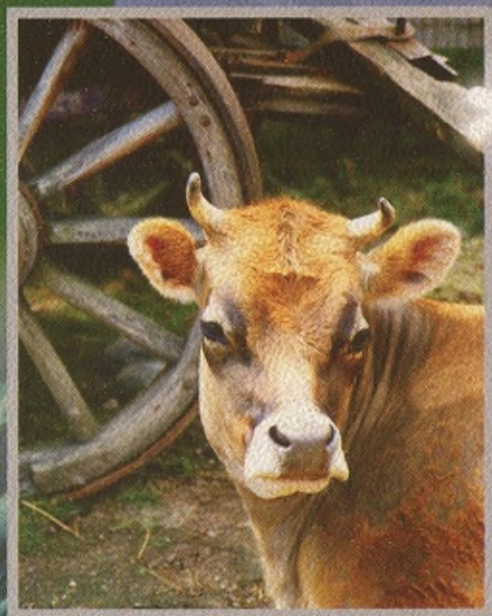


Л.В. Горбунов, Л.П. Буцацкий

# Криоконсервация половых клеток и эмбрионов животных



КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

Л. В. Горбунов

Л. П. Бучацкий

# КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ ЖИВОТНЫХ

Монография



УДК 591.3  
ББК 28.63  
Г 67

Рецензенты:

д-р биол. наук, проф. Н. Н. Ильенко,  
д-р биол. наук, проф.. О. М. Арсан

**Горбунов Л.В., Бучацкий Л.П.**

**Г67** Криоконсервация половых клеток и эмбрионов животных: Монография - К.: Издательско-полиграфический центр "Киевский университет", 2005. - 325 с.

**ISBN 966-594-609-9**

В работе представлен количественный метод оценки эффективности проведения криоконсервации половых клеток и эмбрионов разных видов животных, с учетом влияния индивидуальных свойств биообъекта на уровень его криорезистентности. Показано, что проведение теоретических и практических исследований в комплексе дает возможность оптимизации допустимого уровня кристаллической структуры в клетке. Предложенные методы количественного определения вероятности кристаллообразования криоконсерванта позволяют исследовать толерантность биообъекта к образованию кристаллов льда в широком диапазоне скоростей теплообмена при различных концентрациях криопротектора. Представлены методы контроля температуры в процессе замораживания-оттаивания, способствующие совершенствованию различных технологий криоконсервации. Предложенные устройства дают возможность реализации широкого спектра скоростей теплообмена (1-24000 °С/мин) и конечных температур охлаждения (от 0 до -100 °С) в лабораторных и полевых условиях. Рекомендовано совершенствование технологий криоконсервации биоматериала в трех направлениях. Первое – реализуемое за счет обезвоживания клеток на основе применения переменных скоростей замораживания ( $V_3 < 100$  °С/мин,  $V_3 \neq \text{const}$ ). Второе – основанное на стекловании вне- и внутриклеточной среды ( $V_3 > 5 \cdot 10^{30}$ С/мин). Третье – построенное на совместном воздействии дегидратационных и витрификационных эффектов, происходящих внутри клетки.

**УДК 591.3  
ББК 28.63**

ISBN 966-594-609-9

© Л. В. Горбунов, Л. П. Бучацкий, 2005

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	3
<b>1. НЕОБХОДИМОСТЬ МОДЕЛИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА</b> .....	8
1.1. Этапы построения модели биологического эксперимента.....	10
1.2. Планирование проведения биологического исследования.....	12
1.3. Определение минимального количества измерений для одной и двух сравниваемых выборок.....	12
1.4. Способы обобщения результатов, полученных в ходе проведения биологического исследования.....	19
<b>2. ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ БИООБЪЕКТА</b> .....	23
2.1. Выбор критерия оценки жизнеспособности биообъекта, необходимого для получения достоверного результата.....	26
2.2. Определение минимального количества измерений, обеспечивающего достоверный результат для оценки различия сохранности ооцитов и эмбрионов млекопитающих методом альтернативного варьирования.....	27
2.3. Количественный способ оценки жизнеспособности эмбрионов млекопитающих.....	30
2.4. Оценка уровня технологии криоконсервации, культивирования ооцитов и эмбрионов млекопитающих.....	35
2.5. Уменьшение ошибки вычисления средней величины жизнеспособности биообъекта.....	51
2.6. Оценка эффективности выполнения отдельной биотехнологической операции посредством использования метода видеофиксации биообъекта.....	56
2.7. Определение подвижности спермиев разных видов животных методом видеофиксации.....	62
<b>3. КОНТРОЛЬ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПОСРЕДСТВОМ ТЕРМО- И ЭЛЕКТРОПУНКТИРНОЙ ДИАГНОСТИКИ</b> .....	79
3.1. Проблемы определения оптимальности стимулирования организма.....	80
3.2. Обоснование эффективности применения метода акупунктуры в воспроизводстве крупного рогатого скота и свиней.....	90
3.3. Получение информации с биологически активных точек о состоянии человека и животных.....	93
3.4. Экспресс-методы диагностики физиологического состояния млекопитающих на основе электропунктурных измерений.....	101
3.5. Контроль физиологического состояния млекопитающего посредством применения метода "векторное кольцо".....	110

<b>4. МЕТОДЫ ИЗМЕНЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ И СКОРОСТИ ЕЕ ИЗМЕНЕНИЯ</b> .....	115
4.1. Средства измерения температуры.....	116
4.2. Термометры сопротивления и полупроводниковые термометры.....	117
4.3. Термоэлектрические приборы (термопары).....	118
4.4. Методы калибровки термопар и других средств измерения температуры.....	128
4.5. Методы измерения скорости теплообмена.....	146
4.6. Выбор адекватного метода проведения измерения температуры и калибровки термодатчика.....	154
<b>5. СПОСОБЫ РЕАЛИЗАЦИИ МЕДЛЕННЫХ СКОРОСТЕЙ ЗАМОРАЖИВАНИЯ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ ЖИВОТНЫХ</b> .....	158
5.1. Криоконсервация биообъекта с использованием устройства, основанного на активной подаче хладагента в замораживающую камеру.....	159
5.2. Криоконсервация биообъекта на основе пассивного остывания термоблока в горловине сосуда Дьюара.....	161
5.3. Устройства, позволяющие оптимизировать скорость замораживания биообъекта и характер ее изменения.....	175
5.4. Замораживание спермиев животных в полевых и лабораторных условиях.....	187
<b>6. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ ЖИВОТНЫХ НА ОСНОВЕ ПРИМЕНЕНИЯ СВЕРХВЫСОКИХ СКОРОСТЕЙ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ</b> .....	202
6.1. Необходимость использования высоких и сверхвысоких скоростей замораживания биообъекта.....	203
6.2. Возможности получения сверхвысоких скоростей замораживания- оттаивания в лабораторных условиях.....	217
6.3. Устройства для криоконсервации половых клеток и эмбрионов животных при сверхвысоких скоростях теплообмена.....	226
6.4. Приготовление раствора криопротектора, обеспечивающего эффект стеклования среды, при высоких и сверхвысоких скоростях теплообмена.....	234
6.5. Возможности криоконсервации половых клеток и эмбрионов животных при сверхвысоких скоростях теплообмена.....	243
<b>7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕРОЯТНОСТИ КРИСТАЛЛООБРАЗОВАНИЯ СРЕДЫ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ СКОРОСТЕЙ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ</b> .....	252
7.1. Физические методы исследования кристаллизации растворов.....	256
7.2. Методы определения температуры внутриклеточного кристаллообразования в половых клетках и эмбрионов животных.....	266

<b>8. ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ТЕХНОЛОГИЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА</b> .....	293
8.1. Сопоставление технологий и соответствующих им уровней жизнеспособности биообъектов, криоконсервированных в различных диапазонах скоростей замораживания-оттаивания.....	303
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b> .....	310
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	317