сила влияния параметров.

Известно, что оптимальная скорость замораживания для эмбрионов мыши и коровы составляет $0,3$ °С/мин. Эта величина обеспечивает необходимую степень обезвоживания клеток и, тем самым, препятствует образованию внутриклеточного льда [1–3]. При этом сами клетки в течение нескольких часов находятся в гипертоническом растворе. Снизить пагубность «эффекта раствора» можно оптимизацией скорости замораживания.

Разработка новых и совершенствование уже существующих технологий низкотемпературного хранения эмбрионов млекопитающих основана на оптимизации множества физико-химических параметров, оказывающих влияние на сохранность деконсервированного объекта. Конечной целью оптимизации технологических параметров криоконсервирования является определение их средних значений и допустимых областей варьирования [1–5].

Для выявления закономерностей взаимодействия исследуемых параметров применяют методы многофакторного анализа [4–6]. Наиболее удобный способ наглядного выражения взаимосвязи параметров — графическое представление поверхности отклика целевой функции (жизнеспособности декон-

сервированного объекта или эффективности его криоконсервирования) [4, 5]. Для оценивания пагубности воздействия исследуемых параметров на жизнеспособность деконсервированного объекта вычисляют показатели силы их влияния или коэффициенты уравнения регрессии [4–6].

Цель работы — выявить закономерности взаимодействия оптимизируемых параметров криоконсервирования: концентрации криопротектора, скорости охлаждения, конечной температуры охлаждения, а также времени выдержки эмбрионов мыши перед их погружением в жидкий азот.

Материалы и методы

Объектом исследования были эмбрионы мыши (*Mus musculus*) на стадии развития от поздней морулы до ранней бластоцисты. Эмбрионы получали от самок лабораторной мыши возрастом 6–8 нед, СВА и гибридных Fi(СВАхС57Bl), которых содержали в стандартных условиях вивария. Все манипуляции с биообъектами — поиск, вымывание и подготовка к экспериментам — проводили по общепринятым методикам [7]. В экспериментах использовали эмбрионы отличного,

хорошего и удовлетворительного качества. Качество эмбрионов оценивали морфологически и по результатам их развития в культуре *in vitro* [7, 8].



Применяемые для проведения криоконсервирования среды были приготовлены на основе фосфатно-солевого буфера Дюльбекко (Sigma) с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma). В качестве криопротектора применяли 5-; 7,5-; 10-; 12,5-; 15-й% раствор глицерола (Fisher Scientific) с 10-минутной выдержкой в них эмбрионов при температуре 20 ± 2 °С/мин.

Замораживание эмбрионов осуществляли в разработанном нами устройстве, основанном на пассивном охлаждении термоблока в горловине сосуда Дьюара X-34 ($V = 35$ л) [1], а также в замораживателе ЗЭМ4 [9]. Получение различных экспоненциальных режимов охлаждения реализовывали посредством помещения биообъекта в предварительно охлажденный термоблок (рис. 1). Процедура длилась от 0 до 60 мин, что определяло скорость охлаждения контейнера, содержащего биообъект. Для получения различной конечной температуры охлаждения термоблока его располагали на глубине 10÷12 см от верхнего края горловины сосуда Дьюара.

В качестве тестируемых режимов (рис. 1) апробировано несколько вариантов охлаждения эмбрионов мыши: с постоянной скоростью 0,3 °С/мин, полученной при помощи программного замораживателя ЗЭМ-4 [9]; переменной, основанной на пассивном охлаждении термоблока [1] в горловине сосуда Дьюара; замораживание эмбрионов в термоблоке, предварительно охлажденном в горловине сосуда в течение 20 мин, 60 мин и без предварительного охлаждения.

В качестве контейнера для замораживания биоматериала использовали пробирки Уленгута ($V \approx 0,75$ мл). Оттаивание контейнеров, содержащих эмбрионы, проводили в водяной бане при 40 °С. Температуру образца измеряли хромель-копелевой термопарой с диаметром спая 0,3 мм.

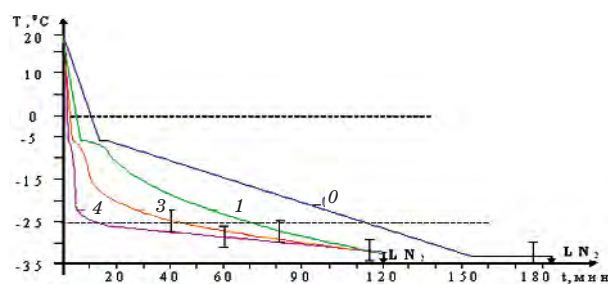


Рис. 1. Режимы охлаждения эмбрионов млекопитающих в горловине сосуда Дьюара: 0 — контролируемое программное замораживание с постоянной скоростью 0,3 °С/мин; 1 — режим замораживания без предварительного охлаждения термоблока; 3 — в предварительно охлажденном термоблоке в течение 20 мин; 4 — в предварительно охлажденном термоблоке в течение 60 мин

Для повышения сохранности деконсервированных эмбрионов мыши исследовали совместное действие изменения концентрации криопротектора и режима замораживания. Концентрацию глицерола изменяли от 5 до 15%.

Сохранность S , жизнеспособность V деконсервированного объекта и эффективность его криоконсервирования W_{dk} определяли по формулам:

$$S = \frac{n}{n_0} \cdot 100\%,$$

$$V = \frac{1}{n_c} \left(\sum_{i=2}^k S_i n_i \right) 100\%,$$

$$W_{dk} = \frac{V_{dk}}{V_c} \cdot 100\%,$$

где n_0 — общее количество эмбрионов;

n — количество эмбрионов, пригодных к дальнейшему использованию;

n_i — количество эмбрионов i -го качества;

S_i — вероятность развития эмбрионов i -го качества в культуре *in vitro*, $S_i \{0,95; 0,85; 0,70; 0,30\}$ [8];

$i \{5, 4, 3, 2\}$ — номер группы эмбрионов с заданным качеством — отличным, хорошим, удовлетворительным и неудовлетворительным, соответственно;

k — количество групп эмбрионов различного качества;

V_{dk} — жизнеспособность эмбрионов в культуре после криоконсервирования;

V_c — жизнеспособность эмбрионов до замораживания.

Многофакторный анализ осуществляли с применением метода дисперсионного анализа [6]. Многофакторную оптимизацию параметров выполняли векторным способом [5].

Координаты последующего измерения исследуемых параметров определяли, применяя обобщенную векторную величину \bar{h}_i :

$$\bar{h}_i = \frac{1}{K_{\max}} \times \sum_{j=1}^n K_{i-j} \cdot \bar{h}_{i-j},$$

$$K_i = \frac{W_i - W_{i-1}}{\sqrt{\sum_{j=1}^k (a_{ji} - a_{ji-1})^2}},$$

$$a_{ij} = \frac{x_{ij} - x_{\min j}}{x_{\max j} - x_{\min j}},$$

где: \bar{h}_i — вектор, определяющий координаты i -го измерения;

k — общее количество исследуемых параметров;

j — текущий параметр;

K_i — коэффициент регрессии «крутизны» подъема i -го измерения;

K_{\max} — максимальное значение K_i коэффициентов;

W_i и W_{i-1} — показатели эффективности криоконсервирования в выполняемом i -м и в предшествующем $i-1$ опытах;

a_{ji} — исследуемый параметр, представленный в относительной форме;

$x_{\max j}$ — максимальное значение исследуемого j -го параметра, выраженного в абсолютных единицах;

x_{ij} — текущее значение исследуемого параметра;

x_{\min} — минимальное значение исследуемого параметра.

Контуры относительной жизнеспособности строили при помощи способов, предложенных П. Берчем и В. Клейманом [4]. Статистический анализ полученных результатов осуществляли по общепринятым формулам качественного и количественного анализа [6] на основе применения стандартных и разработанных нами программ для работы на ЭВМ.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования определяли степень влияния режима замораживания и концентрации криопротектора на жизнеспособность деконсервированных эмбрионов. Для определения силы влияния варьируемых параметров использовали двухфакторный дисперсионный анализ с двумя уровнями градации (опыты 1–4, табл. 1). По показателю сохранности выявлено существенное влияние режима замораживания эмбрионов ($\eta_A^2 = 0,67$) и незначительное — по концентрации криопротектора ($\eta_B^2 = 0,09$). Совместное действие режима замораживания и концентрации криопротектора составило силу влияния $\eta_x^2 = 0,76$, а их взаимосвязь $\eta_{AB}^2 = 0,01$.

Показатели жизнеспособности и эффективности оказывают влияние на режим замораживания $\eta_A^2 = 0,77$ и $\eta_A^2 = 0,71$, соответственно. Сила влияния фактора, отвечающего за концентрацию криопротектора, составила $\eta_B^2 = 0,09$ и $\eta_B^2 = 0,18$. Совместное влияние режима замораживания и концентрации криопротектора составило $\eta_x^2 = 0,86$ и $\eta_x^2 = 0,89$, соответственно. Уровень надежности полученных результатов $P \geq 0,95$.

Таблица 1. Выбор режима замораживания и концентрации криопротектора по показателям состояния деконсервированного биообъекта: сохранности S_{dk} , жизнеспособности V_{dk} , эффективности криоконсервирования W_{dk}

Номер опыта	Концентрация криопротектора, %	N — номер режима охлаждения	Количество биообъекта, n_1/n	Вероятность развития в культуре $M \pm m$, %		
				S_{dk}	V_{dk}	W_{dk}
1	10	2	13/15	87,5±6,2 ^a	72,2±4,3 ^a	84,9±4,6 ^a
2	10	4	8/14	57,3±3,3 ^b	49,7±1,6 ^b	60,1±1,2 ^b
3	15	2	12/16	75,0±7,3 ^a	64,4±3,8 ^a	72,4±3,0 ^b
4	15	4	7/14	50,0±5,8 ^b	42,8±2,9 ^b	50,5±3,2 ^b
5	5	1	10/14	71,4±10,0 ^a	64,6±5,1 ^a	76,5±4,4 ^a
6	10	1	14/16	87,5±6,2 ^a	77,2±3,4 ^a	88,3±4,5 ^a
7	10	0	14/16	87,5±6,2 ^a	73,1±3,2 ^a	83,3±4,1 ^a
8	12,5	3	12/16	74,4±7,3 ^a	66,2±3,2 ^a	73,2±2,6 ^b
9	7,5	3	10/16	62,2±2,2 ^b	60,9±2,2 ^b	74,9±3,9 ^a

Примечание. Здесь и в табл. 2: ^{a, b} — верхними индексами обозначены величины, различающиеся с вероятностью не менее 0,95; n — общее количество эмбрионов мыши (отличного, хорошего и удовлетворительного качества); n_1 — количество пригодных эмбрионов после криоконсервирования. Сохранность нативных эмбрионов в культуре — $S_k = 86,7 \pm 8,8$ %; конечная температура охлаждения биообъекта с экспоненциальным режимом $T_k = -32$ °C, время выдержки $t_k = 0$.

Таким образом, анализ исследуемых параметров показал многократное преобладание (в 4–7 раз) влияния режима замораживания на состояние деконсервированного эмбриона по сравнению с изменением концентрации криопротектора.

Поиск оптимальных значений, определяющих концентрацию криопротектора и режим замораживания, производился на основе применения векторного метода при помощи дополнительно проведенных опытов 5–9 (табл. 1). Совместная оптимизация концентрации криопротектора и режима замораживания показала, что максимальная жизнеспособность эмбрионов после оттаивания получена при использовании 10%-го раствора глицерола для режимов N1 и N2. При использовании скорости охлаждения 0,3–0,6 °С/мин в температурном диапазоне от –5 до –25 °С жизнеспособность (эффективность криоконсервирования) эмбрионов мыши была 72–77% (85–88%). При увеличении скорости от 0,8 до 2,0 °С/мин показатель жизнеспособности (эффективность криоконсервирования) снизился от 66 (73%) до 43% (50%) (рис. 2).

Для поиска конечной температуры охлаждения и времени выдержки эмбрионов мыши перед погружением биообъекта в жидкий азот проведены следующие опыты. При определении силы влияния варьируемых параметров исследуемыми факторами являлись: конечная температура (T_k), до которой производится охлаждение биообъекта, и время выдержки эмбрионов мыши при данной температуре с последующим погружением биообъекта в жидкий азот. Уровни градации температурной выдержки эмбрионов составляли –25 и –35 °С; время экспозиции — 0 и 30 мин (табл. 2).

По показателю сохранности выявлено достоверное влияние времени выдержки эмбрионов ($\eta_A^2 = 0,40$) перед их погружением в жидкий азот и конечной температуры ($\eta_B^2 = 0,21$). Совместное влияние времени выдержки и конечной температуры составило $\eta_x^2 = 0,62$, а их взаимосвязи — $\eta_{AB}^2 = 0,01$. Показатель жизнеспособности и эффективности имеет такую же силу влияния времени выдержки ($\eta_A^2 = 0,40$) и в два раза больше — температуры ($\eta_B^2 = 0,45$). Совместное влияние времени выдержки и конечной температуры охлаждения на жизнеспособность деконсервированных эмбрионов составило $\eta_x^2 = 0,86$. Уровень надежности полученных результатов $P \geq 0,95$.

Таким образом, различные критерии оценки целевой функции, определяющие состояние биообъекта (сохранность, жизнеспособность) или технологию (эффективность), дают разные значения величины силы влияния варьируемых параметров. Сила влияния исследуемого параметра также зависит от выбранной области факторного пространства. Поэтому сравнение полученных показателей производилось в области оптимума с применением векторного способа.

Для описания контуров эффективности криоконсервирования деконсервированных эмбрионов, зависящих от конечной температуры охлаждения и времени выдержки биообъекта, проведены еще четыре дополнительных опыта: 5–8 (табл. 2). С целью нахождения градиента роста эффективности криоконсервирования эмбрионов после их оттаивания проведены три опыта. В четвертом опыте найдена максимальная величина жизнеспособности деконсервированных эмбрионов. Двухфакторная оптимизация при помощи векторного метода дала возможность установить максимальную эффективность криоконсервирования эмбрионов $W_{dk} = 87\%$ (рис. 3)

Таблица 2. Определение конечной температуры охлаждения и времени выдержки эмбрионов мыши перед погружением их в жидкий азот по показателям состояния деконсервированного биообъекта: сохранности, жизнеспособности и эффективности криоконсервирования

Номер опыта	Время выдержки t_k , мин	Конечная температура охлаждения T_k , °С	Количество биообъекта, n_1/n	Вероятность развития в культуре $M \pm m$, %		
				сохранность, S_{dk}	жизнеспособность, V_{dk}	эффективность криоконсервирования, W_{dk}
1	0	–30	14/16	87,5±6,2 ^a	71,9±0,9 ^a	86,2±0,6 ^a
2	15	–30	11/16	68,8±5,9 ^b	65,0±3,2 ^b	82,0±4,9 ^a
3	0	–35	11/14	78,6±1,7 ^a	73,2±0,3 ^a	85,8±1,1 ^a
4	15	–35	12/16	75,0±4,4 ^b	65,6±2,1 ^b	75,3±2,6 ^b
5	30	–35	10/16	80,7±7,6 ^a	60,1±3,3 ^b	72,6±3,7 ^b
6	0	–32	12/14	72,2±5,6 ^a	73,9±3,7 ^a	86,7±4,7 ^a
7	0	–25	13/18	63,6±8,8 ^b	55,8±6,3 ^b	65,2±7,5 ^b
8	7,5	–30	12/16	75,0±7,3 ^a	68,8±4,3 ^a	80,0±5,0 ^a

при конечной температуре охлаждения $T_k = -32\text{ }^\circ\text{C}$ и времени выдержки $t_k = 0$.

Анализ контуров эффективности криоконсервирования деконсервированных эмбрионов мыши показывает, что совместное изменение концентрации криопротектора и режима охлаждения оказывает существенное влияние на сохранность биообъекта. Влияние режима охлаждения описывается через коэффициент «крутизны», равный 63 у. е., а изменение концентрации глицерола составляет 26 у. е., что в два раза ниже. Приблизительно такие же величины получены для показателей силы влияния данных факторов на эффективность выбранного способа криоконсервирования — 71 и 18%, соответственно.

Сохранность деконсервированных эмбрионов мыши ($87,5 \pm 6,2\%$) при замораживании с постоянной скоростью $N = 0$ и экспоненциальной $N = 1, N = 2$ (табл. 1), согласуется с результатами, представленными в литературе [1–3], в которых она составляет 80–90%. Вместе с тем, применение методов многофакторного исследования дает возможность определить силу влияния варьируемых параметров и области их допустимых значений. Применение векторного метода позволяет графически представить полученные закономерности взаимодействия оптимизируемых параметров (рис. 2 и 3).

Оптимизируемые параметры (время выдержки и конечная температура) оказывают достоверное влияние на сохранность биообъекта. Коэффициент «крутизны», отражающий изменение эффективности криоконсервирования биообъекта, рассчитанный для конечной температуры охлаждения, из-

меняется от 10 до 53 у. е., а для времени выдержки перед его погружением в жидкий азот — 22–46 у.е. в зависимости от области факторного пространства, для которого он был рассчитан. Полученные показатели силы влияния, выраженные в процентах, дают сопоставимые величины 40 и 45%. Вместе с тем в области оптимума вариация времени выдержки эмбрионов оказывает более существенное влияние, чем температура, при этом коэффициент «крутизны» составляет 45 и 10 у. е., соответственно.

Применение векторного способа оптимизации конечной температуры охлаждения и времени выдержки эмбрионов мыши перед их погружением в жидкий азот по пяти уровням градации дало возможность описать зависимость изменения сохранности биообъектов и эффективности их криоконсервирования при 8 проведенных опытах в сравнении с 25 опытами, необходимыми для традиционно используемого способа латинского квадрата.

Проведенное многофакторное исследование дало возможность графически описать закономерности взаимодействия оптимизируемых параметров криоконсервирования эмбрионов мыши. Определены области допустимых значений, обеспечивающие максимальную эффективность криоконсервирования эмбрионов мыши. Установлена сила влияния варьируемых параметров на жизнеспособность деконсервированных эмбрионов. На основе проведенных исследований разрабатывается способ замораживания эмбрионов млекопитающих.

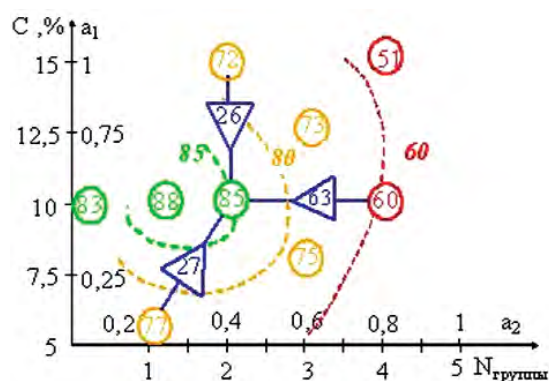


Рис. 2. Оптимизация выбора концентрации глицерола (C) и режима замораживания эмбрионов мыши (N).

Конечная температура охлаждения биообъекта $T_k = -32\text{ }^\circ\text{C}$, время выдержки $t_k = 0$. Параметры a_1 и a_2 — исследуемые параметры (C и N), представленные в относительной форме (6)

O — эффективность криоконсервирования; Δ — коэффициент «крутизны»

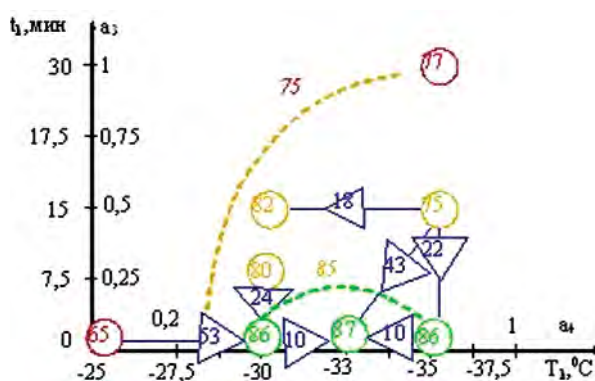


Рис. 3. Оптимизация выбора конечной температуры охлаждения (T_k) и времени выдержки эмбрионов мыши (t_k) перед погружением биообъекта в жидкий азот. Параметры a_3 и a_4 — исследуемые параметры (T_k и t_k), представленные в относительной форме (6)

Определены параметры, обеспечивающие 88% сохранности деконсервированных эмбрионов мыши: концентрация глицерола 10%; скорость охлаждения 0,3–0,6 °C/мин; конечная температура охлаждения –30÷35 °C; время выдержки перед погружением в жидкий азот 0–5 мин. Эффективность криоконсервирования эмбрионов мыши составила 85%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горбунов Л. В., Бучацкий Л. П. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов — К.: Издательско-полиграфический центр «Киевский университет», 2005. — 325 с.
2. Петрушко М. П. Вплив факторів криоконсервування на генетичний апарат ембріонів миші: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — 1994. — 14 с.
3. Хроменкова О. Б. Цитогенетичний аналіз ембріонів свавців при дії різних факторів криоконсервування: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — 2004. — 20 с.
4. Методы исследований и организация экспериментов / Под ред. проф. К. П. Власова. — Х.: Изд-во «Гуманитарный центр», 2002. — 256 с.

Степень влияния оптимизируемых параметров на жизнеспособность деконсервированных эмбрионов мыши в области оптимума, оцененная при помощи коэффициентов регрессии, составила для: режима замораживания — 63 у.е.; концентрации криопротектора — 26 у.е.; времени выдержки биообъекта перед погружением в жидкий азот — 24 у.е.; конечной температуры охлаждения — 10 у.е.

5. Горбунов Л. В., Саминина М. Г. Оптимизация проведения биологического эксперимента векторным методом. — Х.: Наук.-тех. бюл. IT УААН. — 2006. — № 94. — С. 108–113.
6. Лакин Б. Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 254 с.
7. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы. — М.: Мир, 1990. — 406 с.
8. Кауффельд П., Тамм И., Шихов И. Я. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота: Руководство для работы по пересадке эмбрионов. — М.: Агропромиздат, 1990. — 56 с.
9. Замораживатель программный эмбрионов мобильный // Руководство по эксплуатации ЗЭМ4.00.00.00.РЭ. — 1989.

ОПТИМІЗАЦІЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕМБРІОНІВ МИШИ

Л. В. Горбунов¹, А. С. Саліна², Н. Ф. Клещев¹

¹Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Харків
²Інститут тваринництва УААН, Харків

E-mail: Lab_cryo@ukr.net

З метою виявлення взаємодії оптимізованих параметрів криоконсервування ембріонів миші проведено багатofакторне дослідження. Оптимальні значення параметрів становили: концентрація гліцеролу 10%; швидкість охолодження 0,3–0,6 °C/хв; кінцева температура охолодження –30÷35 °C; час витримки перед зануренням у рідкий азот 0–5 хв. За допомогою дисперсійного аналізу визначено силу впливу досліджуваних параметрів на збереженість деконсервованого об'єкта: 0,18; 0,71; 0,45; 0,40, відповідно. Для опису взаємозв'язку параметрів на основі використання векторного методу побудовано поверхні відгуку й визначено коефіцієнти регресії: 26; 63; 10; 45 у.о., відповідно. На основі проведених досліджень запропоновано спосіб заморожування ембріонів. Багатofакторна оптимізація параметрів криоконсервування ембріонів миші забезпечила їх збереженість на рівні 88% за ефективності реалізації процедури 85%.

Ключові слова: ембріони миші, режим охолодження, ефективність криоконсервування, сила впливу параметрів.

OPTIMIZATION OF CRYOPRESERVATION OF MOUSE EMBRYOS

L. V. Gorbunov¹, A. S. Salina², N. F. Kleshchev¹

¹National technical university «Kharkov Polytechnic Institute», Kharkiv
²Institute of Animal Science UAAS, Kharkiv

E-mail: Lab_cryo@ukr.net

Determination of cooperation of the optimized parameters of cryopreservation of embryos of mouse during multifactor research is conducted. Optimum values of parameters have made: concentration of glycerin 10%; speed of cooling 0.3–0.6 °C/min; final temperature of cooling –30÷35 °C; time of endurance before immersing in liquid nitrogen 0–5 minutes. By means of the dispersive analysis, influence force of researched parameters on safety depreservation object is determined: 0,18; 0,71; 0,45; 0,40, accordingly. For description of interrelation of researched parameters, on the basis of use of a vector method, surfaces of the response are constructed and factors of regress are determined: 26; 63; 10; 45 c.u., accordingly. On the basis of the researches the way of freezing of embryos is offered. Multifactorial optimization of parameters cryopreservation of mouse embryos has provided their safety at a level 88% at efficiency of realization of the given procedure 85%.

Key words: mouse embryos, cooling procedure, cryopreservation efficiency, influence force of parameters.