

(n=50); 44,4±11,1 (n=20); 42,8±11,1% (n=20) соответственно. Для ооцитов коров все концентрации растворов криопротекторов по морфологическим показателям обеспечили сохранность приблизительно на одном уровне (60,0±6,7%, n=20÷50), однако после созревания и оплодотворения *in vitro* только в группе с концентрацией 53% наблюдалось развитие ооцитов коровы до 4-клеточного эмбриона (11,1±9,5%, n=11). При использовании витрифицирующего раствора, состоящего из глицерина и сахарозы, жизнеспособных ооцитов не получено.

Таким образом, при замораживании ооцитов млекопитающих в широком диапазоне скоростей теплообмена наблюдаются приблизительно одинаковые уровни жизнеспособности деконсервированного биообъекта (7,1±11,1%, n=11÷45) с развитием до стадии 2-клеточного эмбриона, однако развитие до 4-клеточных эмбрионов указанного уровня жизнеспособности получено только при сверхвысоких скоростях теплообмена.

Влияние криопротекторов и замораживания на эритроциты млекопитающих

О.Н. ДЕНИСОВА

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Influence of Cryoprotectants and Freezing on Mammalian Erythrocytes

O.N. DENISOVA

Kharkov State Zooveterinary Academy

В последние годы в ветеринарии все чаще прибегают к трансфузионным операциям. Консервированная кровь, заготовленная на гемоконсерванте, может сохранять свои морфобиохимические показатели в течение 14 дней. Для сохранности эритроцитов на протяжении многих лет применяют криоконсервирование. Множество работ посвящено исследованию замораживания-отогрева эритроцитов человека. Для изучения методов криоконсервирования эритроцитов животных необходимы дополнительные эксперименты.

Цель данной работы – исследовать методы криоконсервирования эритроцитов некоторых животных (конь, бык, собака), определить эффективность эндоцеллюлярных (глицерин и ДМСО) и экзоцеллюлярного (ПЭО-1500) криопротекторов в процессе замораживания-отогрева эритроцитов млекопитающих.

Эритроциты животных замораживали со следующими растворами: 30%-м глицерином, 20%-м ДМСО и 30%-м ПЭО-1500. Криопротекторы добавляли к эритроцитам в соотношении 1:1, замораживали до -196°C погружением контейнера в жидкий азот, после хранения отогревали на водяной бане при $42-45^{\circ}\text{C}$.

Проведенные исследования показали, что глицерин (проникающий криопротектор), который наиболее часто используют для криоконсервирования эритроцитов человека, не оказывает криозащитного действия при замораживании-отогреве эритроцитов исследуемых животных. Степень повреждения эритроцитов животных при замораживании в присутствии глицерина составляет 60-90%.

Величина гемолиза эритроцитов животных после замораживания-отогрева под защитой ДМСО составляет от 20 до 30%, а под защитой ПЭО-1500 – 0,5-3%.

Thus, when freezing mammalian oocytes within a wide range of heat exchange rates nearly the same levels of viability of frozen-thawed bioobject ($7.1\pm 11.1\%$, n=11÷45) with development up to 2-cell embryo stage were observed, but development up to 4-cell ones with the mentioned viability level was obtained only under ultra-rapid heat exchange rates.

Recently transfusion operations have been getting frequently used in veterinary. Preserved blood procured with hemopreservative may keep its morphobiochemical indices for 14 days. Cryopreservation is used to preserve erythrocytes for many years. Numerous papers are devoted to studying freeze-thawing of human erythrocytes. To investigate cryopreservation method for animals' erythrocytes additional experiments are necessary.

The research aim was to investigate cryopreservation methods for mammalian erythrocytes (equine, bovine, canine), to examine the efficiency of endocellular (glycerol and DMSO) and exocellular (PEO-1500) cryoprotectants during freezing of erythrocytes.

Erythrocytes of animals were frozen with 30% glycerol, 20% DMSO and 30% PEO-1500. Cryopreservatives were added to erythrocytes in the 1:1 ratio, they were frozen down to -196°C by plunging a container into liquid nitrogen. After storage they were thawed on water bath at $42-45^{\circ}\text{C}$.

Performed studies showed that glycerol (penetrating cryoprotectant) being the most frequently used for cryopreservation of human erythrocytes did not cause a cryoprotective effect during freeze-thawing of the erythrocytes of animals under studying. In glycerol presence animal erythrocytes have 60-90% injury degree.

Hemolysis value of animals' erythrocytes after freeze-thawing under DMSO protection makes from 20 to 30% and under PEO-1500 one is 0.5-3%.

When transferring animals' erythrocytes after thawing into isotonic NaCl solution at 37°C (transfusion model) there are observed statistically significant differences of injury depth for the cells cryopreserved with PEO-1500 in comparison with the control group. Injury degree for equine, bovine, canine erythrocytes makes 32-36% and rises during

При переносе эритроцитов животных после деконсервирования в изотонический раствор NaCl при 37°C (модель трансфузии) наблюдаются достоверные отличия глубины повреждений криоконсервированных с ПЭО-1500 клеток от контрольной группы. Степень повреждений эритроцитов коня, быка, собаки составляет 32-36 % и увеличивается в течение суток до 50%. При переносе в изоосмотические условия замороженных и отогретых под защитой ДМСО клеток всех исследуемых животных достоверных различий от контроля в течение суток не наблюдается.

В другой серии экспериментов изучали показатели осмотической устойчивости, которые свидетельствуют об изменении эластичности плазматической мембраны. Индекс осмотической хрупкости, показывающий концентрацию NaCl, при которой происходит 50%-й гемолиз, для эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭО-1500, достоверно выше как в контрольной группе, так и в группе эритроцитов, замороженных под защитой ДМСО. При сравнении данного показателя контрольных и криоконсервированных с ДМСО эритроцитов значительных отличий не обнаружено.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод, что глицерин не эффективен для эритроцитов данных животных. ПЭО-1500 оказался более эффективным криопротектором, однако после деконсервирования в изоосмотических условиях клетки повреждаются, т. е. являются осмотически неустойчивыми. Наиболее эффективен (по исследуемым параметрам) для эритроцитов коня, быка, собаки ДМСО, который обеспечивает не только оптимальный уровень потери клеток после замораживания-отогрева, но и сохраняет их осмотическую устойчивость.

24 hrs up to 50%. When transferring frozen and thawed under DMSO protection cells for all studied animals into isoosmotic conditions no statistically significant differences in comparison with the control during 24 hrs were observed.

In other experiments there were studied the indices of osmotic resistance testifying to the change in plasma membrane elasticity. Osmotic fragility index indicating to NaCl concentration under which there is 50% hemolysis for the erythrocytes cryopreserved under PEO-1500 protection is statistically and significantly higher both in the control group and in that with the erythrocytes frozen under DMSO protection. No considerable differences were found when comparing this index for control and cryopreserved DMSO erythrocytes.

Thus basing on performed studies one can conclude about inefficiency of glycerol for erythrocytes of mentioned animals. Animal erythrocytes are preserved after cryopreservation with PEO-1500, but after thawing under isoosmotic conditions the cells are damaged, that is they are osmotically non-resistant. DMSO was occurred to be the most efficient (on the studied parameters) for equine, bovine, canine erythrocytes. It provides not only optimal level of cell loss after freeze-thawing but also keeps their osmotic resistance.

Возможности криоконсервирования биообъекта на основе ускоренных режимов замораживания

А.Г. Мищенко, А.В. Горбунов

Институт животноводства УААН, г. Харьков

Possibilities for Bioobject Cryopreservation Basing on Accelerated Regimens of Freezing

A.G. MISHCHENKO, L.V. GORBUNOV

Cattle Breeding Institute of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kharkov

Рассмотрены подходы к созданию безальтернативного способа криоконсервирования биологического материала, основанного на применении ускоренных режимов замораживания. Показано, что при традиционных способах криоконсервирования спермиев животных, с учетом выделения скрытой теплоты кристаллизации, величина средневзвешенного ускорения может изменяться от +927 до $-1200^{\circ}\text{C}/\text{мин}^2$. С помощью математического моделирования определена возможность создания устройства, позволяющего реализовывать различные режимы замораживания, отличающиеся не только по скорости, но и ускорению. Проведен анализ существующих моделей теплообмена, выбрана одна из них (Г. Джеффрис, Б. Свирлз, 1970), наиболее адекватно описывающая процесс пассивного охлаждения термоблока в горловине сосуда Дьюара.

Approaches to creating an alternative-free way for biological material cryopreservation, based on applying accelerated freezing regimens were considered. When applying traditional ways for animal spermatozoa cryopreservation, taking into account the release of hidden crystallisation heat, the value of weight-average acceleration was shown as capable to change from +927 to $-1200^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$. Using mathematical modelling a possibility to create the device, enabling realisation of various freezing regimens, differing both by rate and acceleration, was determined. The existing models of heat exchange were analysed and one of them (G. Jeffrys, B. Swirls, 1970), most adequately describing the process of thermoblock passive cooling in Dewar vessel neck, was chosen.

Basing on heat exchange model the optimal device parameters to freeze meristematic cells of cultivated plants