



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61780 (13) U
(51) МПК
A61D 19/02 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ РОЗДІЛЕННЯ ЕМБРІОНІВ

1

2

(21) u201101000

(22) 31.01.2011

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) ДАНИЛКО ІННА ВІТАЛІЙВНА, МЕГЕЛЬ ЮРІЙ
ЄВГЕНОВИЧ, РИБАЛКА АНТОНІНА ІВАНІВНА,
ЧАЛИЙ ІГОР ВІЛЬЙОВИЧ(73) ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА ІМ.
ПЕТРА ВАСИЛЕНКА(57) Спосіб розділення ембріонів, при здійсненні
якого використовують камеру з рідиною та розмі-
щену в ній зубчасту або пилчасту електродну сітку,
при цьому при застосуванні клітинного діелектро-
форезу клітини розділяють на живі та мертві і

отримують живі клітини шляхом промивання сітки, який **відрізняється** тим, що застосовано камеру з культуральною рідиною, в якій підтримується температура для забезпечення життєздатності ембріонів, яка має два типи електродів - плоский і голчастий, що розташовані в ній по різні боки вздовж всієї довжини стінки камери, а розподіл на якісні та неякісні відбувається під дією електромагнітного поля, яке виникає між цими електродами, процес отримання якісних ембріонів здійснюється після відключення живлення шляхом створення тиску в каналі, який утворюється за рахунок скляної перегородки, розміщеної посередині камери між електродами.

Корисна модель відноситься до сільського господарства і може бути застосований для розділення ембріонів на якісні та неякісні в біотехнологічному процесі трансплантації ембріонів, а також в біології та медицині.

Відомий спосіб оцінки якості ембріонів *in vitro*, який пов'язаний з застосуванням барвників, що виявляють ферментну активність (флуоресціндацетат), або з використанням спеціальних міток, які знаходять ушкодження зони пелюцида, пов'язане з дефектним станом ембріональних клітин і їх подальшою вибірковою за критерієм якості [1].

Недоліком цього способу є необхідність використання барвників, що може призвести до забіліл якісних ембріонів, які застосовуються в процесі трансплантації. Необхідність визначення ступеню забарвлення оператором та його суб'єктивна оцінка якості біоматеріалу підвищує ймовірність похибок при розділенні ембріонів на якісні та неякісні. Додаткові маніпуляції з ембріонами в процесі їх відмивання від барвників приводять до зниження, або повної втрати спроможності до подальшого їх розвитку, а також до необхідності додаткових витрат на реактиви і підготовку фахівців.

Відомий спосіб визначення життєздатності ембріонів, який включає опромінення розчину з біоматеріалом світлом, одержання оптичної інформації та її обробку, яка виконується шляхом кодування зображення у проекціях. Отримане зображення першого кадру ембріона запам'ятову-

ється та порівнюється з наступними кадрами зображення. Рішення про життєздатність ембріона виноситься на підставі підрахунку числа імпульсів, яке залежить від кількості змін в зображенні між першим та іншими кадрами і порівнянні цього числа імпульсів з встановленим числом, яке задається. Таким чином, це є критерій для визначення життєздатності ембріона.

Наприклад, якщо число отриманих імпульсів 100 - це відмінний ембріон, 75 - добрий, 50 - задовільний, ≤ 50 - незадовільний [2].

Недоліком цього способу є складність отримання достатньої кількості імпульсів на зображенні ембріона, особливо якщо зображення є не контрастним, а також в разі, якщо ембріони оцінюються в тій же промивній рідині, в якій отримані від донора, що призводить до додаткових ускладнень при визначенні кількісних критеріїв оцінки якості ембріонів.

Найбільш близьким до запропонованого, за сукупністю ознак, є метод розділення клітин за допомогою діелектрофорезу - руху частинок в неоднорідному електромагнітному полі. При використанні клітинного діелектрофорезу застосовуються електроди різної форми, які створюють неоднорідне електромагнітне поле. Індукований диполь (клітина) в такому полі веде себе по-різному, в залежності від своїх електричних характеристик, які пов'язані з їх якістю, тобто поляризованість одних клітин стає більшою, ніж в навколишньому сере-

(19) UA (11) 61780 (13) U

довищі, а інших клітин - меншою. В залежності від поляризації при взаємодії з полем виникає результуюча сила, яка штовхає більш поляризовані клітини в сторону більшої напруженості поля, а менш поляризовані клітини притягуються до іншого електрода [3, 4].

Однак, застосування найближчого аналога пов'язане з неможливістю використання наведених сіток в зв'язку з малими розмірами комірок у цих сітках, де шаг сітки дорівнює $x=1-100$ мкм. Наприклад, розміри ембріонів великої рогатої худоби, мають діаметр 140×220 мкм, в залежності від стадії розвитку, що не відповідає наведеним розмірам шагу комірок сітки. Розділення клітин на якісні та неякісні відбувається за рахунок промивання сітки після дії електромагнітного поля, що потребує достатньо тривалого часу, а також не дає змоги повного розділення клітин, оскільки вони дуже близько розташовані одна до одної в разі використання таких сіток.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення способу підвищення якості розділення ембріонів на якісні та неякісні шляхом використання камери спеціальної конструкції з застосуванням замість сітки одного плоского і одного голчастого електродів, та вимивання ембріонів після дії діелектрофорезу по різних каналах, вздовж двох електродів, де розташовуються різні по якості ембріони, що не дає змоги для їх змішування за рахунок перегородки і отримання з одного каналу якісних, а з іншого - неякісних ембріонів.

Такого технічного рішення можна досягти, якщо у спосіб розділення клітин з застосуванням сітки з зубчатими або пилчастими електродними сітками і використанням подачі різних потенціалів на електроди, та промиванням сітки, згідно з корисною моделлю, застосовано камеру з культуральною рідиною, в якій підтримується температура для забезпечення життєздатності ембріонів, яка має два типи електродів плоский і голчастий, що розташовані в ній по різні боки вздовж всієї довжини стінки камери, а розподіл на якісні та неякісні відбувається під дією електромагнітного поля, яке виникає між цими електродами, процес отримання якісних ембріонів здійснюється після відключення живлення шляхом створення тиску в каналі, який утворюється за рахунок скляної перегородки, розміщеної посередині камери між електродами.

Сутність корисної моделі пояснюється кресленням, де показано: Фіг. 1 - пристрій для реалізації послідовності способу; Фіг. 2 - зовнішній вигляд камери з накритою кришкою для створення тиску в каналах.

Пристрій для реалізації послідовності операцій способу складається із скляної камери 1, камера встановлена на термостойку 2, з внутрішньої сторони, вздовж протилежних стінок камери, розміщені електроди: з однієї - голчастий 3, з протилежної - плоский 4, до яких від блока живлення 5 підведена напруга: «-» та «+», відповідно. Камера 1 накривається скляною кришкою 6, з перегородкою 7 посередині вздовж всієї кришки на глибину камери, що розділяє її два канали 8 і 9. В кришці 6 є два отвори 10, 11 по різні боки від перегородки 7,

та на протилежних від трубок 13, та 14 кінцях кришки 6, в ці отвори послідовно встановлено шприц 12 з культуральною рідиною, на виході з каналів 8, 9 знаходяться трубки 13, 14, з кранами 15, 16, які вставлені в стакан 17 з культуральною рідиною, та стакан 18 для збору неякісних ембріонів.

Спосіб реалізовано наступним чином. Отримані від донора ембріони (наприклад, великої рогатої худоби) розміщуються в скляній камері 1 з культуральною рідиною, в якій за допомогою термостойки 2 підтримується температура така, як у тілі тварин, для забезпечення їх життєздатності ($+38^{\circ}\text{C}$). На електроди 3, 4 подається напруга відповідного знаку від блока живлення 5. Під дією електромагнітного поля виникає клітинний діелектрофорез і ембріони, які знаходяться в камері, переміщуються до відповідних електродів: якісні - до електрода 3, якісні - до електрода 4. Після розподілу ембріонів вздовж електродів, камера 1 накривається кришкою 6, з перегородкою 7, таким чином за її допомогою створюються два канали 8, 9. Далі напруга з блока живлення 5 відключається, після чого в отвори 10, 11 послідовно вставляється шприц 12 наповнений культуральною рідиною і відкриваються крани 15, 16, під дією тиску, створеного шприцом, ембріони через трубки 13, 14, які підключені до каналів 9 та 8, відповідно, потрапляють в стакани 17, 18: якісні - до стакана 17 з культуральною рідиною, неякісні - до стакана 18 для відбраковування.

Позитивним технічним результатом є те, що спосіб дозволяє зменшити можливість отримання неякісних ембріонів разом з якісними, створити простішу конструкцію камери для реалізації діелектрофорезу та скоротити час для розділення клітин шляхом швидкого вимивання якісних ембріонів під дією тиску.

Запропонований спосіб забезпечує просту конструкцію камери, високий відсоток розподілу ембріонів на якісні та неякісні, без додаткового механічного втручання, за рахунок створення тиску в каналах якісні ембріони в короткий термін часу готові для подальшого використання в біотехнологічному процесі трансплантації ембріонів для підсадки тваринам-реципієнтам.

Джерела інформації:

1. Кауффельд П, Тамм Н., Шихов И.Я. и др. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота. - М.: Агропромиздат, 1990. - 56 с.

2. Пат. 51322А Україна, МПК А 61 Д 19/02. Спосіб визначення життєздатності ембріонів / Зубець М.В., Мегель Ю.Є., Рибалка А.І.; замовник та власник Харк. держ. техн. ун-т сільськ. госп. - № 2002021454; заявл. 21.02.2002; опубл. 15.11.2002. Бюл. № 11.

3. Делахей П. Двойной слой и кинетика электронных процессов / Пер. с англ.; под ред. акад. А.Н. Фрумкина. - М., Наука, 1967. - 351 с.

4. H. Li, Y. Zheng, D. Akin, R. Bashir. Characterization and Modeleng of a Microfluidenc Dielectrophoresis Filter for Biological Species // Journal of microelectromechanical sustem. - Vol. 14, № 1. - 2005. - P. 103-112.

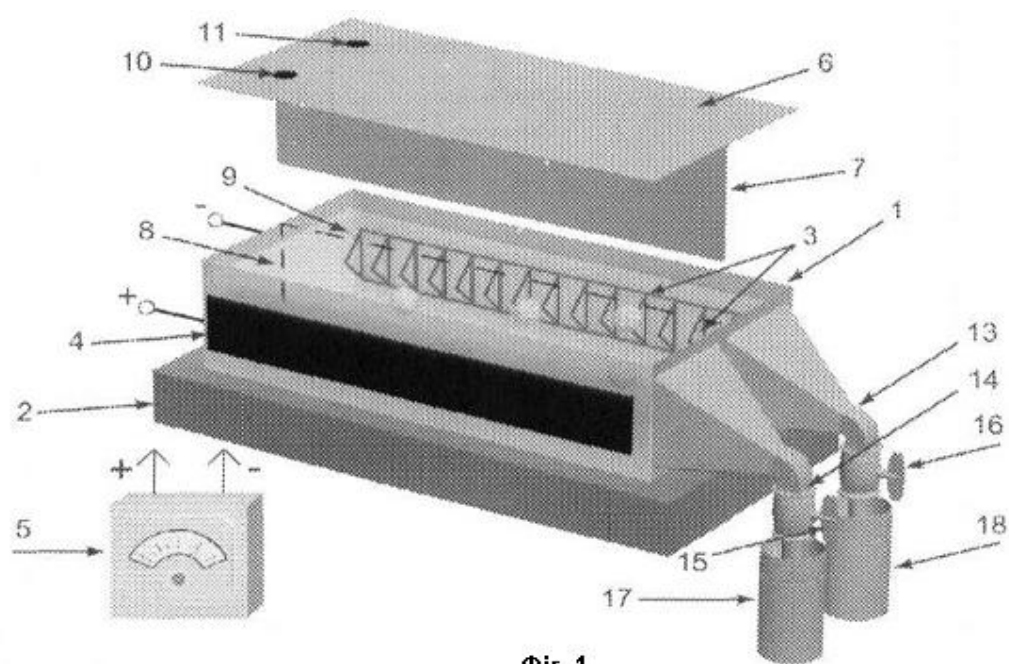


Fig. 1

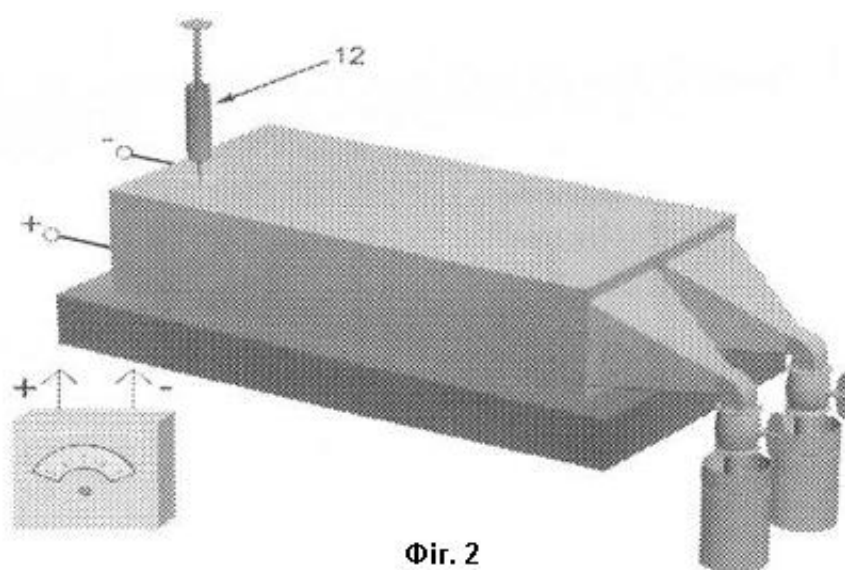


Fig. 2