



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14589 (13) U
(51) МПК (2006)
F25D 17/00
A01N 1/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ РОБОТИ ЗАМОРОЖУВАЧА БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

1

(21) u200511619

(22) 06.12.2005

(24) 15.05.2006

(46) 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.

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

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

(57) 1. Спосіб роботи заморозувача біологічних об'єктів, у якому контейнери з біологічними об'єктами вставляють у змінну касету, змінну касету для контейнерів з біологічними об'єктами вставляють у пристрій ініціювання кристалоутворення, що містить трубку для пропускання рідкого азоту, із забезпеченням теплового контакту кожного контейнера із трубкою ініціатора кристалоутворення, по трубці ініціатора кристалоутворення протягом короткого періоду пропускають рідкий азот, за допомогою якого здійснюють дозоване охолодження точки теплового контакту кожного контейнера й

2

викликають у цій зоні ініціацію кристалоутворення, який **відрізняється** тим, що обмежують зону випару рідкого азоту в трубці шляхом створення гідравлічного опору руху рідкого азоту за межами зони контакту трубки ініціатора кристалоутворення з контейнерами.

2. Спосіб по п. 1, який **відрізняється** тим, що трубку ініціювання кристалоутворення піддають вібрації з частотою в межах 300-900 Гц.

3. Спосіб по п. 1, який **відрізняється** тим, що вібрацію починають через 3-5 сек. після подачі рідкого азоту в ініціатор кристалоутворення.

4. Спосіб по п. 1, який **відрізняється** тим, що вібрацію здійснюють періодичними імпульсами тривалістю 2-3 секунди.

5. Спосіб по п. 1, який **відрізняється** тим, що кількість імпульсів становить від 1 до 3-х.

6. Спосіб по п. 1, який **відрізняється** тим, що період між імпульсами становить 1-3 секунди.

7. Спосіб по п. 1, який **відрізняється** тим, що забезпечують площу зони контакту трубки ініціатора з поверхнею контейнера в межах 2-3 мм².

Корисна модель відноситься до холодильної техніки, а більш конкретно до засобів глибокого програмного заморожування різних живих біологічних об'єктів, наприклад, виділених з організму або культивованих у штучних умовах клітин, тканин і невеликих органів тварин і рослин, для наступного їхнього збереження при наднизьких температурах і забезпечення можливості регенерації після відтавання вихідних клітин і тканин.

Відомий спосіб криоконсервування [патент Росії №2144290, МПК А01N1/02, дата публікації 20.01.2000] який здійснюють шляхом поетапного заморожування в присутності криозахисного розчину, при якому суспензію клітин заливають у м'який одноразового використання контейнер до заповнення на 10-30%, розміщують у металевий пенал, забезпечують товщину шару суспензії 6-8мм, на першому етапі поміщають у рідкий холодоагент із температурою мінус 26-30°C і витримують 15-25 хвилин, на другому етапі поміщають у

сховище-холодильник з температурою мінус 40-50°C.

Внаслідок заморожування й відсутності ініціації кристалоутворення оброблюване середовище переохолоджується, що викликає лавиноподібний процес кристалоутворення, спочатку в міжклітинному просторі, а потім й усередині клітин. Швидка кристалізація, що відбувається при утворенні льоду в сильно переохолодженому розчині, може бути небезпечною для клітин і тканин. Якщо утворення льоду в міжклітинному просторі було ініційоване при високих ступенях переохолодження, різко збільшується ймовірність утворення льоду усередині клітин.

Це явище виникає з відсутності дегідратації клітин, які мають ядра, при високій швидкості заморожування, що приводить до підвищеного утримання внутрішньоклітинної води й, таким чином, до більш високої ймовірності утворення льоду в

(13) U

(11) 14589

(19) UA

клітині та ушкодження кристалами льоду клітинних мембран.

Спосіб передбачає здійснення процесу криоконсервування в умовах використання великого обсягу клітинного матеріалу в одному контейнері. Використання великого обсягу матеріалу підвищує ймовірність випадкової ініціалізації кристалоутворення. Також використання великого обсягу клітинного матеріалу в одному контейнері підвищує ймовірність бактеріального зараження клітинного матеріалу.

Незручно працювати з великими обсягами клітинного матеріалу. У більшості випадків немає в наявності цієї кількості суспензії.

Низька схоронність: спосіб забезпечує низьку схоронність морфологічної й функціональної повноцінності деконсервованих мієлокариоцитів і коммитованих клітин.

Внаслідок великого темпу охолодження здійснюється різке прискорення процесу кристалоутворення, пов'язане з зростом кристалів великого розміру що призводить до шкідливих наслідків для біологічних об'єктів тому, що різкий ріст кристалів призводить до пошкодження оболонок біологічних мембран.

Зменшення термінів температурної ініціації охолодження зменшує вплив цієї операції на весь основний режим охолодження, який за відсутності небажаного додаткового впливу забезпечує повільний ріст кристалів невеликого розміру які не призводять до пошкодження оболонок біологічних мембран.

Викладені проблеми частково вирішені в способі криоконсервування [Патент США №5,964,096, МПК C12M003/00, October 12, 1999 або RU2178865] який здійснюють шляхом поетапного заморожування в присутності криозахисного розчину, при якому суспензію клітин заливають в контейнер одноразового використання складної конструкції, у якому здійснюють ініціалізацію кристалоутворення шляхом внесення зародків льоду в позаклітинний простір, який заповнено криоконсервантом у перфузованій тканині, охолодження зазначеної перфузованої тканини, отриманої при операції, до криоконсервованого стану шляхом заморожування зазначеної тканини при невеликій швидкості заморожування до температури, що становить щонайменше приблизно -70°C.

Такий спосіб, як і попередній, прийнятний для більших обсягів клітинного матеріалу

Недоліком способу є його висока трудомісткість при роботі з більшими групами контейнерів малого обсягу, у які важко внести кристалики льоду. А в деяких випадках, при використанні як контейнерів - соломінок (трубок малого діаметра), наприклад при заморожуванні сперми, внести всередину трубки малого діаметру кристалик льоду досить проблематично.

Процес внесення кристаликів льоду в групу контейнерів малого об'єму забирає значний час, протягом якого припиняється й порушується процес охолодження. Збільшується тривалість усього процесу криоконсервування.

Додаткові операції по внесенню кристалів льоду підвищують ймовірність бактеріального зараження клітинного матеріалу.

Відомий спосіб [патент СРСР №1522005, МПК F25D3/10, 1988], у якому замість кристаликів льоду передбачається застосування в кожному контейнері для зберігання біологічного матеріалу зони, яка містить проміжний теплоносій, що ініціює процес кристалоутворення. Зона, яка містить проміжний теплоносій, перебуває в тепловому контакті із середовищем, що підлягає криоконсервуванню. Спосіб роботи заморозувача живих біологічних об'єктів у контейнерах передбачає застосування теплоізовованого корпусу з каналом для введення холодоагенту, каналами для виведення холодоагенту, послідовну установку у корпусі змінних касет для контейнерів з біооб'єктом таким чином, щоб трубопровід пристрою ініціювання кристалізації перебував у тепловому контакті із зоною розміщення проміжного теплоносія. Ініціацію кристалоутворення здійснюють шляхом пропущення рідкого азоту по додатковому трубопроводі ініціації кристалоутворення. Рідкий азот, що проходить по трубопроводу, охолоджує проміжний теплоносій у кожному контейнері, а проміжний теплоносій у свою чергу охолоджує об'єкт, охолоджує контактуючий з ним біооб'єкт.

Використання елемента із проміжним теплоносієм у такому способі частково вирішує проблеми нестабільного теплообміну між додатковим теплопроводом і середою що заморозується, за рахунок забезпечення необхідної кількості й рівня охолодження проміжного теплоносія.

При використанні такого способу заморожування витрачається багато холодоагенту й часу на завантаження й вивантаження контейнерів з біооб'єктом, тому що кожний контейнер з біооб'єктом завантажуються й вивантажуються послідовно один за іншим. Почерговий процес знімання й перенос контейнерів з камери в нестандартних судин і соломінок вимагає повної переробки криозаморозувача.

Недоліки даного способу:

Ініціювання кристалізації в цій камері здійснюється складною системою з водною фазою в гелі, що вимагає великої кількості рідкого азоту, що йде в атмосферу.

Використання проміжного теплоносія істотно впливає на процес і швидкість охолодження й продовжує процес заморожування.

Відомий спосіб, у якому ініціювання кристалоутворення здійснюється шляхом захолювання (занурення в азот на кілька секунд) металевого стрижня, вставленого всередину контейнера, в якому заморозується об'єкт [А.С. СРСР №1402781, МПК F25D3/00, дата публікації 15.06.1988 г].

Недоліком зазначеного способу є те, що металевий стрижень не може бути закріплений герметично в днищі контейнера, у результаті чого відбувається його розгерметизація й порушення стерильності матеріалу. Крім того, така конструкція контейнера ускладнює зберігання матеріалу в низькотемпературному банку, штирі, що стирчать, збільшують висоту контейнера й для зберігання потрібні ячейки більшого обсягу, що зменшує кіль-

кість зразків, які можуть бути розміщені в одне сховище.

Спосіб роботи заморозувача біологічних об'єктів [патент СРСР №1097875, МПК F25D3/10, дата публікації 1984.02.18] у якому контейнери з біооб'єктами вставляють у змінну касету, у вигляді кювети з виїмками для контейнерів з біооб'єктами, контейнери з біооб'єктами вставляють у виїмки кювети, із забезпеченням герметичного контакту між стінками контейнерів і поверхнею виїмок, кювету вставляють у пристрій ініціювання кристалізації, по трубці, на дно кювети наливають рідкий азот, який завдяки конструкції пристрою подають на верхню частину поверхні контейнерів, частина поверхні контейнерів заливається рідким азотом, що, охолоджуючи частину поверхні контейнера різко охолоджує біооб'єкт, викликаючи в цій зоні ініціалізацію кристалоутворення. Після контакту з поверхнею контейнера рідкий азот самопливом зливається із зони заморожування.

Недоліки способу:

При заморожуванні клітинних суспензій з низькою ($0,5-2^{\circ}/\text{хв}$) швидкістю клітини осаджуються на дно контейнера, виникнення кристала у верхній частині контейнера приведе до виморожування води й виникнення в нижній частині контейнера в місці скупчення клітин підвищеної концентрації солей і криопротектора, що викличе загибель клітин.

Відомий спосіб роботи заморозувача біологічних об'єктів [патент Росії №2149313, МПК F25D3/10, дата публікації 2000.05.20] у якому контейнери з біооб'єктами вставляють у змінну касету, змінну касету для контейнерів з біооб'єктом вставляють у пристрій ініціювання кристалізації, по трубці у пристрій вводять рідкий азот, який завдяки конструкції пристрою подають на нижню частину поверхні контейнерів, частина поверхні контейнерів заливається рідким азотом, що, охолоджуючи частину поверхні контейнера, різко охолоджує в цій зоні біооб'єкт, викликаючи ініціалізацію кристалоутворення.

У зазначених способах забезпечується стабільний теплообмін між середовищем, яке ініціює заморожування й середовищем, що заморожується. Однак, у зв'язку з великою поверхнею безпосереднього контакту рідкого азоту з контейнером із біооб'єктом, що заморожується, більшим обсягом рідкого азоту в кюветі або в заморозувачі, а також неможливістю швидкого зливу рідкого азоту відбувається надмірне переохолодження контейнера з біооб'єктом, що крім ініціації процесу кристалоутворення істотно переохолоджує середовище в контейнері, що викликає порушення темпів охолодження біооб'єкта, невизначеним образом збільшує темп охолодження, що погіршує життєздатність охолоджуваного біооб'єкта.

Крім цього безпосередній контакт рідкого азоту з контейнером погіршує умови забезпечення стерильності, оскільки рідкий азот, у процесі одержання й при протіканні по різних технологічних зонах його використання не забезпечує придушення бактеріальної мікрофлори, а лише заморожує її у наслідок залишає в замороженому стані на поверхні контейнерів, при цьому при розморожуванні контейнера ця мікрофлора стає біологічно

активною й може здійснити бактеріальне зараження середовища в контейнері.

Спосіб роботи заморозувача біологічних об'єктів [Авторське свідоцтво СРСР №1440137, МПК F25D3/10, 1987] у якому контейнери з біооб'єктами вставляють у змінну касету, змінну касету для контейнерів з біооб'єктами вставляють у пристрій ініціювання кристалізації, по трубці, у пристрій вводять рідкий азот, що завдяки контакту кожного з контейнерів із цією трубкою, через яку короткий період пропускають рідкий азот, здійснюється крапкове охолодження кожного контейнера, що викликає в цій зоні ініціалізацію кристалоутворення.

Недоліком такого способу роботи заморозувача біологічних об'єктів є те, що при проходженні рідкого азоту через охолоджувальну трубку він скидається в атмосферу і внаслідок цього по всій довжині охолоджувальної трубки розповсюджується перепад тиску між тиском у посуді з рідким азотом, з якого він подається, та атмосферним тиском. Внаслідок зниження тиску по трубці в окремих її зонах відбувається випарювання рідкого азоту й надалі по трубці йде суміш пара і рідини. Оскільки крапки кипіння азоту й зони контакту газової фази з поверхнею трубки в зоні контакту з контейнером з біооб'єктом неможливо передбачити, відбувається різний рівень охолодження різних контейнерів. Для одних контейнерів цей рівень охолодження виявляється достатнім для утворення початкових кристалів. Для інших він виявляється недостатнім і процес кріоконсервації порушується, що призводить до низького рівню схоронності біооб'єктів.

Внаслідок того, що рідкий азот, що прокачується через охолоджувальну трубку, скидається в атмосферу по всій довжині охолоджувальної трубки розповсюджується перепад тиску між тиском у посуді з рідким азотом, з якого він подається та атмосферним тиском. Внаслідок складного профілю охолоджувальної трубки, що має велику кількість вигинів, при прокачуванні через неї рідкого азоту його тиск на окремих ділянках падає нерівномірно. Мають місце окремі ділянки кипіння цього зрідженого газу. На ділянках скіпання, внаслідок наявності газоподібної фази, різко зменшується коефіцієнт теплопередачі й відповідно інтенсивність охолодження стінки трубки, що призводить до нерівномірного охолодження контейнеру з рідиною яка контактує з цією трубкою й у якій ініціюється процес кристалізації. Внаслідок цього в частині контейнерів не забезпечується ініціалізація кристалоутворення. Намагання подолати цю проблему шляхом подовження процесу прокачування рідкого азоту призводить до шкідливого переохолодження контейнера з рідиною в якій вже відбувся процес ініціалізації кристалоутворення й додаткове переохолодження веде до порушенню процесу заморожування, що призводить до руйнації біологічних об'єктів в охолоджувальній рідині.

Завданням корисної моделі є створення способу роботи заморозувача біологічних об'єктів, у якому за рахунок застосування нових дій границь у руслі їхнього застосування забезпечується гарантоване ініціювання кристалоутворення в кожному контейнері з біооб'єктом.

Для вирішення цього завдання спосіб роботи заморозувача біологічних об'єктів передбачає

вставку контейнерів з біологічними об'єктами у змінну касету, змінну касету для контейнерів з біологічними об'єктами вставляють у пристрій ініціювання кристалоутворення, що містить трубку для пропуску рідкого азоту, із забезпеченням теплового контакту кожного контейнера із трубкою ініціатора кристалоутворення, по трубці ініціатора кристалоутворення протягом короткого періоду пропускають рідкий азот, за допомогою якого здійснюють дозоване охолодження крапки теплового контакту кожного контейнера й викликають у цій зоні ініціацію кристалоутворення.

Новим у способі є те, що обмежують зону випару рідкого азоту в трубці шляхом створення гідравлічного опору руху рідкого азоту за межами зони контакту трубки ініціатора кристалоутворення з контейнерами.

Внаслідок цього основний перепад тиску переміщується з зони розміщення контейнерів з розчинами з біологічним об'єктом (рідиною) на кінцеву ділянку трубки через яку прокачують рідкий азот і відповідно зона кипіння гарантовано переноситься в зону розміщення елемента що забезпечує зазначений гідравлічний опір. Відсутність ділянок скипання в зоні контакту охолоджувальної трубки ініціатора кристалоутворення з контейнером з біологічним об'єктом в якому ініціюється кристалоутворення забезпечує однакові умови теплопередачі в точці охолодження для всіх контейнерів. Забезпечення однакових умов теплопередачі дозволяє зменшити термін процесу охолодження для ініціалізації кристалоутворення до мінімально достатнього для цього інтервалу.

Відсутність гарантованого ініціювання процесу кристалоутворення конкретно в кожному контейнері неприпустимо для біологічного матеріалу, що є унікальним, і може бути отриманий тільки раз у житті (наприклад аутологічна кордова кров при народженні дитини), від схоронності якої часом залежить життя людини (трансплантація криоконсервованих стовбурних клітин після високодозового опромінення онкологічних хворих).

В окремих варіантах реалізації Способу роботи заморожувача біологічних об'єктів трубку ініціювання кристалоутворення піддають вібрації з частотою в межах 300-900Гц.

Внаслідок цих дій підвищується рівномірність кристалоутворення у всіх контейнерах, що контактують з трубкою ініціювання кристалоутворення.

В окремих варіантах реалізації Способу роботи заморожувача біологічних об'єктів вібрацію починають через 3-5сек. після подачі рідкого азоту в трубку ініціатора кристалоутворення.

Внаслідок цього вібраційний вплив здійснюється в період, коли рідина у зоні теплового контакту достатньо охолодилася для забезпечення процесу кристалізації.

В окремих варіантах реалізації Способу роботи заморожувача біологічних об'єктів вібрацію здійснюють періодичними імпульсами тривалістю 2-3 секунди.

Внаслідок застосування цих ознак зменшується вібраційний вплив на біологічні об'єкти, що заморожуються.

В окремих варіантах реалізації Способу роботи заморожувача біологічних об'єктів кількість імпульсів становить від 1 до 3-х.

Внаслідок застосування цих ознак додатково зменшується вібраційний вплив на біологічні об'єкти, що заморожуються.

В окремих варіантах реалізації Способу роботи заморожувача біологічних об'єктів період, між імпульсами становить 1-3 секунди.

Внаслідок застосування цих ознак мінімізується вібраційний вплив на біологічні об'єкти, що заморожуються.

В окремих варіантах реалізації Способу роботи заморожувача біологічних об'єктів забезпечують площу зони контакту трубки ініціатора з поверхнею контейнера в межах 2-3мм².

Внаслідок емпіричного підбору оптимального інтервалу площі теплового контакту тепловий вплив цього процесу обмежується ініціюванням кристалоутворення і не впливає на наступні теплові режими процесу замороження.

Спосіб роботи заморожувача біологічних об'єктів перевіряли на прикладах використання при заморожуванні стовбурових гемопоетичних клітин кордової (пуповинної) крові як з застосуванням пропонованого способу, так і з застосуванням відомих рішень.

На Фіг.1 наведена Схема пристрою заморожувача на якому здійснювали запропонований спосіб. В Таблиці 1. наведено приклади дослідження залежності кількості життєздатності кліток-попередників гемопоезу від величини переохолодження при заморожуванні у відомих рішеннях без ініціації кристалоутворення (сидінгу), в Таблиці 2 приклади дослідження залежності життєздатності кліток від температури переохолодження при сидінгу кристалоутворення за допомогою трубки у відомих рішеннях, а в Таблиці 3 приклади режимів роботи заморожувача біологічних об'єктів за способом.

На схемі пристрою заморожувача Фіг.1. на якому здійснювали приклади виконання запропонований спосіб (відповідно до Таблиці 3) зображено камеру охолодження 1 програмного заморожувача в якій вмонтовані три паралельні трубки (ініціації кристалоутворення або сидінгу) 2, з'єднані в спільний вхід і вихід. До спільного входу приєднано також трубку 3 забезпечення охолодження камери, яка за допомогою вентилятора 4 забезпечує рівномірність припливу охолодженого повітря в камеру 1. Спільний вхід зазначених трубок з'єднано за допомогою трубки 5 з сосудом Дюару 6 з якого подається зріджений азот по трубках 2 та 3 до камери заморожувача. За межами камери на виході трубок 2 та 3 встановлюються Клапани 7 і 8 які керуються програмою, що контролює температуру в камері 1 заморожувача та ініціює кристалоутворення. На трубці 2 поза межами камери 1 додатково встановлено пристрій 9, що створює необхідний рівень гідравлічного опору рухові рідкого азоту. До поверхні трубки 2 також приєднано прилад 10, що здійснює подачу механічних коливань на трубки, які ініціюють процес кристалізації. Всередині камери розміщено Контейнери 11 із клітинами які заморожуються.

Процес охолодження здійснюється таким чином. З сосуду Дьюара 6 по трубках 5, 3 та 2 подається зріджений азот, за допомогою якого забезпечуються теплові умови охолодження. В камеру охолодження 1 встановлюється касета з контейнерами 11 з клітинами таким чином, щоби забезпечувався контакт поверхні кожного контейнера з поверхнею трубки 2. Щільність контакту та певну його площу забезпечували за допомогою додаткового важеля під впливом якого створювався щільний контакт поверхні поліетиленової контейнера із трубкою 2. У місці контакту контейнерів із трубкою на трубці робили невеликі заглибини розміром 1,5×2,0мм шляхом випилювання металу на глибину 0,2мм. Площу контакту визначували нанесенням барвника на трубку в зоні контакту й по площі фарбування ампули цим барвником визначали площу контакту в прикладі. Після попереднього охолодження відповідно до прикладу здійснювали ініціювання кристалоутворення (сідінг) поданням рідкого азоту у трубку 2 та подачею механічних коливань на трубку за допомогою пристрою 10. Механічні коливання створювали забезпечуючи механічний контакт трубки через проміжний елемент (тягу) з мембраною електродинаміка (потужність 250 міліватів). Частоту коливань його мембрани формували за допомогою сигнал генератора

й подавали сигнал його на обмотку електродинаміка через програмне реле часу. Контроль за процесом заморожування робили за допомогою термопари, встановленої в одному з контейнерів. Життєздатність клітин визначали шляхом культивування розморожених клітин у двошаровому агаровому середовищі. Відсоток підраховували стосовно контролю (його приймали за 100%), контролем слугували клітини до заморожування, що утворили в культурі колонії на 10 добу культивування.

Розморожування клітин виконували у водняній лазні (+37-+40°C) до появи рідкої фази в контейнері. Розморожені клітини культивували у двошаровому агаровому середовищі протягом 10 днів. [Грищенко В.Й., Лобынцева Г.З, Вотякова І.А., Шерешков С.І. Гемопоетичні клітини ембріональної печінки (Ембриогенез, трансплантація, криоконсервирование)//Київ. Наукова думка. -1987.- 225 с.].

Додатково до запропонованого проводили дослідження залежності кількості життєздатності кліток-попередників гемопоезу від величини переохолодження при заморожуванні у відомих рішеннях без ініціації кристалоутворення (сидингу), приклади яких наведено в Таблиці 1.

Таблиця 1.

Залежність кількості життєздатності кліток-попередників гемопоезу від величини переохолодження при заморожуванні без сидингу

Контейнери	Температура, °C		Тривалість сидингу	Температура кристалоутворення, °C	Величина переохолодження, °C	Кінцева температура, °C	Життєздатність	
	У камері	У зразку					КОЕ-ГМ на 10 ⁵ клітин в агарі	%
№1	-7	-2,2	-	-2,2	0	-196	135	98
№2	-10	-4,8	-	-2,2	2,6	-196	3	2,2
№3	-12	-7,0	-	-2,4	4,6	-196	9	6,5
№4	-13	-8,0	-	-2,4	5,6	-196	7	5,1
№5	-11	-7	-	2,4	4,6	-196	8	5,8
№6	-14	-9,0	-	-2,4	7,6	-196	3	2,2
№7	-8	-3,0	-	-2,4	0,4	-196	11	8,0
№8	-16	-11,0	-	-2,4	8,6	-196	9	6,5
№9	-13	-8,0	-	-2,4	5,6	-196	7	5,1
Контроль							137	100

Як видно з отриманих результатів, якщо заморожування відбувається без ініціювання, переохолодження досягає величини 3-8,6°C, у результаті чого виділяється схована теплота кристалоутворення, що приводить до загибелі клітин.

Життєздатність колонієформуючих одиниць стовбурних кровотворних клітин дуже сильно залежить від температури переохолодження при заморожуванні без ініціювання процесу кристалоутворення. При величині переохолодження порядку 8,6°C життєздатність клітин становить 6,5% стосовно контролю. Якщо заморожування відбувається без ініціювання, виникає неконтрольований процес переохолодження порядку 3-8,6°C, у результаті

чого виділяється схована теплота кристалоутворення, що приводить до загибелі клітин.

В наступній групі прикладів при проведенні процесу охолодження стовбурних кровотворних клітин кордової крові з 5% змістом криопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) зі швидкістю 1°C за 1хв. для виключення переохолодження ініціювання кристалізації здійснювали з допомогою встановленої в камері заморожування вигнутої трубки діаметром 0,5см, по якій при температурі кристалізації -2,8°C (установленої експериментальним шляхом для 5% розчину ДМСО із суспензією клітин) подавали автоматично рідкий азот із судини Дьюара, відповідно до закладеної в комп'ютер

програми заморожування. Оптимальний режим наступного процесу заморожування кровотворних клітин людини загальновідомий і був розроблений раніше з урахуванням обов'язкового ініціювання

процесу кристалізації [патент Росії №2233589]. У кожному контейнері із клітинами перебувала термopapa, по якій реєстрували й записували на термограмі протікання процесу заморожування.

Таблиця 2

Залежність життєздатності кліток від температури переохолодження при сидингу кристалоутворення за допомогою трубки

Контейнери	Температура, °C		Тривалість сидингу, сек.	Температура, °C		Величина переохолодження °C	Кінцева температура °C	КОЕ-ГМ на 10 ⁵ клітин в агарі	%
	в камері °C	в об'ємній частині °C		Мінімальна після сидингу	Кристалоутворення				
№1	-6,9	-2,0	30	-2,1	-1,8	0,3	-196°C	108	95
№2	-6,9	-1,9	30	-2,4	-1,9	0,5	-196°C	110	96
№3	-6,9	-1,6	30	-1,8	-4,0	2,0	-196°C	58	51
№4	-6,5	-2,0	30	-2,4	-2,4	0	-196°C	112	98
№6	-6,9	-2,0	25	-2,7	-2,4	0,3	-196°C	110	96
№7	-6,6	-1,5	25	-2,4	-2,0	0,4	-196°C	108	95
№8	-6,7	-1,9	25	-2,2	-1,9	0,3	-196°C	112	98
№9	-6,7	-2,0	30	-1,6	-5,8	3,8	-196°C	42	37
Контроль								114	100

При ініціюванні процесу кристалоутворення за допомогою трубки (табл.2), відповідно до прототипу, процес зародження кристалів льоду відбувається в кожному контейнері із клітинами по-різному: при переохолодженні порядку 0-0,5°C (контейнери №1, 2, 4, 5, 6, 7, 8) життєздатність клітин висока (98-95%), у контейнерах, де виникають потоки, що описані вище, в місці контакту не відбувається зародження кристалів льоду, виникає переохолодження й, як наслідок, - загибель майже 50-60% клітин (контейнери №3 і №9).

В Таблиці 3 наведені Приклади 1, 2 ілюструють кріоконсервування гемопоетичних клітин пуповинної крові яку здійснювали без застосування способу роботи заморожувача, приклади 3-21 - кріоконсервування гемопоетичних клітин пуповинної крові здійснювали з застосуванням пропонованого способу роботи заморожувача.

У Прикладах 1, 2 Таблиці 3 кріоконсервування гемопоетичних клітин пуповинної крові здійснюва-

ли в кріотубах об'ємом 1,8 мол (Nunc Cryoline System) до температури -80°C відповідно до розробленому нами режиму з виключенням режиму ініціації кристалоутворення (сидингу) [Патент України № 49759].

Заморожування здійснювали на програмному заморожувачі, що дозволяє виконати заданий режим кріоконсервування. У кожному контейнері із клітками була термopapa, по якій реєстрували й записували на термограмі протікання процесу заморожування.

При здійсненні процесу охолодження кровотворних кліток кордової крові за способом, що заявляється (прикладі 3-21, Таблиці 3), замороження здійснювалося в теплообмінній камері програмного заморожувача, переустаткованої додатковими пристроями (Фіг.1), що забезпечують виконання режимних умов впливу, наведених у Таблиці 3.

Таблиця 3

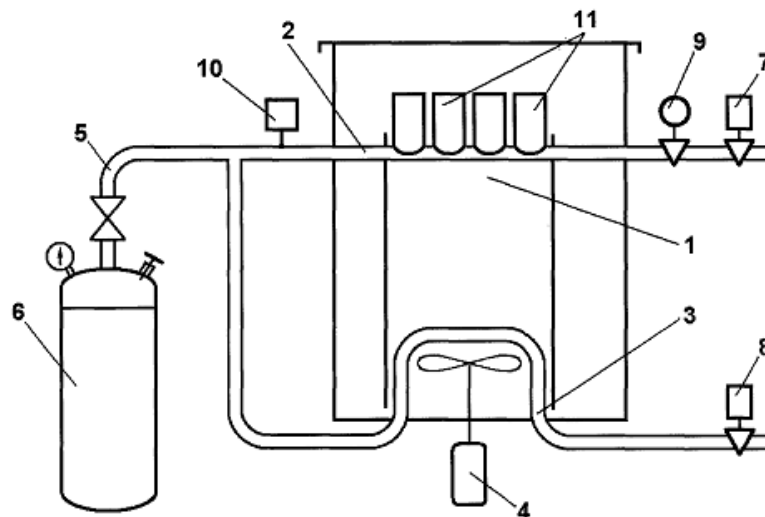
№	Тривалість процесу ініціації	Частота вібрації	Початок вібрації	Кількість імпульсів	Період імпульсів	Період проміжків	Поверхня контакту	Життєздатність клітин	
								КОЕ-ГМ на 10 ⁵	%
1.	35	-	-		-	-	-	9	6,5
2.	30	-	-		-	-	-	7	5,1
3.	25	300	3	1	2	1	2	108	95
4.	23	600	4	2	3	2	2,5	110	96
5.	20	900	5	3	2,5	3	3	105	93
6.	25	300	5	1	3	1	2	112	98
7.	23	600	4	2	2	2	2,5	110	96
8.	20	900	3	3	2,5	3	3	108	95
9.	25	300	4	1	3	1	2	112	98
10.	23	600	5	2	2	2	2,5	108	95
11.	20	900	3	3	2,5	3	3	110	96
12.	25	300	4	1	3	1	2	100	91

Продовження таблиці 3

№	Тривалість процесу ініціації	Частота вібрації	Початок вібрації	Кількість імпульсів	Період імпульсів	Період проміжків	Поверхня контакту	Життєздатність клітин	
								КОЕ-ГМ на 10^5	%
13.	23	450	5	2	2	2	2,5	112	98
14.	20	900	3	3	2,5	3	3	110	96
15.	25	300	4	1	3	1	2	108	95
16.	23	700	5	2	2	2	2,5	112	98
17.	20	900	3	3	2	3	3	112	98
18.	25	300	4	1	2,5	1	2	110	96
19.	23	700	5	2	2	2	2,5	108	95
20.	20	900	3	3	2,5	3	3	112	98
21.	25	300	4	1	3	1	2	108	95

Як видно з наведених у Таблиці 3 даних, життєздатність клітин у всіх контейнерах була високою (від 91 до 98%), у той час, як при заморожуванні з виключеними пристосуваннями ініціації процесу кристалоутворення - становила 5-6% (приклад 1, 2).

Таким чином, з наведених у таблиці даних видно, що обрані експериментальні режими способу роботи заморозувача дозволяють одержати стабільне ініціювання кристалоутворення, що забезпечує високий відсоток життєздатності гемопоетичних клітин у кожному контейнері, включеному в цикл заморожування.



Фіг. 1