



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 4909

(13) U

(51) 7 A01W02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕМБРІОНІВ ЛЮДИНИ

1

(21) 20040503880

(22) 24.05.2004

(24) 15.02.2005

(46) 15.02.2005, Бюл. №2, 2005р

(72) Грищенко Валентин Іванович, Петрушко Марина Павлівна, Гуріна Тетяна Михайлівна

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб кріоконсервування ембріонів людини, який включає інкубацію в кріоконсервуючому розчині, що містить етиленгліколь і сахарозу, попередню стабілізацію температури камери заморожування, повільне охолодження до температури

2

сидінгу, ручний сидінг, подальше повільне охолодження до  $-30 \div -40^{\circ}\text{C}$  з подальшим зануренням у рідкий азот, підігрів на водяній бані і культивування в фосфатно-буферному середовищі, який відрізняється тим, що інкубацію ембріонів в кріоконсервуючому розчині і попередню стабілізацію температури камери заморожування проводять при  $22^{\circ}\text{C}$ , ручний сидінг здійснюють при температурі кристалізації кріоконсервуючого розчину, а в середовищі культивування додають 20% сироватки кордової крові людини через 24 години після початку культивування

Корисна модель належить до кріобіології і кріомедицини і може бути використана в акушерстві та гінекології

Відомий спосіб кріоконсервування ембріонів людини [1], який включає інкубацію при кімнатній температурі в кріоконсервуючому розчині, що містить 1,5моль/л етиленгліколю, 0,1моль/л сахарози і 20% сироватки кордової крові людини, охолодження від кімнатної температури до  $-7^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю  $2^{\circ}/\text{хв.}$ , ручний сидінг при  $-7^{\circ}\text{C}$ , охолодження зі швидкістю  $0,3^{\circ}/\text{хв.}$  до  $-30^{\circ}\text{C}$  з послідовним зануренням у рідкий азот, відігрів на водяній бані при  $30^{\circ}\text{C}$  і культивування при  $37^{\circ}\text{C}$  у фосфатно-буферному середовищі з 20% сироватки крові людини.

Недоліком способу є низька виживаність ембріонів - 53%

Це пов'язано з тим, що усі маніпуляції перед початком заморожування проводяться при кімнатній температурі, яка може змінюватися в залежності від зовнішньокліматичних умов; сироватка кордової крові людини, яка додається до кріоконсервуючого розчину, блокує ембріогенез на ранніх стадіях розвитку ембріона; ручний сидінг проводиться при температурі, нижче температури кристалізації кріоконсервуючого розчину, що може привести до передчасного кристалоутворення.

Відомий спосіб кріоконсервування ембріонів людини [2], згідно з яким ембріони інкубують при кімнатній температурі в кріоконсервуючому розчині, що містить етиленгліколь (1,5моль/л) та сахарозу (0,2моль/л), і охолоджують за такою програмою: до  $-7^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю  $2^{\circ}/\text{хв.}$ , ручний сидінг при  $-7^{\circ}\text{C}$ , охолодження зі швидкістю  $0,3^{\circ}/\text{хв.}$  до  $-30^{\circ}\text{C}$ , від  $-30^{\circ}\text{C}$  до  $-150^{\circ}\text{C}$  - зі швидкістю  $50^{\circ}/\text{хв.}$ , після чого занурюють у рідкий азот. Відігривають на водяній бані при  $30^{\circ}\text{C}$ , після чого культивують при  $37^{\circ}\text{C}$  у фосфатно-буферному середовищі.

Недоліком способу є низька виживаність ембріонів (75-79%), що обумовлено проведенням ручного сидінгу при температурі, нижче реальної температури кристалізації, і різницею між температурою середовища інкубації і початковою температурою камери заморожування.

Найбільш близьким до заявленого способу за своєю суттю та ефектом, що досягається, є спосіб кріоконсервування ембріонів людини [3], який полягає в наступному: ембріони людини інкубують при кімнатній температурі в кріоконсервуючому розчині, що містить 1,5моль/л етиленгліколю, 0,2моль/л сахарози та 20% фолікулярної рідини людини, і приміщують у камеру заморожування програмного заморожувача. Температуру камери заморожування попередньо стабілізують при  $20^{\circ}\text{C}$  протягом 1хв. Заморожування здійснюють за

(13) U

(11) 4909

(19) UA

такою програмою: охолоджують від 20°C до -7°C зі швидкістю 2°/хв., витримують при цій температурі 5хв і проводять ручний сідінг, далі охолоджують до -39°C зі швидкістю 0,3°/хв. і занурюють у рідкий азот. Відігрівують на водяній бані при 37°C у фосфатно-буферному середовищі, в яке додають 20% фолікулярної рідини людини

Недоліком способу є те, що він не забезпечує високої виживаності ембріонів (80,6%)

Зниження виживаності обумовлено наступним.

- додавання фолікулярної рідини в кріоконсервуючий розчин блокує ембріогенез;

- інкубацію ембріонів в кріоконсервуючому розчині проводять при кімнатній температурі, яка змінюється в залежності від сезонних умов, що приводить до перепаду температур між розчином інкубації і камерою заморожування;

- ручний сідінг проводять при температурі, нижче температури кристалізації кріоконсервуючого розчину, що може привести до передчасного кристалоутворення.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити відомий спосіб кріоконсервування ембріонів людини таким чином, щоб він забезпечив підвищення виживаності ембріонів.

Ця задача вирішується тим, що в способі кріоконсервування ембріонів людини, який включає інкубацію в кріоконсервуючому розчині, що містить етиленгліколь і сахарозу, попередню стабілізацію температури камери заморожування, повільне охолодження до температури сідінга, подальше повільне охолодження до -30÷-40°C з послідовним зануренням у рідкий азот, відігрів на водяній бані і культивування в фосфатно-буферному середовищі, інкубацію ембріонів в кріоконсервуючому розчині і попередню стабілізацію температури камери заморожування проводять при 22°C, ручний сідінг здійснюють при температурі кристалізації кріоконсервуючого розчину, а в середовище культивування додають 20% сироватки кордової крові людини через 24 години після початку культивування.

Інкубація ембріонів в кріоконсервуючому розчині і стабілізація камери заморожування при одній температурі дозволяє уникнути перепаду температур при переносі ембріона з кріоконсервуючого розчину в камеру заморожування

Проведення ручного сідінгу при температурі кристалізації кріоконсервуючого розчину виключає можливість передчасного кристалоутворення.

Додавання в середовище культивування 20% сироватки кордової крові людини через 24 години після початку культивування, тобто після проходження ембріоном стадії дроблення, стимулює розвиток ембріона.

Таким чином заявлений спосіб дозволяє підвищити виживаність ембріонів у порівнянні з прототипом на 17-18%.

Приклад здійснення способу

Для кріоконсервування застосовували ембріони людини, одержані методом екстракорпорального запліднення. Ембріони приміщували в кріоконсервуючий розчин, що містить 1,5моль/л етиленгліколю і 0,2моль/л сахарози у фосфатному буфері та інкубували при 22°C протягом 20хв. Після цього ембріони разом з кріоконсервуючим розчином поміщували в стерильні соломинки і переносили в камеру заморожування, попередньо охолоджену до 22°C і стабілізовану при цій температурі протягом 5хв. Заморожування ембріонів здійснювали за такою програмою. Охолоджували від 22°C до -5°C (температура кристалізації кріоконсервуючого розчину) зі швидкістю 2°/хв., при -5°C витримували протягом 10хв, проводили ручний сідінг, після чого охолоджували до -30°C зі швидкістю 0,1-0,2°/хв і занурювали у рідкий азот. Відігрівали на водяній бані при 37°C і переносили в фосфатно-буферне середовище для культивування. Після проходження ембріонами стадії дроблення в середовище культивування додавали 20% сироватки кордової крові людини. Виживаність ембріонів визначали шляхом оцінки морфологічних показників і частоти дроблення *in vitro*. Вона становила 97±2%(n=10).

Джерела інформації:

1. Lassalle B., Testart G., Renard G. – P. Human embryos features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. – *Fertility and Sterility*. – 1985. Vol.44, №5 – P 645-651.

2. Helena Jericho, et al. A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos – *Human Reproduction* – 2003. – V.18, №3 – P 568-571.

3. Hee-Jun Chi, et al. Cryopreservation of human Reproduction. – 2002. – V.17, №8. P.2146-2151.