

Винахід відноситься до біотехнології у тваринництві, а саме до розробки методів кріоконсервації ооцитів і ембріонів ссавців за допомогою вітрифікації.

Відомий спосіб вітрифікації ооцитів і ембріонів ссавців, який засновано на використанні високих швидкостей теплообміну ( $B \approx 30^\circ\text{C}/\text{c}$ ) і високих концентрацій кріопротектору ( $C=50\%$  та вище) (Isachenko V.V., Isachenko E.F., Ostashko F.I., Gnshchenko V.I. Ultra-rapid freezing of rat embryos with rapid dilution of permeable cryoprotectants // Cryobiology.-1997.-V. 34.-P.157-164). Як контейнери застосовуються соломини діаметром 2 мм, які заповнюються кріозахисним середовищем, що утримує біооб'єкт, традиційним способом (на 95% від свого загального об'єму) і закриваються з одного боку пластиковою пробкою, а з іншого - змоченим сухим спиртом.

Проте, використання даного способу не дозволяє отримати високий рівень збереженості девітрифікованих ембріонів (8=60%). Зниження збереженості ооцитів та ембріонів ссавців під час кріоконсервації при високих швидкостях теплообміну обумовлено токсичним впливом на біооб'єкт висококонцентрованих розчинів кріопротекторів та різким розширенням середовища. У деяких випадках, збільшення об'єму середовища при заморожуванні та кипінні рідкого азоту при відтаванні, який проникає у контейнер крізь пробку під час зберігання, приводять до механічного руйнування контейнерів, і, як наслідок, до втрати біооб'єкту.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб вітрифікації ооцитів і ембріонів ссавців при надвисоких швидкостях теплообміну у відкритих витягнутих соломин діаметром 0,8 мм, які заморожують зі швидкістю  $B_3 \approx 100^\circ\text{C}/\text{c}$  прямим зануренням у рідкий азот (Vajta P. Holm and H. Callesen. Open Pulled Straw [OPS] Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos // Molecular reproduction and development.-1998.-V.51.-P.53-58).

Однак, цей спосіб має недоліки, якими є: використання низької швидкості відтавання відносно швидкості заморожування, що призводить до часткової рекристалізації при відтаванні, і відносно високих концентрацій як вітрифікуючого, так і еквіліруючого розчинів кріопротектора, що виявляють токсичний та осмотичний вплив на біооб'єкт; застосування відкритих контейнерів для середовища, яке утримує біооб'єкт, сприяє порушенню умов стерильності. Ці недоліки роблять процес кріоконсервації низькотехнологічним, а також не дозволяють одержати високий рівень збереженості деконсервованих біооб'єктів.

Завданням винаходу є створення нового способу вітрифікації ооцитів і ембріонів ссавців при надвисоких швидкостях теплообміну, який шляхом використання закритих витягнутих соломин для біооб'єкту, оптимального співвідношення величини швидкості відтавання до заморожування, оптимального заповнення соломин вітрифікуючим розчином, низьких концентрацій кріопротекторів дозволяє суттєво збільшити рівень збереженості біооб'єктів.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі вітрифікації ооцитів і ембріонів ссавців при надвисоких швидкостях теплообміну, що включає насичення біооб'єкту в еквіліруючому розчині, кріоконсервування вітрифікуючого розчину, який утримує біооб'єкт у витягнутій соломині шляхом її прямого занурення у рідкий азот з наступним відтаванням у водяній бані, додатково передбачено, що використовують герметично закрити соломину, яка утримує вітрифікуючий розчин з біооб'єктом, швидкість відтавання перевищує швидкість заморожування принаймні у 1,5 рази, соломину заповнюють вітрифікуючим розчином з біооб'єктом на 10% від її загального об'єму, відтавання здійснюють на водяній бані при температурі  $40^\circ\text{C}$  при перемішуванні, а концентрацію вітрифікуючого та еквіліруючого розчину кріопротектору визначають за формулами 1 і 2, відповідно:

$$C_{\min}^e(B) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n C_i(B), \quad (1)$$

де  $C_{\min}^e$  - мінімальна концентрація вітрифікуючого розчину кріопротекторів (% , [v/v]); n - кількість видів кріопротекторів, які входять до складу вітрифікуючого розчину; B - швидкість відтавання ( $^\circ\text{C}/\text{c}$ );  $C_i(B)$  - мінімальна концентрація кожного з видів кріопротекторів, визначена при заданій швидкості відтавання (% , [v/v]),

$$C_{\min}^i(B) = C_{\min}^e(B) - 40, \quad (2)$$

де  $C_{\min}^i$  - мінімальна концентрація еквіліруючого розчину кріопротектору (% , [v/v]);

У випадку, коли вітрифікуючий розчин складається з гліцерину та сахарози його мінімальна концентрація визначається за формулою

$$C_{\min}^e(B) = \frac{1}{2}(C_1(B) + C_2(B)),$$

$$C_1(B) = 57,63 - 1,15 \cdot B^{0,3026} \quad (R=0,998),$$

$$C_2(B) = 7,433 \cdot 10^{-5} B^2 - 7,613 \cdot 10^{-2} B + 63,16 \quad (R=0,999),$$

де  $C_1, C_2$  - мінімальна концентрація гліцерину та сахарози відповідно.

Використання у заявленому способі герметично закритих витягнутих соломин дозволяє виключити прямий контакт між холодоагентом та вітрифікуючим розчином, який утримує біооб'єкт, що забезпечує умови стерильності. Традиційним способом рішення цієї проблеми є додавання антибіотиків у вітрифікуючий розчин або використання рідкого азоту, попередньо очищеного від бактерій та грибів за допомогою спеціальних фільтрів з порами розміром  $0,2 \mu\text{m}$ . Але, використання антибіотиків негативно впливає на рівень збереженості деконсервованих біооб'єктів, а процес очищення холодоагенту робить метод кріоконсервації низькотехнологічним, що підвищує собівартість одного деконсервованого ембріона. Запропонований спосіб є більш простим в реалізації, та не потребує дорогих препаратів та обладнання в порівнянні з традиційними способами (Vajta P. Holm and H. Callesen. Open Pulled Straw [OPS] Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos // Molecular reproduction and development.-1998.-V.51.-P. 53-58).

Експериментальним шляхом встановлено, що оптимальним є заповнення витягнутих соломин вітрифікуючим розчином з біооб'єктом на 10% від його загального об'єму. У цьому разі зменшується вплив об'ємного розширення середовища в процесі вітрифікації на рівень збереженості ооцитів і ембріонів ссавців в порівнянні з традиційними способами, в яких соломини заповнюються вітрифікуючим розчином з біооб'єктом на 95% від свого загального об'єму (Морозова И.А., Горбунова Н.И., Горбунов Л.В. Влияние объемного расширения среды, содержащей биобъект, на сохранность деконсервированных половых клеток и эмбрионов животных при

сверхвысоких скоростях замораживания// Рибне господарство: Міжвід. темат. наук. зб. - К.: Аграрна наука.-2002. - вип. 61.- С. 37-41).

При перевищенні швидкості відтавання відносно швидкості заморожування принаймні у 1,5 рази зменшується можливість виникнення рекристалізаційних процесів при відтавання. Це також дозволяє зменшити концентрацію як еквілібруючого, так і вітрифікуючого розчинів кріопротекторів на 5% (Горбунов Л.В., Безуглий М.Д., Морозова І.А. Визначення критичної зони кристалоутворення в циклі заморожування-відтавання біооб'єкту // Науково-технічний бюлетень №75 ИЖ УААН.-1998.-Харків, С. 92-98).

Заявлене перевищування швидкості відтавання по відношенню до швидкості заморожування досягається шляхом проведення відтавання біооб'єкту, що міститься у соломині, на водяній бані при 40°C за умов перемішування.

Шляхом експериментальних досліджень з використанням методу регресійного аналізу було визначено мінімальні концентрації гліцерину та сахарози від швидкості відтавання.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. Вітрифікуючий та еквілібруючий розчини готують на основі розчину Дюльбекко (ФСБ) з додаванням 10% телячої фетальної сироватки. Насичення біооб'єкту проводять в еквілібруючому розчині кріопротектора при температурі 20±2 С протягом 10 хвилин. Час експозиції насиченого біооб'єкту у вітрифікуючому розчині складає 1-1,5 хвилини при тій самій температурі. Одразу після витримки в вітрифікуючому розчині біооб'єкт заморожують в закритій витягнутій соломині прямим зануренням у рідкий азот. Відтавання соломин проводять у водяній бані при температурі 40°C з використанням магнітної мішалки. Після відтавання виводять кріопротектор з біооб'єкту. Рівень життєздатності біооб'єктів до заморожування та збереженості після відтавання визначають за морфологічними показниками одразу після виведення кріопротектору та після культивування. Отримані результати статистичне обробляють відповідно до загальновідомих методів.

Винахід ілюструється прикладом.

Приклад 1

Здійснення запропонованого способу проведено на модельному біооб'єкті - ембріонах миші (таблиця 1).

Таблиця 1

Вплив концентрації еквілібруючого та вітрифікуючого розчинів кріопротекторів на збереженість ембріонів миші, кріоконсервованих при високих та надвисоких швидкостях заморожування-відтавання

Діаметр соломи ni d, mm	Швидкість заморожува ння (відтавання) В, °C/с	Концентрація кріопротектора С% [v/v] (М)			Збереженість S (±m), %		n
		еквілібр. (гліцерин)	Вітр.-чий		Після виведення кріопротектора	після короткострокового куль-гивування in vitro	
			Гліцерин	сахароза			
1,8	28 (25)	20	35	(0,75)	65,5±5,2 <sup>a</sup>	58,015,1 <sup>a</sup>	55
1,8	28 (42)	15	30	(0,73)	73,3±5,5 <sup>a</sup>	71,0±5,6 <sup>a</sup>	67
1,0	104(126)	10	30	(0,58)	77,1±6,1 <sup>a,b</sup>	74±6,4 <sup>a,b</sup>	52

Примітка: різні суперскрипти визначають значення, які є достовірно різними між собою з вірогідністю не менш чим 0,95.

Як контроль використовували традиційний спосіб вітрифікації. Дослідження проводили на ембріонах доброї та відмінної якості, які одержували на стадії пізньої морули або ранньої бластоцисти від тварин попередньо оброблених на супероуляцію за загальновідомою методикою. В основному експерименті та в контролі заморозили по 60±8 ембріонів.

В основному досліді еквілібруючий розчин утримує 10% гліцерину, а вітрифікуючий - 30% гліцерину і 0,58 М сахарози. Оброблені в еквілібруючому та вітрифікуючому розчинах біооб'єкти заморозили в закритих пластикових соломиних з діаметром 1 мм та 1,8 мм прямим зануренням у рідкий азот. Для виведення кріопротектору використовували 0,6 М розчин сахарози.

Одержані результати свідчать, що запропонований метод вітрифікації ооцитів і ембріонів ссавців, розроблений на основі використання закритих витягнутих соломин діаметром 1 мм, дозволяє підвищити рівень збереженості деконсервованих біооб'єктів приблизно на 12% в порівнянні з існуючими методами вітрифікації, за умови відносної простоти і надійності його реалізації.

Заявлений спосіб забезпечує збереження біооб'єкту до 78%, що на 12% перевищує загальновідомі результати.