

## РОЗРОБКА ЕФЕКТИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СТАТЕВИХ КЛІТИН ТА ЕМБРІОНІВ ССАВЦІВ У ШИРОКОМУ ДІАПАЗОНІ ШВИДКОСТЕЙ ЗАМОРОЖУВАННЯ

---

Усі відомі методи використання яйцеклітин і ембріонів у біотехнології спрямовані на отримання живих нащадків, що потребує запасу пластичного матеріалу на кожному з технологічних етапів. Єдиний надійний шлях до створення таких запасів — це заморожування і зберігання біологічних об'єктів при низьких температурах.

Широко розповсюджені в Україні способи практичної кріоконсервації засновані на повільних режимах заморожування, тоді як за кордоном у передових країнах всебічно розробляються та впроваджуються технології вітрифікації біооб'єктів. Тепер перед нами постає проблема вибору найбільш перспективної, дешевої та доступної технології низькотемпературної консервації. Однак з існуючого різноманіття методів кріоконсервації генетичного матеріалу, заснованих на застосуванні повільних, високих та надвисоких швидкостей заморожування, жоден не дає змоги досягти високого рівня збереження деконсервованого біооб'єкта за умови відносної простоти та надійності його реалізації.

Проблема вибору пріоритету подальшого розвитку перспективних технологій кріоконсервації біологічного матеріалу потребує проведення порівняльного аналізу двох альтернативних методів. Перший з них заснований на застосуванні повільних швидкостей заморожування, а другий — на високих. Позитивними рисами першого методу порівняно з

© Л.В. Горбунов, М.Д. Безуглий, 2001



другим є більш високий рівень збереження ооцитів та ембріонів, а недоліком — його низька технологічність.

Поліпшення технології кріоконсервації, заснованої на застосуванні повільних швидкостей заморожування, можливе за допомогою використання пасивного охолодження термоблока в горловині посудини Дьюара ( $V_3, \text{const}$ ) (М.Д. Безуглий, Л.В. Горбунов, 1998). Запропонований пристрій дає можливість реалізувати різноманітні режими заморожування статевих клітин та ембріонів за допомогою зміни характерного часу охолодження термоблока і занурення його на різні рівні в горловину посудини Дьюара Х34-Б. Успішне використання розробленого заморожувача дало змогу визначити оптимальні параметри його застосування на базі посудини Х-5. Контроль і підтримка температури здійснюються за допомогою позистора СТ-17—380 Ом з точністю до 2 °С.

З метою перевірки працездатності запропонованого пристрою ми заморозили ембріони миші, рівень збереженості яких становив 94% ( $n = 30/32$ ). Високий рівень збереженості заморожено-відталих ембріонів миші свідчить про можливість застосування запропонованого пристрою як у лабораторних, так і в польових умовах, до яких варто віднести широку варіацію навколишньої температури, процес транспортування та відсутність електроенергії.

Збільшення рівня збереженості деконсервованих репродуктивних клітин можливо реалізувати шляхом підвищення швидкостей заморожування — відтавання (Vajta et al., 1998). У нашому центрі запропоновано метод кріоконсервації ооцитів і ембріонів ссавців, заснований на використанні надвисоких швидкостей теплообміну (Л.В. Горбунов, І.А. Морозова, Н.Д. Безуглий, 2000). Як контейнер для середовища, що містить біооб'єкт, використовують закриті капіляри із зовнішнім діаметром 1,8; 1,0; 0,5; 0,3 мм. Заморожування здійснюють за допомогою прямого занурення капілярів у рідкий азот, а відтавання — у водяну баню, нагріту до температури 40 °С, із застосуванням магнітної мішалки для перемішування теплоагента. Швидкості заморожування (відта-

вання) дорівнюють 28 (42) °С/с; 104 (126) °С/с; 198 (216) °С/с і 320 (380) °С/с відповідно.

Запропонований метод вітрифікації ооцитів і ембріонів ссавців дає можливість підвищити рівень збереженості деконсервованих біооб'єктів порівняно з існуючими розробками. Характерною рисою даного методу є використання оптимального співвідношення величин швидкостей відтавання до заморожування, завдяки чому можна уникнути процесу рекристалізації при розморожуванні, а також зменшити концентрацію кріопротектора та його токсичну й осмотичну дію на біооб'єкт.

Вважаємо, що подальше удосконалення технологій кріоконсервації біоматеріалу варто проводити в трьох напрямках. Перший реалізується шляхом зневоднення клітин. Другий засновується на осклянінні поза- та внутріклітинного середовищ. Третій — будується на спільному впливі дегідратаційних і вітрифікаційних ефектів, що відбуваються усередині клітин. Таким шляхом об'єднуються позитивні якості та нівелюються недоліки поданих вище методів.

Прискорити розв'язання існуючої проблеми можливо за допомогою проведення не тільки емпіричних, але й теоретичних досліджень. Для кількісного опису залежності рівня збереженості деконсервованого біооб'єкта від ступеня кристалоутворення внутріклітинного середовища нами вирішуються такі завдання, як розробка методу кількісної оцінки життєздатності статевих клітин і ембріонів та визначення критичних зон і гранично припустимих рівнів можливості поза- та внутріклітинного кристалоутворення залежно від виду, складу і концентрації застосованих кріопротекторів при заданих швидкостях заморожування-відтавання. Для цього ми створили метод кількісного визначення можливості кристалоутворення середовища при високих швидкостях теплообміну та отримали способи реєстрації температури і швидкості її зміни в широкому діапазоні.

Застосовуючи розроблений термокондуктометричний метод, визначили імовірності кристалоутворення розчинів гліцерину з концентраціями 0, 10 і 30% [V/V], приготовлених на



PBS та заморожених з різними швидкостями — 0,1, 27 і 30 °C/с. Імовірності кристалоутворення становили 98,9; 92,5; 20% відповідно для кожної із зазначених вище груп.

Також нами був апробований новий спосіб калібрування термодатчиків, які застосовуються в різних схемах виміру температури. Максимальна точність вимірювання температури в діапазоні від +50 до —196 °C реалізується за допомогою калібрування термодатчиків при використанні рівнянь, що описують залежність їхніх електропровідних властивостей від температури по трьох реперних точках, за умови контролю температури в даних точках із заданою точністю. Абсолютна (відносна) похибка визначення температури для всіх типів термодатчиків становить від 50 до 0 °C — 0,5 °C (1%) і від 0 до 200 °C — 2 °C (1,1%) відповідно.

Для розробки нової технології, заснованої на об'єднанні позитивних якостей альтернативних методів криоконсервації, необхідно вивчити вплив характеру зміни швидкості заморожування в діапазоні температур, який визначає активний ріст позаклітинних кристалів на рівень збереження деконсервованого біооб'єкта. Нами висувається гіпотеза, що застосування прискореного режиму заморожування може бути основою розробки нових технологій. Особливістю запропонованого режиму є зниження згубності дегідратаційно-вітрифікаційних процесів порівняно з існуючими технологіями. Висока початкова швидкість заморожування в позитивному і негативному діапазонах температур дає можливість подолати критичну зону згубного впливу зростаючої концентрації солей і криопротектора в результаті виморожування води. А температурне витримання у зоні температур  $-25 \div -32$  °C дасть змогу зневоднити біооб'єкт до необхідного стану і тим самим не допустити росту внутрішньоклітинних кристалів. Розраховуємо, що пряме занурення біооб'єкта після такої обробки у рідкий азот виключить можливість внутрішньоклітинного кристалоутворення, завдяки чому можна реалізувати високий рівень збереженості за високого ступеня технологічності процесу криоконсервації.

*Харківський біотехнологічний центр*