



УКРАЇНА

(19) UA (11) 49759 (13) A

(51) 6 A61J1/05

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ РОБОТИ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО БАНКУ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

1

2

(21) 2002054289

(22) 24.05.2002

(24) 16.09.2002

(46) 16.09.2002, Бюл. № 9, 2002 р.

(72) Лобинцева Галина Степанівна, Гладких Юрий Васильович, Лобинцев Дмитро Валерійович, Гладких Володимир Юрійович

(73) Лобинцева Галина Степанівна, Гладких Юрий Васильович, Лобинцев Дмитро Валерійович, Гладких Володимир Юрійович

(57) Спосіб роботи банку кріоконсервованих біологічних об'єктів, який передбачає розміщення зразка біологічних середовищ у спеціальній ємності, додавання кріоконсерванту, розфасування завиді клітин в контейнери (ампули), програмне заморожування середовища в контейнері, розміщення контейнера з замороженим середовищем у сховищі, збереження контейнера із середовищем при низькій температурі, вилучення контейнера зі сховища, розморожування середовища в контейнері для наступного використання, який відрізняється тим, що для збереження в банку застосовують отримані в клінічних установах біооб'єкти, які поміщають у стерильний фізіологічний розчин з антибіотиком і зберігають при кімнатній температурі не більш 4 годин із моменту одержання до кріоконсервування в банку, а як ємність для збереження використовують ампули об'ємом 1,8 - 4,5 мл, ампули заповнюють на 50 - 80 % і вставляють в касети для

заморожування, застосовують концентрації кріопротектора диметилсульфоксиду $0,4 \div 1,45$ моль/л, заморожування здійснюють у три етапи, при цьому на першому етапі - зі швидкістю $0,5 \div 1,5$ °C/хв. до $-3,5 \div -4$ °C, з застосуванням сидингу при температурі $-3,5 \div -4$ °C, на другому етапі - зі швидкістю $0,3 \div 0,5$ °C/хв. до $-7 \div -8$ °C, після цього етапу здійснюють температурну зупинку при $-30 \div -40$ °C протягом $3 \div 5$ хв., а на третьому етапі - зі швидкістю $10 \div 12$ °C/хв. до $-80 \div -86$ °C, після заморожування касету з ампулами витягують з укладки для заморожування з камери для заморожування і переносять (протягом $3 \div 5$ сек.) в кювету з рідким азотом, в яку попередньо занурюють іншу касету для збереження ампул, і послідовно переносять кожну ампулу протягом $3 \div 5$ сек. в касету для збереження ампул, касету для збереження переносять у сховище біологічних продуктів, вставляють в укладку і занурюють у рідкий азот, процес вилучення зразків об'єктів для визначення якісних характеристик об'єктів, що зберігаються, здійснюють шляхом вилучення касети з необхідною партією ампул і занурення її в кювету з рідким азотом, наступного вилучення окремих ампул з касети для перевірки якості, після чого касету знов вставляють в сховище, по результатах перевірки якості касети з клітинами, які мають вірусне чи мікроплазмове забруднення, вилучають зі сховища.

Винахід відноситься до консервування та збереження біологічних об'єктів, наприклад до способів роботи низькотемпературного банку біологічних середовищ, що мають ядра, які передбачають операції по підготовці біооб'єктів до низькотемпературного консервування для збереження в сховищах банку, із використанням середовищ для кріоконсервування, і спеціальних ємностей та контейнерів для заморожування і збереження біооб'єктів, режимні параметри охолодження біооб'єктів, дії з пристроями і

речовинами банку, які забезпечують процес збереження й операції по виїмці заморожених біооб'єктів зі сховища і їх розморожуванню перед використанням.

Відомий спосіб роботи банку кріоконсервованої крові (див. патент США №4,306,556 МПК А61J 001/00, дата публікації 22.12.1981) який, передбачає розміщення зразка крові в спеціальний контейнер, додавання кріопротектора, зокрема гліцерин (glycerol), встановлення в контейнері електроосмотичної

(13) A

(11) 49759

(19) UA

мембрани, заморожування середовища в контейнері, розміщення контейнера з замороженим середовищем у сховище, збереження контейнера із середовищем при низькій температурі, вилучення контейнера зі сховища, розморожування середовища в контейнері, часткове видалення рідкого середовища з контейнера з використанням електроосмотичної мембрани, для наступного використання залишку середовища.

Недоліком зазначеного способу є те, що його операції вузькоспецифічні для збереження крові і при використанні в способі інших біооб'єктів не забезпечуються необхідні якісні характеристики після завершення процесу їх збереження в банку.

Недоліком зазначеного способу є те, що застосований у ньому одноетапний режим заморожування травматичний для інших біооб'єктів людини тому що швидке зниження температур викликає швидкий зріст великих кристалів які порушують оболонки клітин.

Відсутність контролю за процесом кристалізації не забезпечує стабільності характеристик біооб'єктів, які зберігаються в банку.

Спосіб передбачає використання в якості кріопротектора гліцерину що ускладнює процедуру клінічного застосування, тому що потребує його видалення, наприклад, перед введенням клітин пацієнту.

Найбільш близьким до заявленого за ознаками є спосіб роботи банку кріоконсервованої крові (див. заявку Росії 99126524/14, МПК А01N1/02, дата публ. заявки: 2001.08.27) який передбачає видалення надлишку плазми центрифугуванням і наступним ресуспендуванням суспензії і додаванням кріопротектора, при цьому підготовку до консервування здійснюють у полімерному контейнері, який поміщають у пенал-холдер у вигляді гофрованого алюмінієвого контейнера, заморожування проводять при температурі -80° , збереження здійснюють у цій же тарі, вилучення контейнера зі сховища, розморожування середовища в контейнері, часткове видалення рідкого середовища з контейнера, для наступного використання залишку середовища.

Недоліком зазначеного способу є те, що його операції вузькоспецифічні для збереження крові і при використанні в способі інших біооб'єктів не забезпечуються необхідні якісні характеристики після завершення процесу їх збереження в банку.

Недоліком зазначеного способу є те, що застосований у ньому одноетапний режим заморожування травматичний для інших біооб'єктів людини тому, що швидке зниження температур викликає швидкий зріст великих кристалів які порушують оболонки клітин.

Відсутність контролю за процесом кристалізації не забезпечує стабільності характеристик біооб'єктів, які зберігаються в банку.

Спосіб передбачає використання 5% концентрації кріопротектора диметилацетамида і потребує збільшених розмірів контейнерів та сховищ банку і ускладнює наступне використання збережених біооб'єктів.

Довготривале збереження біологічних

суспензій при температурі рідкого азоту практично не здійснює додаткової пошкоджуючої на них дії, однак у роботі банку заморожені біооб'єкти не можуть постійно зберігатися до моменту використання без виконання в банку над ними ряду технологічних операцій, наприклад по розморожуванню зразків для бактеріологічного контролю, для вірусного та мікоплазмового контролю, для культивування, вилучення зразків для клінічного використання.

Внаслідок цих дій не тільки вибраний контейнер а і вся укладка частково розморожується. При цьому навіть короточасне (протягом 1-2хвил.) перебування матеріалу при кімнатній температурі викликає нагрівання контейнера до температури -100°C і вище. При даній температурі в замороженій системі із більшістю кріопротекторів, вже відбуваються фазові переходи, і чим шоріше протікає фазовий перехід, тим сильніше система відходить від рівноважного стану. У цей період у зразках розвиваються фізичні явища, що призводять до рекристалізації, утворення мікро- і макро тріщин, появи некомпенсованих зарядів і електричних полів, що викликають механічні й електричні uszkodження клітинних мембран об'єктів що зберігаються.

У такому способі зазначені технологічні процеси роботи банку повинні бути організовані певним чином для того, щоб виключити зазначені процеси, які істотно знижують життєздатність об'єктів, що зберігаються в банку.

Завданням винаходу є створення способу роботи низькотемпературного банку біологічних об'єктів у якому шляхом зміни знайдених емпіричним шляхом режимів роботи банку, використовуваної сировини, допоміжних речовин, обладнання, та дій з його використанням забезпечується покращення умов збереження середовищ, збільшення періоду збереження та підвищення кількості життєздатних клітин середовищ, що зберігаються після періоду збереження.

Спосіб роботи низькотемпературного банку біологічних об'єктів передбачає розміщення зразка біологічних середовищ у спеціальну ємність, додавання кріоконсерванту, розфасування біологічних середовищ в контейнери, заморожування середовища в контейнері, розміщення контейнера з замороженим середовищем у сховище, збереження контейнера із середовищем при низькій температурі, вилучення контейнера зі сховища і розморожування середовища в контейнері.

Новим в способі є те, що для збереження в банку застосовують отримані в клінічних установах біооб'єкти, які поміщають у стерильний фізіологічний розчин з антибіотиком і зберігають при кімнатній температурі не більше 4 годин із моменту одержання до кріоконсервування в банку, в якості ємності для збереження (контейнера) використовують ампули обсягом $1,8\pm 4,5\text{мл.}$, ампули заповнюють на $50\pm 80\%$ і вставляють в касети для заморожування, застосовують концентрації кріопротектора диметилсульфоксиду (далі ДМСО) $0,4\pm 1,45\text{моль/л}$, заморожування

здійснюють у три етапи, при цьому на першому етапі з швидкістю $0,5 \pm 1,5^\circ\text{C}/\text{хв.}$ до $-3,5 \pm -4^\circ\text{C}$, з застосуванням сідінгу при температурі $-3,5 \pm -4^\circ\text{C}$, на другому етапі зі швидкістю $0,3 \pm 0,5^\circ\text{C}/\text{хв.}$ до $-7 \pm -8^\circ\text{C}$, після цього етапу здійснюють температурну зупинку при $-30 \pm -40^\circ\text{C}$ протягом 3 ± 5 хв., а на третьому етапі - зі швидкістю $10 \pm 12^\circ\text{C}/\text{хв.}$ до $-80 \pm -86^\circ\text{C}$, після заморожування касету з ампулами витягають з камери для заморожування і переносять (протягом 3 ± 5 сек.) в кювету з рідким азотом, в яку попередньо занурюють іншу касету для збереження ампул і, послідовно, переносять кожну ампулу протягом 3 ± 5 сек. в касету для збереження ампул, касету для збереження переносять у сховище біологічних продуктів, вставляють в укладку і занурюють у рідкий азот, процес вилучення зразків об'єктів для визначення якісних характеристик об'єктів, що зберігаються, здійснюють шляхом вилучення касети з необхідною партією ампул і занурення її в кювету з рідким азотом, наступного вилучення окремих ампул з касети, для перевірки якості, після чого касету знову вставляють в сховище, по результатах перевірки якості касети з клітинами, які мають вірусне чи мікоплазмове забруднення, вилучають зі сховища.

Внаслідок використання зазначеного способу його операції прийнятні для збереження широкого переліку біоб'єктів і при цьому забезпечується їх необхідні якісні характеристики після завершення процесу їх збереження в банку.

Перевагою способу є те, що застосований у ньому режим заморожування не травматичний для клітин біоб'єктів тому, що емпірично підібране трьохетапне зниження температур та гарантоване за певних умов ініціювання процесу кристалізації не викликає швидкий зріст великих кристалів, які порушують оболонки клітин, що забезпечує стабільність характеристик біоб'єктів, які зберігаються в банку.

Спосіб передбачає використання зменшеної концентрації кріопротектора що зменшує необхідний розмір сховищ банку та спрощує наступне використання збережених біоб'єктів.

Розроблені технологічні операції по розморожуванню зразків для бактеріологічного контролю, для вірусного та мікоплазмового контролю, для культивування і для визначення кількості клітин-попередників не викликають критичного нагрівання всього контейнера і система не відходить від урівноваженого стану. Внаслідок цього не виникає рекристалізація, не утворюються мікро - і макро тріщини, як наслідок не ушкоджуються клітини мембрани об'єктів що зберігаються.

У такому способі зазначені технологічні процеси роботи банку емпірично підібрані таким чином, що виключаються процеси, які істотно знижують життєздатність об'єктів, що зберігаються в банку.

Для порівняння прототипу та запропонованого способу здійснювали спосіб за прототипом та запропонованим на зазначених нижче прикладах 1-88. В прикладах здійснювали такі дії.

Незалежно від джерела одержання, приготування клітинної суспензії за прототипом та

запропонованим способом здійснювали однаково.

Використовували в прикладах суспензії клітин, що містять ядро, а саме, суспензії клітин плодкових тестисів, суспензії нервових клітин, суспензії клітин гепатоцитів, суспензії клітин кардіоміоцитів, суспензії клітин підшлункової залози, суспензії гемопоетичних клітин крові.

Отримані в клінічних установах біоб'єкти поміщали у стерильний фізіологічний розчин з антибіотиком (гентамицин, канамицин) і зберігали при кімнатній температурі не більш 4 годин із моменту одержання до кріоконсервування в банку.

В Таблиці 1 зазначені режими виконання прикладів 1-4 за прототипом.

В прикладах за прототипом не використовували суспензії клітин плодкових тестисів, суспензії нервових клітин, суспензії клітин кардіоміоцитів тому, що без досліджень зрозуміло що зазначений спосіб роботи низькотемпературного банку непридатний для цих клітин внаслідок того, що дуже малі обсяги суспензій (1-5мл), навіть при використанні найменшого контейнера за способом для їх збереження в 50мл., після технологічних операцій в банку по перевірці їх якісних характеристик продукт в контейнері, який отримано від одного донора вже непридатний для подальшого зберігання в банку.

В прикладах за прототипом в зв'язку з відсутністю відповідної регламентації не витримували зазначений в розробленому способі режим збереження сировини (не більше 4 годин). В якості кріоконсерванта використовували 5% диметилацетамід.

Отриману завісь клітин, що призначені для збереження в банку поміщали в контейнери об'ємом 50мл., контейнери заповнювали в середньому на 20 ± 30 мл., видували з контейнера повітря і запаювали отвори. Контейнери поміщали у пенал - холдер у вигляді гофрованого алюмінієвого контейнера, заморожування проводили в один етап в холодильнику VXS 380 фірми JOUAN при температурі -80° .

Збереження здійснювали у цій же тарі, для чого холдер вкладали в паперовий пакет з відповідними відмітками, і вставляли в касету для збереження в сховищі в рідкому азоті.

Розморожуванню зразків для бактеріологічного контролю, для вірусного та мікоплазмового контролю, для культивування здійснювали шляхом вилучення касети з холдером і контейнером зі сховища, відбору по напису на пакеті необхідного контейнера, виймання контейнера з пакета, розморожування середовища в контейнері, розкривання контейнеру і відбору проби необхідного обсягу.

Середній термін виконання сукупності зазначених дій вказано в Таблиці 1.

Якісні характеристики збережених в банку клітин, а саме життєздатність визначали за відомим способом, шляхом фарбування зразків трипаневим синім, за яким пошкоджені клітини фарбувалися, після чого підраховували кількість пофарбованих та непофарбованих клітин на 100 клітин. Кількість непофарбованих клітин

отриманих в прикладах вказано в Таблиці 1.

В таблиці 2 зазначені режими виконання прикладів 5-88 за запропонованим способом.

В прикладах 5-18, Таблиця 2а використовували суспензії клітин плодових тестисів, в прикладах 19-32, Таблиця 2б суспензії нервових клітин, в прикладах 33-46, Таблиця 2в суспензії клітин гепатоцитів, в прикладах 47-60, Таблиця 2г суспензії клітин кардіоміоцитів, в прикладах 61-74, Таблиця 2д суспензії клітин підшлункової залози, в прикладах 75-88, Таблиця 2ж суспензії гемопоетичних клітин крові.

Підготовка клітин до низькотемпературного консервування за запропонованим способом.

Кріопротектор ДМСО - 7,0мол/л концентрації розводили до 0,8 і 2,9мол/л концентрації. В отриману завісь клітин, що призначені для кріоконсервування, через ін'єкційну голку по краплині додавали 1:1 розчин ДМСО до одержання 0,4-1,45мол/л кінцевих концентрацій при легкому перемішуванні завісі шляхом похитування пробірки.

За допомогою шприцу через ін'єкційну голку гемопоетичні клітини розливали по 1мл в поліетиленові кріоампули об'ємом 1-4,5мл фірми Nunc (CryoStore Boxes). Використовувані ампули та обсяг їх заповнення зазначені в Таблиці 2. Кріоампули герметично закривали кришками і маркували.

Заморожування гемопоетичних клітин виконували за допомогою програмного заморозувача, який дозволяє варіювати швидкість зниження температури на різних етапах кріоконсервування і автоматично здійснювати ініціювання процесу кристалізації (сідінг) за певної температури, шляхом разового пропуску рідкого азоту через відповідну трубку.

При заморожуванні клітинної суспензії в ампулах використовували спеціальні укладки, в які вставляли ампули (контейнери) вертикально і укладку розміщували в теплообмінну камеру заморозувача на відповідному пристрої, що виконує ініціацію кристалоутворення.

Заморожування клітин виконували за трьохетапною програмою. На першому етапі від кімнатної температури ($20 \pm 4^\circ\text{C}$) зі швидкістю $0,5 \div 1,5^\circ\text{C/хв.}$ до $-3,5 \div -4^\circ\text{C}$, Протягом першого етапу заморожування, при досягненні температури $-3,5 \div -4^\circ\text{C}$ здійснювали заходження (сідінг)

одного боку контейнера із клітинною суспензією, шляхом разового пропускання через нього рідкого азоту, завдяки чому, при відповідній температурі автоматично відбувалася ініціація кристалоутворення.

На другому етапі зі швидкістю $0,3 \div 0,5^\circ\text{C/хв.}$ до $-7 \div -8^\circ\text{C}$, після цього етапу здійснюють температурну зупинку при $-30 \div -40^\circ\text{C}$ протягом 3-5хв., а на третьому етапі зі швидкістю $10 \div 12^\circ\text{C/хв.}$ до $-80 \div -86^\circ\text{C}$. Конкретні режими в прикладах зазначені в Таблиці 2.

Концентрація кріопротектора складала 0,4-1,45мол/л.

Після замороження контейнери за допомогою лещат вилучали із укладки і переносили в рідкий азот в сховище біологічних продуктів (марки СБ-0,5), обладнане чарунками зі змінними касетами.

Зберігали кріоконсервовані клітини в низькотемпературному сховищі при мінус $130-196^\circ\text{C}$ протягом трьох місяців.

Процес вилучення зразків об'єктів для визначення якісних характеристик об'єктів, що зберігаються здійснювали шляхом вилучення касети з необхідною партією ампул і занурення її в ковту з рідким азотом, наступного вилучення окремих ампул з касети, для перевірки якості, після чого касету знов вставляли в сховище. Терміни роботи з ампулами та касетами зазначені в Таблиці 2.

Оцінку якісних характеристик збережених клітин, а саме життєздатність визначали за відомим способом, шляхом фарбування зразків трипаневим синім, за яким пошкоджені клітини фарбувалися, після чого підраховували кількість пофарбованих та непофарбованих клітин на 100 клітин. Кількість непофарбованих клітин отриманих в прикладах вказано в Таблиці 2.

Результати досліджень показують що клітини, які зберігалися за способом роботи банку, по програмі, описаній в прототипі, мали низьку життєздатність після розморожування, крім того, за таким способом роботи банку можна зберігати не усі види клітинних суспензій, а тільки ті, що одержують у великих обсягах.

Клітинні суспензії, що заморожені по запропонованому способу роботи банку і зберігались в банку по описаній вище технології, показали високий процент життєздатних клітин після збереження протягом 3-х місяців.

Таблиця 1

№ прикладу	Використовувані клітини	Обсяг заповнення контейнеру мл.	Температура в холодильнику, °C	Смукуна тривалість виїмки зразка зі сховища для технологічних операцій контролю сек.	Термін зберігання, місяців	Кількість неокрашених клітин на 100 клітин
1.	Суспензії клітин гепатоцитів	20	-80	25	3	45
2.	Суспензії клітин підшлункової залози	20	-82	30	3	54
3.	Суспензії гемопоетичних клітин периферійної крові	15	-80	32	3	60
4.	Суспензії гемопоетичних клітин кордової крові	18	-80	28	3	59

Таблиця 2а

№ прикладу	Термін зберігання сировини, хв..	Обсяг ампули мл.	Обсяг заповнення ампул, %	Концентрація кріопротектора, моль/л	Швидкість заморожування, °C/хвил.	Температура проведення сідінгу, °C	Кінцева температура етапу, °C	Швидкість заморожування, °C/хвил.	Кінцева температура етапу, °C	Температурна зупинка, °C	Термін зупинки, хв..	Швидкість заморожування, °C/хвил.	Кінцева температура заморожування, °C	Термін перекладки в кювету сек.	Середній термін переносу ампул, сек.	Кількість непофарбованих клітин %
5.	149	1	53	0,5	0,6	3,5	3,5	0,3	7,1	30,9	3,2	10,2	80,5	5	4	96
6.	240	1,8	80	1,4	1,5	4	4	0,5	8	40	5	12	86	3	5	98
7.	140	4,5	50	0,4	0,5	3,5	3,5	0,3	7	30	3	10	80	3	4	96
8.	185	1,8	64	0,9	1	3,7	3,7	0,4	7,5	34,5	3,9	10,9	82,7	5	4	97
9.	222	1,8	75	1,3	1,3	3,9	3,9	0,5	7,8	38,2	4,6	11,6	84,9	4	4	98
10.	167	1	58	0,7	0,8	3,6	3,6	0,4	7,3	32,7	3,5	10,5	81,6	5	4	97
11.	158	1	55	0,6	0,7	3,6	3,6	0,3	7,2	31,8	3,4	10,4	81,1	3	3	96
12.	213	1	72	1,2	1,2	3,9	3,9	0,4	7,7	37,3	4,5	11,5	84,4	4	5	97
13.	195	1,8	66	1	1	3,8	3,8	0,4	7,5	35,5	4,1	11,1	83,3	4	5	97
14.	231	1	77	1,45	1,4	4	4	0,5	7,9	39,1	4,8	11,8	85,5	4	3	98
15.	176	1,8	61	0,8	0,9	3,7	3,7	0,4	7,4	33,6	3,7	10,7	82,2	4	3	97
16.	204	1,8	69	1,1	1,1	3,8	3,8	0,4	7,6	36,4	4,3	11,3	83,8	4	4	97
17.	149	1	53	0,5	0,6	3,5	3,5	0,3	7,1	30,9	3,2	10,2	80,5	5	4	96
18.	240	1,8	80	1,4	1,5	4	4	0,5	8	40	5	12	86	3	5	98

Таблиця 26

№ прикладу	Термін зберігання сировини, хв..	Обсяг ампули мл.	Обсяг заповнення ампул, %	Концентрація криопротектора, моль/л	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Температура проведення сідінгу, °С	Кінцева температура етапу, °С	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Кінцева температура етапу, °С	Температурна зупинка, °С	Термін зупинки, хв..	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Кінцева температура заморожування, °С	Термін перекладки в кювету сек.	Середній термін переносу ампул сек.	Кількість непофарбованих клітин, %
19.	222	1	75	1,3	1,3	3,9	3,9	0,5	7,8	38,2	4,6	11,6	84,9	3	5	98
20.	140	1,8	50	0,4	0,5	3,5	3,5	0,3	7	30	3	10	80	5	3	96
21.	158	4,5	55	0,6	0,7	3,6	3,6	0,3	7,2	31,8	3,4	10,4	81,1	3	3	96
22.	240	1,8	80	1,4	1,5	4	4	0,5	8	40	5	12	86	4	5	98
23.	185	1,8	64	0,9	1	3,7	3,7	0,4	7,5	34,5	3,9	10,9	82,7	5	4	97
24.	231	1	77	1,45	1,4	4	4	0,5	7,9	39,1	4,8	11,8	85,5	4	5	98
25.	149	1	53	0,5	0,6	3,5	3,5	0,3	7,1	30,9	3,2	10,2	80,5	3	3	96
26.	167	1	58	0,7	0,8	3,6	3,6	0,4	7,3	32,7	3,5	10,5	81,6	4	4	97
27.	176	1,8	61	0,8	0,9	3,7	3,7	0,4	7,4	33,6	3,7	10,7	82,2	4	4	97
28.	213	1	72	1,2	1,2	3,9	3,9	0,4	7,7	37,3	4,5	11,5	84,4	5	4	97
29.	204	1,8	69	1,1	1,1	3,8	3,8	0,4	7,6	36,4	4,3	11,3	83,8	4	4	97
30.	195	1,8	66	1	1	3,8	3,8	0,4	7,5	35,5	4,1	11,1	83,3	4	4	97
31.	222	1	75	1,3	1,3	3,9	3,9	0,5	7,8	38,2	4,6	11,6	84,9	3	5	98
32.	140	1,8	50	0,4	0,5	3,5	3,5	0,3	7	30	3	10	80	5	3	96

Таблиця 2в

№ прикладу	Термін зберігання сировини, хв..	Обсяг ампули мл.	Обсяг заповнення ампул, %	Концентрація кріопротектора, моль/л	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Температура проведення сідінгу, °С	Кінцева температура етапу, °С	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Кінцева температура етапу, °С	Температурна зупинка, °С	Термін зупинки, хв..	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Кінцева температура заморожування, °С	Термін перекладки в кювету сек.	Середній термін переносу ампул сек.	Кількість непофарбованих клітин %
33.	167	1	58	0,7	0,8	3,6	3,6	0,4	7,3	32,7	3,5	10,5	81,6	4	4	97
34.	240	1,8	80	1,4	1,5	4	4	0,5	8	40	5	12	86	5	4	98
35.	213	4,5	72	1,2	1,2	3,9	3,9	0,4	7,7	37,3	4,5	11,5	84,4	4	5	97
36.	176	1,8	61	0,8	0,9	3,7	3,7	0,4	7,4	33,6	3,7	10,7	82,2	4	5	97
37.	195	1,8	66	1	1	3,8	3,8	0,4	7,5	35,5	4,1	11,1	83,3	4	4	97
38.	185	1	64	0,9	1	3,7	3,7	0,4	7,5	34,5	3,9	10,9	82,7	4	5	97
39.	158	1	55	0,6	0,7	3,6	3,6	0,3	7,2	31,8	3,4	10,4	81,1	3	4	96
40.	231	1	77	1,45	1,4	4	4	0,5	7,9	39,1	4,8	11,8	85,5	5	3	98
41.	222	1,8	75	1,3	1,3	3,9	3,9	0,5	7,8	38,2	4,6	11,6	84,9	5	3	98
42.	149	1	53	0,5	0,6	3,5	3,5	0,3	7,1	30,9	3,2	10,2	80,5	3	4	96
43.	140	1,8	50	0,4	0,5	3,5	3,5	0,3	7	30	3	10	80	3	4	96
44.	204	1,8	69	1,1	1,1	3,8	3,8	0,4	7,6	36,4	4,3	11,3	83,8	4	3	97
45.	167	1	58	0,7	0,8	3,6	3,6	0,4	7,3	32,7	3,5	10,5	81,6	4	4	97
46.	240	1,8	80	1,4	1,5	4	4	0,5	8	40	5	12	86	5	4	98

Таблиця 2г

№ прикладу	Термін зберігання сировини, хв..	Обсяг ампули мл.	Обсяг заповнення ампул, %	Концентрація кріопротектора, моль/л	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Температура проведення сідінгу, °С	Кінцева температура етапу, °С	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Кінцева температура етапу, °С	Температура зупинки, °С	Термін зупинки, хв..	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Кінцева температура заморожування, °С	Термін перекладки в кювету сек.	Середній термін переносу ампул сек.	Кількість непофарбованих клітин, %
47.	213	1	72	1,2	1,2	3,9	3,9	0,4	7,7	37,3	4,5	11,5	84,4	4	5	97
48.	176	1,8	61	0,8	0,9	3,7	3,7	0,4	7,4	33,6	3,7	10,7	82,2	4	4	97
49.	231	4,5	77	1,45	1,4	4	4	0,5	7,9	39,1	4,8	11,8	85,5	5	4	98
50.	240	1,8	80	1,4	1,5	4	4	0,5	8	40	5	12	86	5	3	98
51.	185	1,8	64	0,9	1	3,7	3,7	0,4	7,5	34,5	3,9	10,9	82,7	4	3	97
52.	222	1	75	1,3	1,3	3,9	3,9	0,5	7,8	38,2	4,6	11,6	84,9	5	4	98
53.	167	1	58	0,7	0,8	3,6	3,6	0,4	7,3	32,7	3,5	10,5	81,6	4	4	97
54.	140	1	50	0,4	0,5	3,5	3,5	0,3	7	30	3	10	80	3	5	96
55.	158	1,8	55	0,6	0,7	3,6	3,6	0,3	7,2	31,8	3,4	10,4	81,1	3	4	96
56.	204	1	69	1,1	1,1	3,8	3,8	0,4	7,6	36,4	4,3	11,3	83,8	4	4	97
57.	195	1,8	66	1	1	3,8	3,8	0,4	7,5	35,5	4,1	11,1	83,3	4	3	97
58.	149	1,8	53	0,5	0,6	3,5	3,5	0,3	7,1	30,9	3,2	10,2	80,5	3	5	96
59.	213	1	72	1,2	1,2	3,9	3,9	0,4	7,7	37,3	4,5	11,5	84,4	4	5	97
60.	176	1,8	61	0,8	0,9	3,7	3,7	0,4	7,4	33,6	3,7	10,7	82,2	4	4	97

Таблиця 2д

№ прикладу	Термін зберігання сировини, хв..	Обсяг ампули мл.	Обсяг заповнення ампул, %	Концентрація кріопротектора, моль/л	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Температура проведення сідінгу, °С	Кінцева температура етапу, °С	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Кінцева температура етапу, °С	Температурна зупинка, °С	Термін зупинки, хв..	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Кінцева температура заморожування, °С	Термін переладки в кювету сек.	Середній термін переносу ампул сек.	Кількість непофарбованих клітин %
61.	231	1	77	1,45	1,4	4	4	0,5	7,9	39,1	4,8	11,8	85,5	3	4	98
62.	185	1,8	64	0,9	1	3,7	3,7	0,4	7,5	34,5	3,9	10,9	82,7	5	4	97
63.	176	4,5	61	0,8	0,9	3,7	3,7	0,4	7,4	33,6	3,7	10,7	82,2	3	5	97
64.	140	1,8	50	0,4	0,5	3,5	3,5	0,3	7	30	3	10	80	4	3	96
65.	158	1,8	55	0,6	0,7	3,6	3,6	0,3	7,2	31,8	3,4	10,4	81,1	5	4	96
66.	195	1	66	1	1	3,8	3,8	0,4	7,5	35,5	4,1	11,1	83,3	4	3	97
67.	213	1	72	1,2	1,2	3,9	3,9	0,4	7,7	37,3	4,5	11,5	84,4	3	5	97
68.	240	1	80	1,4	1,5	4	4	0,5	8	40	5	12	86	4	3	98
69.	204	1,8	69	1,1	1,1	3,8	3,8	0,4	7,6	36,4	4,3	11,3	83,8	4	4	97
70.	167	1	58	0,7	0,8	3,6	3,6	0,4	7,3	32,7	3,5	10,5	81,6	5	4	97
71.	149	1,8	53	0,5	0,6	3,5	3,5	0,3	7,1	30,9	3,2	10,2	80,5	4	5	96
72.	222	1,8	75	1,3	1,3	3,9	3,9	0,5	7,8	38,2	4,6	11,6	84,9	4	4	98
73.	231	1	77	1,45	1,4	4	4	0,5	7,9	39,1	4,8	11,8	85,5	3	4	98
74.	185	1,8	64	0,9	1	3,7	3,7	0,4	7,5	34,5	3,9	10,9	82,7	5	4	97

Таблиця 2ж

№ прикладу	Термін зберігання сировини, хв..	Обсяг ампули мл.	Обсяг заповнення ампул, %	Концентрація кріопротектора, моль/л	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Температура проведення сідінгу, °С	Кінцева температура етапу, °С	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Кінцева температура етапу, °С	Температура зупинки, °С	Термін зупинки, хв..	Швидкість заморожування, °С/хвил.	Кінцева температура заморожування, °С	Термін переладки в кювету сек.	Середній термін переносу ампул сек.	Кількість непофарбованих клітин, %
75.	185	1	64	0,9	1	3,7	3,7	0,4	7,5	34,5	3,9	10,9	82,7	3	4	97
76.	204	1,8	69	1,1	1,1	3,8	3,8	0,4	7,6	36,4	4,3	11,3	83,8	5	4	97
77.	231	4,5	77	1,45	1,4	4	4	0,5	7,9	39,1	4,8	11,8	85,5	3	5	98
78.	158	1,8	55	0,6	0,7	3,6	3,6	0,3	7,2	31,8	3,4	10,4	81,1	4	3	96
79.	176	1,8	61	0,8	0,9	3,7	3,7	0,4	7,4	33,6	3,7	10,7	82,2	5	4	97
80.	140	1	50	0,4	0,5	3,5	3,5	0,3	7	30	3	10	80	4	3	96
81.	240	1	80	1,4	1,5	4	4	0,5	8	40	5	12	86	3	5	98
82.	149	1	53	0,5	0,6	3,5	3,5	0,3	7,1	30,9	3,2	10,2	80,5	4	3	96
83.	213	1,8	72	1,2	1,2	3,9	3,9	0,4	7,7	37,3	4,5	11,5	84,4	4	4	97
84.	195	1	66	1	1	3,8	3,8	0,4	7,5	35,5	4,1	11,1	83,3	5	4	97
85.	222	1,8	75	1,3	1,3	3,9	3,9	0,5	7,8	38,2	4,6	11,6	84,9	4	5	98
86.	167	1,8	58	0,7	0,8	3,6	3,6	0,4	7,3	32,7	3,5	10,5	81,6	4	4	97
87.	185	1	64	0,9	1	3,7	3,7	0,4	7,5	34,5	3,9	10,9	82,7	3	4	97
88.	204	1,8	69	1,1	1,1	3,8	3,8	0,4	7,6	36,4	4,3	11,3	83,8	5	4	97

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)
вул. Сім'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна
(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна
(044) 216 – 32 – 71