



УКРАЇНА

(19) UA (11) 38781 (13) U

(51) МПК

A61D 19/02 (2006.01)

A61D 19/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ПРИСТРІЙ ДЛЯ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ ОБ'ЄКТІВ ТВАРИННОГО І РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

1

(21) а200602103

(22) 27.02.2006

(24) 26.01.2009

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) ГОРБУНОВ ЛЕОНІД ВОЛОДИМИРОВИЧ, UA,
МІЩЕНКО АНДРІЙ ГРИГОРОВИЧ, UA(73) ІНСТИТУТ ТВАРИННИЦТВА УКРАЇНСЬКОЇ
АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, UA

(57) Пристрій для кріоконсервації об'єктів тваринного і рослинного походження, що включає посудину Дьюара і термоблок, що встановлено у горловині посудини з можливістю зміни параметрів і глибини занурення відносно верхнього краю горловини, термоблок виготовлено у формі циліндра з нержавіючої сталі, який відрізняється тим, що він має порожні стінки і дно, у яких є можливість

2

установлення різного ступеня розрідженості повітря, аж до вакууму, а також відкритості зовнішньої і внутрішньої стінок, завдяки цьому реалізується широкий діапазон швидкостей ($0,01-100^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) і прискорень ($-2000 \div +2000^{\circ}\text{C}/\text{хв}^2$) заморожування з мінімальним градієнтом температури ($1^{\circ}\text{C}/\text{см}$) по осі внутрішньої частини термоблока, маса термоблока відносно мала ($\approx 0,2$ кг), що дозволяє ощадливо витратити холодоагент при заморожуванні у горловині посудини Дьюара ($\approx 0,07$ кг), застосування даного пристрою на основі транспортної посудини Дьюара X-5 створює можливість його ручного транспортування і здійснення заморожування як у лабораторних, так і у польових умовах.

Корисна модель відноситься до сільськогосподарства, зокрема, до кріобіології.

Відомі пристрої, що основані на активній подачі холодоагенту в заморожуючу камеру, мають єдиний принцип роботи. Усі вони працюють за принципом систем з автоматичним керуванням. При цьому у програмному пристрої задається необхідний режим охолодження, відповідно до якого виконавчі елементи керують подачею холодоагенту у камеру для заморожування [Рекламный проспект французской фирмы "L'air Liquide" на установку "Minicool". Замораживатель программный эмбрионов мобильный: Руководство по эксплуатации ЗЭМ4.00.00.00.РЭ. - 1989. - 17с.]. До недоліків таких пристроїв можна віднести їхню високу вартість (300-10000 у.о.) і неможливість застосування більшості з них у польових умовах. У лабораторних умовах можливе відключення електроживлення приведе до збою режиму заморожування, і як наслідок, до втрати біоб'єкту. Усі ці недоліки виключаються за рахунок застосування пропонованого пристрою, котре більш ніж у 10 разів дешевше, а також має можливість його експлуатації у польових умовах.

Також відомий пристрій розроблений для заморожування ооцитів й ембріонів тварин, який оснований на пасивному остиганні термоблоку у горловині судини Дьюара. Він дозволяє задавати

швидкості охолодження біоб'єкту від $0,1$ до $23,3^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. у температурному діапазоні $0 \div -70^{\circ}\text{C}$ за рахунок зміни ступеня відкритості термоблоку від 0 до 100% [Пат. №60161А Україна, МПК7 F25D3/10. Установка для заморожування біологічних об'єктів та спосіб ініціації кристалоутворення в кріозахищеному середовищі / Горбунов Л.В., Кабачний В.І., Антоненко Т.С., Горбунова Н.І., Томаровська Т.О. / заявка №2003021337. Заявл. 14.02.2003. Опубл. 15.09.2003, Бюл. №9, 2003]. Пристрій, до складу якого входить термоблок з порожніми стінками і дном, дозволяє одержувати надповільні швидкості теплообміну (до $0,01^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) завдяки можливості встановлення малого тиску повітря у стінках термоблоку ($0,01\text{atm}$), що створює ефект термостатування. Це дозволяє, на відміну від вищезгаданого пристрою, застосовувати його для кріоконсервації клітин рослинного походження. Термоблок зі ступенем відкритості, що змінюється, не можна також застосовувати для заморожування суспензій клітин об'ємом більш, ніж $0,2\text{мл}$ через великий градієнт температури ($\Delta T \approx 20^{\circ}\text{C}/\text{см}$) усередині заморожуючої камери. Ця проблема вирішується завдяки пропонованому пристрою ($\Delta T \approx 1^{\circ}\text{C}/\text{см}$).

Відомим також є пристрій для заморожування статевих клітин тварин, складовими частинами якого є судина Дьюара і термоблок, виготовлений у формі циліндра з нержавіючої сталі і стояка зі

(13) U

(11) 38781

(19) UA

стаканом [Горбунов Л.В., Салина А.С. Способы криоконсервации половых клеток и эмбрионов животных в широком диапазоне скоростей теплообмена// Животноводческие науки. - София. - 2005. - №5. - С.140-143.]. Зміна характерного часу охолодження термоблока досягається за допомогою різного розташування циліндра щодо стакана (0-100мм), завдяки чому реалізується діапазон швидкостей заморожування від 0,5 до 52°C/хв.

Основним недоліком усіх представлених пристроїв є неможливість реалізації надповільних швидкостей охолодження (0,01÷0,2°C/мин), необхідних для заморожування меристемальних клітин. Таким чином, запропонований винахід перекриває по своїм характеристикам усі існуючі пристрої для заморожування біологічного матеріалу.

Завданням корисної моделі є забезпечення оптимального режиму заморожування біооб'єкту за рахунок варіації характеру швидкості охолодження за допомогою зміни часу остигання термоблока у горловині судин Дьюара: Х-5, Х-34Б чи Х-35.

Поставлене завдання досягається тим, що пристрій включає судину Дьюара і термоблок, що встановлено у горловині судини з можливістю зміни параметрів і глибини занурення щодо верхнього краю горловини, термоблок виготовлено у формі циліндра з нержавіючої сталі, відрізняється тим, що він має порожні стінки і дно, у яких мається можливість установа різного ступеня розрідженості повітря, аж до вакууму, а також відкритості зовнішньої і внутрішньої стінок, завдяки чому реалізується широкий діапазон швидкостей (0,01÷100°C/хв) і прискорень (-2000÷+2000°C/хв²) заморожування з мінімальним градієнтом температури (1°C/см) по осі внутрішньої частини термоблока, маса термоблоку відносно мала (≈0,2кг), що дозволяє ощадливо витратити холодоагент при заморожуванні у горловині судини Дьюара (≈0,07кг), застосування даного пристрою на основі транспортної судини Дьюара Х-5 створює можливість його ручного транспортування і здійснення заморожування, як у лабораторних, так і у польових умовах.

Пристрій для заморожування клітин тваринного і рослинного походження складається із судини Дьюара (Х-34Б, Х-34Б чи Х-5) (10) (Фіг.1), у якому встановлено термоблок висотою 12см з подвійними стінками (12, 14). За допомогою держака (4) з фіксатором (3) і ручки (1) задається визначена глибина занурення термоблока у горловину судини Дьюара, аж до поверхні рідкого азоту. Сам термоблок складається з зовнішньої (14) і внутрішньої (12) стінок, виготовлених з нержавіючої сталі, і кришки (9).

В основі запропонованого пристрою лежить повітря (13), що дозволяє задавати різну швидкість заморожування за допомогою зміни тиску між стінками блоку за допомогою шприца (11) через фіксатор (6). Варіація тиску повітря між стінками термоблоку (12, 14) від 0,01 до 3atm приводить до зміни швидкості охолодження біологічного матеріалу від 0,01 до 4°C/хв, відповідно. Необхідний тиск (розрідженість) повітря задається і фіксується робочим об'ємом шприца (11) з вакуумною трубкою

(2) і фіксатором (6). За рахунок зміни тиску повітря, за допомогою його відкачки чи накачування, змінюється щільність і температуропровідність основи термоблока, що впливає на режим охолодження (Фіг.2). При цьому отвори (7, 16, 18, 19, 20 і 21) повинні бути закриті.

Варіювання тиску повітря у процесі заморожування від 0,01 до 3atm приводить до зміни середньої швидкості остигання термоблока від 0,01 до 4°C/хв., відповідно (Фіг.3).

Пристрій також можливо застосовувати для заморожування клітин тваринного походження. Завдяки можливості зміни ступеня відкритості зовнішньої і внутрішньої стінок і глибини занурення термоблока реалізуються швидкості і прискорення процесу заморожування до 100°C/хв. і -2000÷+2000°C/хв.², відповідно. При цьому зовнішній чохол (15) служить для того, щоб пари азоту проходили тільки між стінками блоку (12) і (14) з метою підвищення швидкості заморожування і зменшення градієнта температури. Для цього застосовуються додаткові отвори (7, 8, 16, 17, 18, 19, 20 і 21), а також спеціально розроблені контейнери для утримування біологічного матеріалу об'ємом 0,5мл (Фіг.4), де: 1 - пробка, 2 - середовище, що містить біооб'єкт, 3 - стержень, що ініціює кристали.

Для мінімізації пагубної дії схованої теплоти кристалізації запропоновано спосіб ініціації росту кристалів у пендорфовській пробірці з біооб'єктом, де полягає у включенні у нижню частину контейнера елемента неоднорідності у вигляді сталевго стержня діаметру 1мм голкоподібної форми (Фіг.4а). Інший вид контейнеру для утримування біоматеріалу складається з насадки від мікропіпетки конусоподібної форми і термопластикової пробки (Фіг.4б). Така форма контейнеру застосовується для підсилення ступеня ініціації кристалотворення, тому що зменшення об'єму у нижній частині веде до збільшення імовірності росту кристалів у даному місці. Ініціація кристалів значно збільшується у нижній частині контейнера через наявність градієнта температури у термоблоку по вертикалі 1°C/см. Загострена форма ініціюючого стержня необхідна тому, що імовірність ініціації зростає, коли величина розміру неоднорідності порівнянна з розмірами зростаючих зародків кристалів.

Таким чином, схоронність деконсервованих спермій зростає на 10% внаслідок зменшення ступеня викиду схованої теплоти кристалізації і як наслідок перепаду температури у 7 разів при ініціації кристалів сталевим голкоподібним стержнем діаметру 1мм у дні контейнера, що містить біооб'єкт.

Корисна модель ілюструється прикладами:

Приклад 1.

При заморожуванні меристемальних клітин зі швидкістю 0,01°C/хв. і отвори 5, 16-17 закриваються, а отвір 6 з'єднується зі шприцом 11 з метою встановлення необхідного тиску повітря (0,01atm.) між стінками 12 і 14. При встановленні тиску повітря 0,1atm. на глибині занурення термоблока 15см устанавлюється швидкість теплообміну 0,2°C/хв., необхідна для заморожування меристем, що оброблені розчином криопротектора [Y. Zhao, Y. Wu,

F. Engelmann, M. Zhou. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) in vitro plantlets. Cryo-letters 22, p.321-328, 2001]. Схоронність деконсервованих меристем складає 25-40%.

Приклад 2.

При заморожуванні спермій риби як контейнери для утримання біо-матеріалу застосовуються пендорфовські пробірки та насадки від мікропіпетки з ініціюючим стержнем у нижній частині контейнера. Для охолодження до кінцевої температури $-15^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ сперми коропа і сазана зі швидкістю $B=1-2^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. глибина занурення термоблока в горловину судини Дьюара Х-34Б повинна складати $L=15\text{см}$ при відкритості отворів 5, 6, 17, 20 і 21. Для охолодження сперми коропа і сазана зі швидкістю $B=15-20^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. до температури $-70\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ глибина занурення термоблока у горловину судини Дьюара повинна складати $L=30\text{см}$ при тім же ступені відкритості термоблоку. Після заморожування спермій коропа за допомогою запропонованого пристрою схоронність складає 45-55%.

Приклад 3.

Здійснення процесу заморожування спермій бугая, як у лабораторних, так і у польових умовах

можливо за допомогою запропонованого пристрою. Як контейнери для біоматеріалу застосовуються пендорфовські пробірки та насадки від мікропіпетки з ініціюючим стержнем у нижній частині контейнера. Стабільність режиму заморожування і точність визначення кінцевої температури охолодження біооб'єктів визначаються розкидом температури у горловині судини Дьюара Х-34Б, що складає $\pm 2,5^{\circ}\text{C}$, тобто, суттєво не залежить від ступеня заповнення судини азотом, зміни навколишньої температури й атмосферного тиску, за умов дотримання належних вимог до лабораторних приміщень і паспортних даних судини Дьюара. Розкид температури у судині Х-5 (при імітації умов ручного транспортування) складає $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Для заморожування спермій бугая зі швидкістю охолодження $50^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. і характером її зміни $-2000\pm 2000^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.² термоблок необхідно розміщувати на глибині 34см у горловині судини Дьюара, при відкритості отворів 5, 6, 17, 18, 19 і 20. Схоронність деконсервованого матеріалу складає 50%.

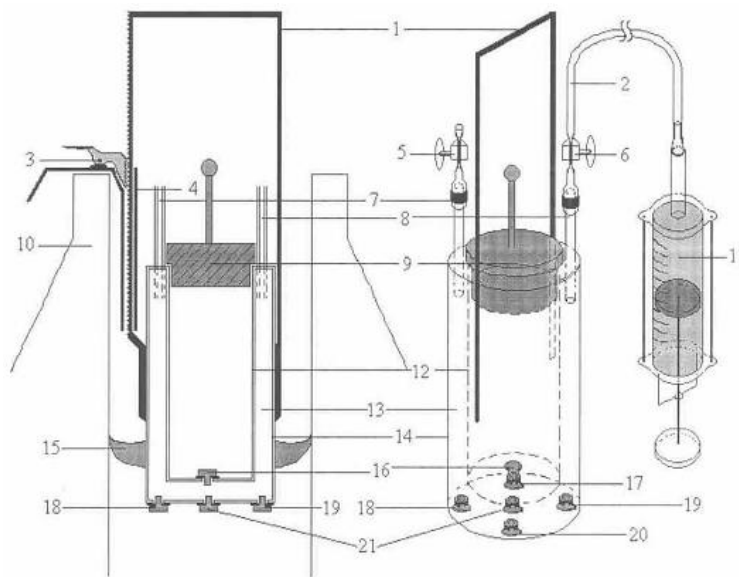


Fig. 1

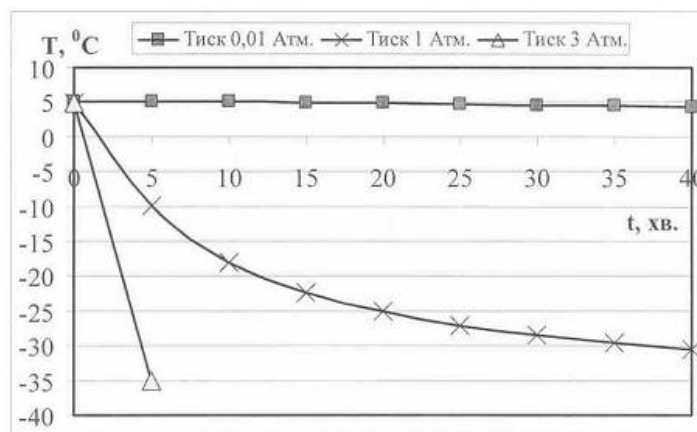
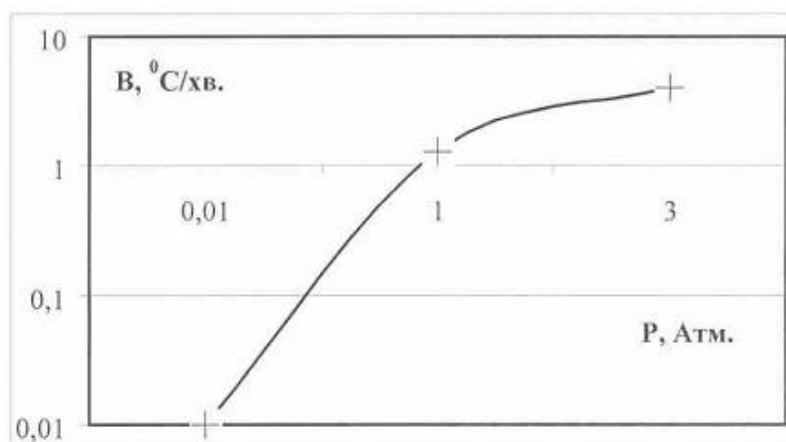
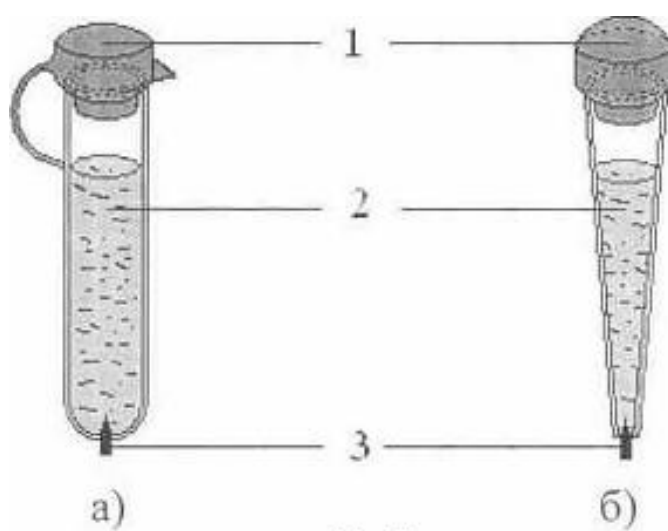


Fig. 2



Фиг. 3



Фиг. 4