



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 33816

(13) A

(51) 6 A61D19/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ МОНОЗИГОТНИХ ТВАРИН

(21) 99042015

(22) 09.04.1999

(24) 15.02.2001

(33) UA

(46) 15.02.2001, Бюл. № 1, 2001 р.

(72) Зубець Михайло Васильович, Путятін Валерій
Петрович, Мегель Юрій Євгенович, Левкін Артур
Володимирович(73) Харківський державний технічний університет
сільського господарства(57) Спосіб одержання монозиготних тварин мето-
дом лазерного ділення ранніх ембріонів, який
включає установку фокусної відстані, візуального

поєднання променя лазера з зародком. Імпульсну дію на зародок з заданою частотою і тривалістю, візуальний контроль ділення, який **відрізняється** тим, що установку фокусної відстані проводять шляхом визначення максимальної температури на приймальному елементі при проходженні через нього променя лазера, зародок візуально поєднують з віссю лазерного променя в зоні максимальної температури, причому приймальний елемент виконано в вигляді однієї або двох взаємноперпендикулярних дифракційних решіток, відстань між провідниками в яких перевищує їх діаметр і довжину хвилі.

Винахід відноситься до області тваринництва, переважно штучного запліднення великої рогатої худоби і може бути застосований при одержанні однойцевих близнюків шляхом подрібнення зародку.

В сучасній технології штучного запліднення великої рогатої худоби застосовуються зародки на стадії ембріонального розвитку.

Відомо технічне рішення [Угорщина, патент № 191957, кл. A61 D 1/00, 1988. Спосіб получения однойцовых близнецов путем дробления зародыша], направлене на одержання монозиготних тварин методом лазерного ділення зародку. Лазерний промінь фокусують на поверхні зародку і, частково розкриваючи зону пеллюциду зародку, знищують частину клітин, які знаходяться в зародку.

Недоліком вказаного винаходу є неточність фокусування променю лазера, внаслідок чого значно страждає зародкова клітина, отримуючи опіки по великій поверхні.

Найбільш близький до винаходу, який пропонується, є спосіб одержання монозиготних тварин [Журнал "Вісник аграрної науки", 1992, № 11. Зубець М.В., Мегель Ю.Е. Получение монозиготных животных методом лазерного деления ранних эмбрионов, стор.33-363 методом лазерного ділення ранніх ембріонів, який полягав в установці фокусної відстані, візуальному поєднанні променя лазера з зародком, імпульсній дії на зародок із заданою частотою і тривалістю, візуальному контролю ділення.

Вказаний спосіб дозволяє забезпечити більш точне фокусування променя лазера завдяки чому

зменшується ступінь травмування ділимих зародків. Але для проведення операції ділення необхідна кваліфікація спеціаліста що є суб'єктивним фактором, впливаючим на якість ділення. Спосіб не дозволяє механізувати процес ділення і підвищити ступінь точності фокусування променя лазера.

В основу винаходу поставлена мета підвищення точності фокусування променя лазера і як наслідок зменшення травмованості ділимих зародків.

Поставлена мета досягається тим, що в способі одержання монозиготних тварин методом лазерного ділення ранніх ембріонів, які містять установку фокусної відстані, візуальне поєднання лазера із зародком, імпульсна дія на зародок з заданою частотою і тривалістю, і візуальний контроль ділення, установку фокусної відстані виконують шляхом визначення максимальної температури на приймальному елементі, при проходженні через нього променя лазера, візуальне поєднання зародку з віссю променя лазера проводять у зоні максимальної температури. Приймальний елемент виконано у вигляді однієї або двох взаємноперпендикулярних дифракційних решіток, відстань між провідниками в яких перевищує їх діаметр і довжину хвилі.

Сутність винаходу пояснюється кресленням, де на фігурі показана схема установки для здійснення способу.

Суть запропонованого способу пояснюється схемою вивіреного мосту [фіг.] з приймальним елементом 1, індикатором розбалансу мосту 2, опорами мосту 3, установкою балансу мосту 4 і джерелом живлення 5.

(19) UA (11) 33816 (13) A

В місце фокусування за допомогою оптичної системи [див. журнал "Вісник аграрної науки", 1992, № 11 стор. 33-36] лазерного випромінювання розташовують приймальний елемент, який складається з однієї або двох взаємоперпендикулярних, рідких дифракційних решіток. Вона натягнута на діелектричний [наприклад, текстолітовий] каркас з отвором в середині діелектрика для проходження променя лазера. При цьому для усунення повних втрат випромінювання лазера, які складаються з втрат на відбиття, поглинення в елементах решітки і дифракцію, використовуються дві взаємоперпендикулярні рідкі решітки, в яких період значно більший за діаметр проволочки. Виходячи з цього вказані втрати не перевищують вели-

чини $\frac{4d}{\chi}$, де d – діаметр проволочки, χ – період решіток.

Наявність двох взаємоперпендикулярних решіток необхідно для усунення залежності показів приладу від напрямку поляризації випромінювання.

При проходженні променя лазера через приймальний елемент підвищується температура його решіток, приводячи до розбалансу моста [фіг]. Критична густина $\rho_{кр}$, яка призводить до плавлення проволочки

$$\rho_{кр} \approx \frac{\gamma T_{пл}}{d \varepsilon_{\max}},$$

де γ – коефіцієнт теплообміну одиниці довжини проволочки з навколишнім середовищем;

$T_{пл}$ – температура плавлення матеріалу проволочки;

ε_{\max} – найбільша величина з ε_{\parallel} та ε_{\perp} [ε – коефіцієнт, залежний від поглинених властивостей матеріалу проволочки і поляризації випромінювання]. З цього виразу видно, що $\rho_{кр}$ можна збільшити за рахунок зменшення діаметра [d] використovanого проволочки.

Матеріали, які використовуються: платина, золото, нікель. Приймальний елемент розміщують на дистанційно керований столик, переміщуючи який у вертикальному напрямку в межах передбачуваного розміщення перетяжки сфокусованого лазерного променя, знаходять за найбільшим відхиленням показників індикатора розбалансу мосту 2 найбільшу температуру проволочки, а значить найбільшу густину потужності випромінювання лазера, що дає положення з точністю до одиниць мікрон фокусної плями випромінювання.

Далі, зафіксувавши положення столика, на місце приймального елемента, виходячи з відношення геометричних розмірів приймального елемента і канюлі з зародком, розміщують останню на місце приймального елемента таким чином, що розташування верхньої дифракційної решітки приймального елемента співпадало з розташуванням верхньої оболонки зародку. Сполучають зародок з віссю лазерного променя і проводять процес ділення, контролюючи його на екрані монітора через ослаблюючий світлофільтр.

Морфологічна оцінка проводиться під мікроскопом і дозволяє визначити число життєспроможних половинок ембріона.

Спосіб реалізується на установці для лазерного ділення ембріонів великої рогатої худоби,

описаний в ж. "Вісник аграрної науки", 1992, № 11 - стор.33-36, що використовує неперервний аргон-овий лазер ЛГН-502, характеристики якого - забезпечують необхідну потужність випромінювання [2Вт], потрібну для ділення зародку.

Поділ зародку доцільно проводити на стадії морули або ранньої бластоцисти, коли він має розмір 0,14-0,17 мм, а число клітин в оболонці досягає значення 32-130. Зародок розташовують в прозорій канюлі з внутрішніми розмірами 0,2x4x50 мм разом з живлячим середовищем. Передбачуване розміщення перетяжки сфокусованого лазерного променя – 4,5-5,5 мм від фокусуючої лінзи.

Розглянемо приклади реалізації способу.

У прикладі 1 приймальний елемент виконується з платинової проволочки діаметром 3,8 мкм. Одинарна решітка розміщується на текстолітовій пластинці товщиною 8 мм. Для кожного проволочного елемента є електроди. Період решітки $\chi = 1$ мм, довжина кожного проволочного елемента 27 мм та загальна кількість елементів 10 шт. У центрі текстолітової підкладки є круглий отвір діаметром 25 мм для проходження променя лазера. Всі елементи ввімкнуті послідовно з загальним початковим опором 800 Ом. Приймальний елемент розміщується у металевому корпусі і з'єднується з мостовою вимірювальною схемою екранованим кабелем.

Перед експериментом проводиться установка балансу моста за показниками індикатора 2.

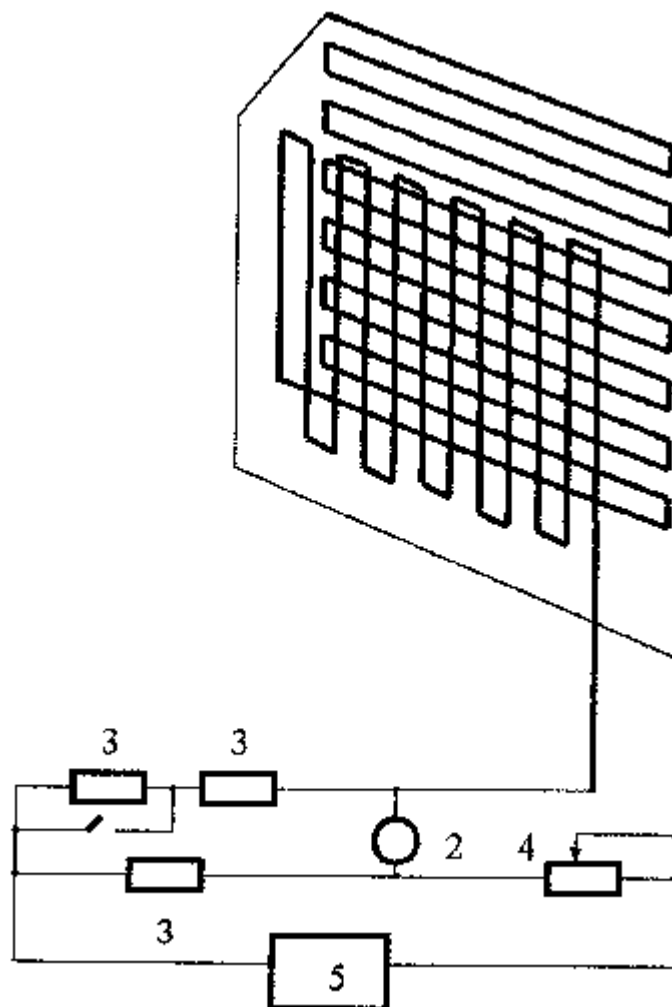
У прикладі 2 приймальний елемент виконується з платинової проволочки діаметром 3,8 мкм. Подвійна решітка натягнута на текстолітовий каркас, в якому для кожного проволочного елемента є електроди. З кожної сторони каркаса розміщені одинарні взаємоперпендикулярні решітки з періодом $\chi=1$ мм, довжиною кожного проволочного елемента 27 мм та загальною кількістю елементів 20 шт. Відстань між решітками складає 8 мм. У центрі текстолітового каркаса є круглий отвір діаметром 25 мм для проходження лазерного променя. Всі елементи решітки ввімкнені послідовно з загальним початковим опором 800 Ом. Приймальний елемент розміщується у металевому корпусі і з'єднується з мостовою вимірювальною схемою екранованим кабелем. Перед експериментом проводиться установка балансу моста по показам індикатора 2.

У прикладі 3 приймальний елемент виконується з платинової проволочки діаметром 3,8 мкм. Подвійна решітка натягнута на текстолітовий каркас, в якому для кожного проволочного елемента є електроди. З кожної сторони каркаса розміщені одинарні взаємоперпендикулярні решітки з періодом $\chi=1$ мм, довжиною кожного проволочного елемента 27 мм і загальною кількістю елементів 20 шт. Відстань між решітками складає 8 мм. У центрі текстолітового каркаса є круглий отвір діаметром 25 мм для проходження лазерного променя. Всі елементи решітки ввімкнені послідовно з загальним початковим опором 800 Ом. Приймальний елемент розміщується у металевому корпусі і з'єднується з мостовою вимірювальною схемою екранованим кабелем. Перед експериментом проводиться установка балансу моста за показниками індикатора 2.

Як видно з таблиці, запропонований спосіб одержання монозиготних тварин забезпечує усуненню травмування половинок ембріонів.

Порівняльні результати цих експериментів зведені в таблицю:

№ п/п	Вид приймального елемента	Число розділених ембріонів	Кількість отриманих після кожного ділення половинок ембріона	Кількість життєздатних половинок ембріона після кожного процесу ділення
1	1 з одною решіткою (за прикладом 1)	100	2 і більше	60-70%
2	3 двома невзаємо-перпендикулярними решітками (за прикладом)	100	2 і більше	70-80%
3	3 двома взаємо-перпендикулярними решітками (за прикладом 3)	100	4 і більше	96-98%



Фиг. 7

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22