

Изобретение относится к криобиологии и может быть использовано в экспериментальной репродуктологии.

Наиболее близким к заявляемому является способ консервирования эмбрионов млекопитающих, согласно которому эмбрионы экспонируют при 5⁰С в среде Дюльбекко, содержащей эмбриональную сыворотку плодов коров и протектор - моноэтиловый эфир глицерина [1].

Недостатком этого способа является то, что он обеспечивает сохранность эмбрионов только в течение 2-х суток.

В основу изобретения поставлена задача создания такого способа консервирования эмбрионов млекопитающих, в котором использование нового протектора позволило бы повысить способность клеток к восстановлению биосинтеза белка в культуре и таким образом увеличить срок хранения эмбрионов.

Эта задача решается тем, что в способе консервирования эмбрионов млекопитающих, включающем экспозицию их при 5⁰С в среде Дюльбекко, содержащей эмбриональную сыворотку плодов коров и протектор, в качестве протектора используют фракцию эпителия тонкого кишечника зимоспящего суслика молекулярной массы 1-10 кД в концентрации 0,12-0,2 г/л среды.

В связи с тем, что среда не содержит химических агентов, способ позволяет исключить генетическое изменение эмбрионов в процессе их развития.

Это достигается за счет того, что в среде консервирования вместо химического протектора используют биологический - фракцию эпителия тонкого кишечника зимоспящего суслика молекулярной массы 1-10 кД а концентрации 0,12-0,20 г/л среды.

Выделение фракции производили по следующей методике. На первом этапе ацетоновый гомогенат ткани центрифугировали в течение 30 мин при 3000д, осадок лиофилизировали в 1 М уксусной кислоте и центрифугировали 1 ч при 4000д. Полученный центрифугат подвергали последовательно ультрафильтрации через фильтры Халипор-4 (Эстония) и М-2 (Amnicon, USA). Получали фракцию молекулярной массы 1-10 кД. После ультрафильтрации материал лиофилизировали и хранили в герметичных ампулах при - 20⁰С.

Пример 1. Эмбрионы мышей на стадии морулы вымывали при комнатной температуре средой Дюльбекко, содержащей 10% эмбриональную сыворотку коров. На этой же среде готовили фракцию эпителия тонкого кишечника (ФЭ) зимоспящего суслика с добавлением эмбриональной сыворотки.

40 эмбрионов разделили на две группы по 20 эмбрионов в каждой. Эмбрионы каждой группы помещали в стеклянную ампулу, содержащую 0,5 мл среды Дюльбекко и 10% эмбриональной сыворотки. Ампулы с эмбрионами первой опытной группы охлаждали ступенчато от комнатной (+20⁰С) температуры до + 5⁰С, понижая температуру на 5⁰, и выдерживали при данной температуре в течение 5 мин. Аналогично охлаждали 0,5 мл фракции (1-10 к), выделенной из эпителия тонкого кишечника зимоспящего суслика.

pH ФЭ был в пределах pH среды Дюльбекко с добавкой 10%-ной эмбриональной сыворотки. ФЭ капельно добавляли в соотношении 1:1 к охлажденным эмбрионам. Конечная концентрация ФЭ составляла 0,12 г/л. После герметизации ампулы хранили при 5⁰С в течение 24, 48 и 72 ч. К эмбрионам второй, контрольной группы добавляли при комнатной температуре среду Дюльбекко, содержащую 10%-ную эмбриональную сыворотку, ступенчато охлаждали от комнатной температуры до 5⁰С, понижая температуру на 5⁰С и выдерживая при ней в течение 5 мин. После этого охлажденные эмбрионы ступенчато отогревали на водяной бане, повышая температуру на 5⁰ каждые 5 мин. Затем эмбрионы при комнатной температуре переносили в культуральную среду Виттена, где культивировали в течение 24 ч до выхода с бластоцисту. Сохранность эмбрионов контрольной группы составила 97,8%.

Эмбрионы опытной группы после хранения в герметически закрытых ампулах ступенчато отогревали в водяной бане, повышая температуру на 5⁰ и выдерживая при каждой по 5 мин. Ампулы вскрывали стерильно и отмывали от ФЭ трехступенчато, добавляя к одной капле исходного раствора 10 капель среды Дюльбекко с эмбриональной сывороткой через каждые 3 мин. После этого эмбрионы опытной группы выдерживали 10 мин в культуральной среде и проводили культивирование в среде Виттена в атмосфере тройного газа (5% CO₂, 90% N₂ и 5% O₂) при 37⁰С в течение 24 ч до выхода в бластоцисту. Эмбрионы опытной группы развивались подобно контрольной. В табл.1 представлены результаты в сравнении с прототипом.

Из табл. 1 следует, что заявляемый способ позволяет хранить эмбрионы на 1 сутки дольше без снижения их сохранности.

Пример 2. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением того, что среда хранения содержала различные концентрации ФЭ. Во всех случаях сохранность эмбрионов определяли по их развитию в культуре до стадии бластоцисты. Результаты представлены в табл.2.

Из табл. 2 видно, что наилучшие результаты достигаются при использовании ФЭ в концентрации 0,12-0,20 г/л среды.

Пример 3. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением, того, что среда хранения содержала ФЭ с различной молекулярной массой. Результаты представлены в табл. 3.

Из табл. 3 видно, что высокую сохранность эмбрионов обеспечивает ФЭ молекулярной массы 1-10 кД.

Пример 4. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением того, что в среде хранения использовали ФЭ сусликов *Citellus undulatus* не в период спячки, а в период бодрствования. Результаты представлены в табл.4.

Из табл.4 видно, что при использовании в среде ФЭ, полученной у сусликов в период бодрствования, сохранность резко снижается.

Пример 5. Изучали влияние ФЭ молекулярной массы 1-10 кД на угнетение биосинтеза белка при гипотермическом хранении и степень его последующего восстановления.

Первую группу, содержащую 10 эмбрионов, после вымывания помещали в среду Дюльбекко с содержанием 10%-ной эмбриональной сыворотки и производили изотопный анализ. Эта группа была контрольной. Вторая группа, содержащая также 10 эмбрионов в среде Дюльбекко с эмбриональной сывороткой была контрольной по отношению к эмбрионам, хранившимся 24, 48 и 72 ч в среде, содержащей ФЭ.

Стеклянные ампулы заполняли 0,5 мл среды Дюльбекко с 10%-ной эмбриональной сывороткой, после чего вносили эмбрионы.

Ампулы с эмбрионами ступенчато охлаждали от комнатной температуры (+20⁰С) до +5⁰С с выдержкой при данной температуре в течение 5 мин. Охлаждение 0,5 мл ФЭ проводили аналогично. При +5⁰С в ампулу с эмбрионами капельно в соотношении 1:1 добавляли 0.25 мг/л ФЭ. После отогрева на водяной бане и удаления

ФЭ осуществляли изотопный анализ сразу и после дополнительного культивирования в среде Виттена при 37°C в атмосфере тройного газа (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂). Проведение анализа осуществляли следующим образом. Эмбрионы (10 шт) помещали в 0,5 мл среды, содержащей 3H-лейцин (в дозе 10 мкКи, радиоактивность 1 мКи, ЧССР) и инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Затем промывали холодной средой, содержащей лейцин. Разрушали эмбрионы путем 10-кратного их замораживания и оттаивания. Осаждение белков осуществляли при +4°C путем добавления 2 мл холодного ТХУ и последующего помещения на лед на 15 мин. Белки, осажденные на фильтрах, промывали 5 мл холодного 70%-ного спирта. Для окончательного высушивания фильтров их выдерживали 10 мин при 50°C. Активность биосинтеза определяли с помощью счетчика, помещая фильтр в 14 мл жидкого сцинтиллятора. В табл. 5 приведены результаты опытов.

Результаты, приведенные в табл. 5, свидетельствуют о полном восстановлении биосинтеза белка эмбрионов в культуре после гипотермического хранения в течение 24,48 и 72 ч.

Таблица 1

Сохранность эмбрионов после различных сроков хранения
n = 20

Длительность хранения	Сохранность эмбрионов, %	
	заявляемый способ	способ по прототипу
24 часа	97,8±1,2	89,8±1,12
48 часов	96,9±1,0	90,5±3,18
72 часа	94,5±2,5	52,2±1,86

Таблица 2

Влияние концентрации ФЭ на развитие эмбрионов в культуре после различных сроков хранения

Концентрация ФЭ г/л	Сохранность эмбрионов, %		
	24 ч хранения	48 ч хранения	72ч хранения
0,00	42,5±3,4	37,4±2,1	25,7±2,9
0,09	63,7±1,5	57,3±2,4	55,4±1,9
0,12	97,8±1,2	96,9±1,0	94,5±2,5
0,16	85,2±3,2	80,1±1,1	75,1±1,6
0,20	83,1±2,1	75,4±2,0	63,7±0,8
0,25	75,5±0,2	70,7±1,7	60,1±0,9

20

Таблица 3

Сохранность эмбрионов в зависимости от молекулярной массы ФЭ

Молекулярная масса ФЭ, КД ₁	Сохранность эмбрионов, %		
	24 ч хранения	48 ч хранения	72ч хранения
0,5	80,0±0,9	74,3±0,6	70,2±1,1
1-10	97,8±1,2	96,9±1,0	94,5±2,5
15	78,01±1,2	70,7±0,8	67,7±1,5
20	70,0±1,3	67,5±0,7	63,8±0,9

Таблица 4

n = 20

Время хранения	Сохранность эмбрионов, %
24 часов	45,4±2,7
48 часов	40,7±1,4
72 часа	27,5±1,7

Таблица 5

Активность биосинтеза белка в эмбрионах после гипотермического хранения в течение различного времени

n=39

Условия эксперимента	Активность биосинтеза, имп/мин
Нативные эмбрионы	1163±35
Сразу после хранения: 24 часа	нет включения
48 часов	нет включения
72 часа	нет включения
После часового дополнительного культивирования: 24 часа	1150±20
48 часов	1125±38
72 часа	1110±47