

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к консервированию суспензий живых клеток и зародышей путем замораживания.

Известен способ консервирования спермы включающий разбавление спермы средой, содержащей в качестве криопротектора глицерин с температурой кристаллизации + 18,9°C, который проникает в протоплазматическую клетку [Polge, C. Nature (London), 1951, 167, 949-950].

Недостатком известного способа является гибель в процессе замораживания 40-60% биологических клеток.

Известен способ консервирования, при котором вместо глицерина в качестве проникающего криопротектора используют диметилсульфоксид с точкой замерзания 18,55°C [Lonebeck I. E. Bishog D, W. Nature (London), 1959, 183, 1394-1395]. Недостатком этого способа является токсичность диметилсульфоксидов и низкий выход жизнеспособных клеток.

Известен также способ замораживания спермы производителей, по которому после получения, сперму обрабатывают желточно-цитратно-лактозной средой с глицерином, а перед замораживанием ее дополнительно разбавляют лактозо-цитратной средой с глицерином [Авт. св. СССР № 523693, кл. А 61 D 7/02, 1976]. При этом способе выход жизнеспособных клеток не увеличивается.

Кроме того, недостатком всех известных способов криоконсервации биологических объектов является то, что использование в качестве криопротектора глицерина, диметилсульфоксида, этиленгликолей, полиэтиленоксидов и др. не позволяет в дальнейшем применять лиофильное высушивание законсервированного материала, т. к. перечисленные соединения в водных растворах практически не рубимируются и уже при минусовых температурах переходят в жидкое состояние, вызывая гибель живых объектов.

Задачей изобретения является повышение уровня сохранения жизнеспособности биологических объектов и обеспечение возможности их лиофильного высушивания без фазового перехода криопротекторной среды, что станет основой для разработки альтернативного способа консервации живых биологических объектов в высушенном состоянии.

Для решения поставленной задачи в известном способе криоконсервации биообъектов, в частности спермы, яйцеклеток и т. д. включающем получение, разбавление, желточно-цитратно-лактозной средой с криопротектором и повторное разбавление лактозо-цитратной средой с криопротектором, эквilibрацию и замораживание согласно изобретению обработку объектов ведут средами с белковым криопротектором, температура кристаллизации которого 1,0-1,5°C, при следующем соотношении ингредиентов:

При первичном разбавлении 11% водный раствор	
лактозы	63,0-64,0 мл
желток	30,0-32,0 мл
Раствор белкового криопротектора	
	3,0-7,2 мл
При вторичном разбавлении на 100 мл воды:	
лактозы	6,0-6,2%
цитрата натрия	1,4-1,43%
Раствор белкового криопротектора	
	3,0-5,3%

При поиске по источникам патентной и научно-технической информации не выявлены способы криоконсервации биообъектов с признаками сходными с отличительными признаками заявленного технического решения, что подтверждает новизну и изобретательский уровень предлагаемого решения. Осуществляется способ следующим образом.

К 63 мл 11 % раствора лактозы добавляют 30 мл желтка и 7 мл, белкового криопротектора, хорошо перемешивают ингредиенты и при температуре +38°C разбавляют 1:1 с эякулятом и выдерживают при комнатной температуре 5-10 минут, после чего проводят повторное разбавление эякулята второй средой.

Для повторного разбавления готовят среду следующим образом: 100 мл дистиллированной воды нагревают до 90°C, добавляют 6,0 г лактозы- перемешивают до полного- растворения. В полученный раствор добавляют 1,4 г цитрата натрия, охлаждают и добавляют 5,0 мл раствора белкового криопротектора (0,25 мг/1 мл). Ингредиенты хорошо перемешивают и разбавляют эякулят повторно второй средой в соотношении 1:10. Окончательно разбавленную сперму расфасовывали, законсервировали.

Результаты исследований приведены на разведенных эякулятах. При статической обработке не получено достоверных отличий ($P > 0,1$), что говорит о том, что предложенный криопротектор обладает сходными криозащитными свойствами с глицерином.

Предложенный криопротектор является веществом природного происхождения и не оказывает токсического воздействия на спермий, как глицерин, (изменения, например, акросомы: разбухание, разрывы, деформации) при совместном культивировании в течение 5 часов. Результаты представлены в табл. 1 и 2, и его механизм криопротекции отличен от такового известных криопротекторов.

Опыт проведен на свежеполученных эякулятах с активностью не ниже 8 баллов.

Из табл. 1 и 2 видно, что белковый криопротектор с течением времени при культивировании не обладает токсичностью ($P > 0,1$), в то время как глицерин обладает выраженной ($P < 0,01$).

Результаты исследований показали, что глицерин может быть заменен нетоксичным, равным по эффективности с глицерином, природным белковым криопротектором. обеспечивающим возможность их лиофилизации. Кроме того, в связи с разной химической природой известных и заявляемого криопротектора они могут быть применены в комбинации для получения симультанного эффекта.

Таблица 1

№№ п/п	Используе- мый криоп- ротектор в разбавите- ле	Кол-во обрабо- танных эякуля- тов	Активность /А/ / балл / М±			Пережи- вае- мость// /час/ М±	Кoeffи- циент выжива- емости /а / усл. ед. М±	Опло- дотво- ряе- мость, % М±	Возмож- ность лиофи- лизации
			до замо- ражива- ния	после оттаива- ния	ч/з 5 ча- сов по- сле оттаива- ния				
1	Глицерин /прототип/	25	8	3,8±0,4	1,5±0,45	7,5±3,5	21,6±0,1	66,1±0,3	Не уда- ется, об- разцы сжижа- ются
2	Белковый криопро- тектор /предло- женный/	25	8	3,85±0,4	1,0±0,5	7,2±2,0	21,3±0,2	65,4±0,7	Удаётся легко, образ- цы су- хие

Таблица 2

№№ п/п	Культивирова- ние в желчно- цитратной среде	Кол-во ис- следован- ных эякулятов	Период культивирования, час				
			1	2	3	4	5
1	Глицерином % неповрежден- ных акросом	25	93,7±0,7	86,1±0,9	79,3±1,4	71,6±1,0	66,8±1,3
2	Белковым криопротекто- ром % непов- режденных акросом	25	95,5±0,8	95,2±0,71	94,8±1,2	94,1±1,0	93,9±1,1