

использованием сверхремонтных телок красной степной породы, разовых отелов и выращивания телят на подсосе; традиционной технологии специализированного мясного скотоводства.

The results of study of parameters for slaughter, morphological structure carcasses and quality of meat of bull-calls of different genotypes are given depending on the "know-how" of a beef: in dairy cattle breeding at manual feeder on milk for calfs; with use superrepair heifers of red steppe breed, single calvings and cultivation calfs on suck; traditional technology of the specialized meat cattle breeding.

УДК 591.15.16

СПОСОБИ РЕАЛІЗАЦІЇ РІЗНОГО ХАРАКТЕРУ ЗМІНИ ШВИДКОСТІ ЗАМОРОЖУВАННЯ СТАТЕВИХ КЛІТИН ТА ЕМБРІОНІВ ТВАРИН ДО ЗАДАНИХ КІНЦЕВИХ ТЕМПЕРАТУР

Л.В. Горбунов, Т.С. Антоненко
Харківський біотехнологічний центр

Розроблено пристрій для заморожування статевих клітин та ембріонів у широкому діапазоні швидкостей від 0,1 до 134,6 °С/хв. і характерів зміни цих швидкостей. Визначені оптимальні параметри застосування пристрою на базі посудини Дьюара Х-5. Модифіковано спосіб ініціації кристалоутворення середовища в пробірках Уленгута.

статеві клітини, ембріон, ініціація кристалоутворення, швидкість заморожування, характер зміни швидкості

Для вирішення біотехнологічних задач є потреба кріоконсервувати статеві клітини та ембріони різних видів тварин, оптимальна швидкість охолодження яких може значно різнитися. Це призводить до необхідності розробки заморожувача, завдяки якому можна реалізувати широкий спектр швидкостей охолодження із заданим характером їхньої зміни.

Метою даного дослідження було створення способу ініціації кристалоутворення у пристрої, який дозволяє заморожувати статеві клітини та ембріони тварин у широкому спектрі швидкостей заморожування від 0,1 до 134,6 °С/хв. і характерів їхньої зміни як у лабораторних, так і у виробничих умовах.

Методика досліджень. Як упаковки для заморожування використовували пробірки Уленгута ($V=0,75\text{мл}$) і пластикові соломини ($d=2\text{мм}$, $V=200\text{мкл}$). Температуру досліджуваного зразка (1М розчин гліцерину) вимірювали за допомогою хромель-копелевої термопари з діаметром вимірювальної голівки 0,5мм і за допомогою позистора СТ-17-380 Ом, відкаліброваного за показниками термопари. Режим зниження температури реєстрували графобудівником Н-307. Число дослідів у кожному експерименті складало 10. Заморожування проводили на розробленому нами пристрої до температури $-32 \pm 2,5$ °С. Розморожування – у водяній бані при 40 °С. Як об'єкти дослідження були використані ембріони білих мишей на стадії розвитку від пізньої морули до експандованої бластоцисти. Життєздатність свіжоотриманих

і заморожено-відтанутих ембріонів ссавців визначали за морфологічним способом [1]. Отримані результати статистично опрацьовували за загальноприйнятими методиками із застосуванням стандартної програми «Stadia» на ЕОМ.

Результати досліджень. Пристрій, розроблений для кріоконсервації ембріонів ВРХ, побудовано на пасивному остиганні термоблока в горловині посудини Дьюара Х-34А і Х-34Б [2]. Його вартість на порядок нижча ціни існуючих аналогів, що працюють за принципом активної подачі холодоагенту у камеру для заморожування, а результати збереженості деконсервованих ембріонів ВРХ залишаються на тому самому відносно високому рівні – 90%. Модифікація даного пристрою дає можливість реалізувати оптимальний режим заморожування різних типів біооб'єктів за допомогою зміни характерного часу охолодження термоблока і занурення його на різні рівні у горловину посудини Дьюара [3]. Використання особливих термодинамічних властивостей повітря дає можливість одержати різноманітні швидкості заморожування. Його відносно низька теплопровідність ($0,03 \text{ Вт/м} \cdot ^\circ\text{C}$), з одного боку, дозволяє реалізувати малі швидкості заморожування (V_z) при ступеню відкритості контейнера 0% ($V_z=0,1^\circ\text{C/хв.}$, $T_k=0^\circ\text{C}$), а висока конвекційна здатність, з іншого боку, – реалізувати максимальну швидкість ($V_z=23,3^\circ\text{C/хв.}$, $T_k=-100^\circ\text{C}$) при 100% відкритості термоблока. Попереднє охолодження до різних температур пристрою в горловині посудини Дьюара дозволяє збільшити швидкість охолодження до $134,6^\circ\text{C/хв.}$ при температурі охолодження термоблока -100°C (рис. 1).

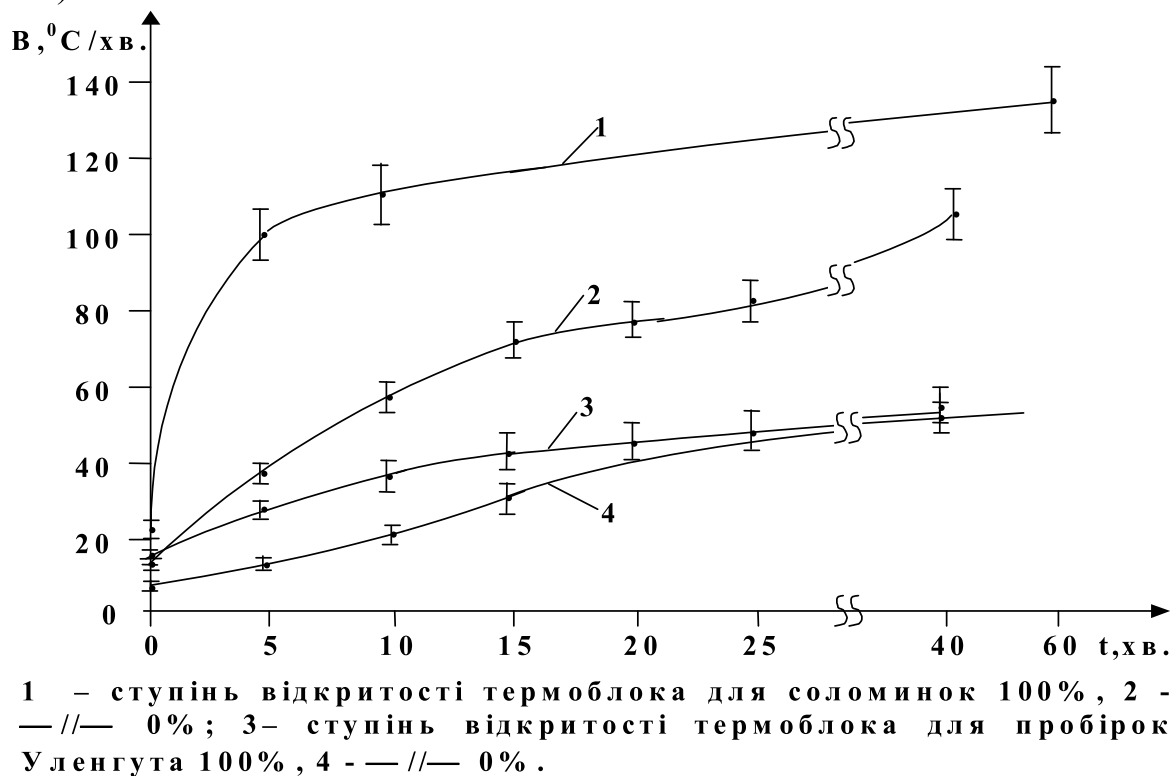


Рис. 1. Залежність швидкості заморожування від часу попереднього охолодження термоблока у горловині посудини Дьюара при ступеню відкритості термоблоку 0 і 100%.

Повторюваність режиму заморожування для запропонованого пристрою у лабораторних умовах визначається стабільністю розподілу температури в горловині посудини Дьюара, що складає $\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ за умови заповнення посудини не менше, ніж на одну чверть від його загального об'єму. Індивідуальні властивості конкретної посудини враховуються при проведенні настройки заморожувача, що здійснюється кожні півроку. Повторюваність режимів охолодження у запропонованому пристрої близька до загальновідомих способів кріоконсервації, заснованих на активній подачі холодоагенту в камеру для заморожування, що зумовлено термоінерційністю термоблока і порційною подачею холодоагента.

Розкид температури для заморожувача ЗЕМ-4 складає $\pm 3^{\circ}\text{C}$ відповідно до проведених вимірів і паспортних даних пристрою ($\pm 10\%$ у температурному діапазоні від 0 до -36°C). Крім того, жоден з відомих нам аналогів не дозволяє реалізовувати режим заморожування зі швидкістю, характер зміни якої був би близький до експоненціальної залежності, що описує кінетику дегідратації біооб'єкта. Заморожувач ЗЕМ-4 дає можливість здійснювати два режими охолодження з постійними швидкостями: ($1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) від 20°C до -7°C і ($0,3^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$) від -7°C до -36°C , а також від 20°C до 0°C і від 0°C до -36°C з тими самими величинами швидкості зміни температури [4]. За допомогою розробленого нами пристрою в температурному діапазоні від 0°C до -35°C можна реалізувати до 9 режимів охолодження з різними швидкостями і характеристиками їхньої зміни.

Для зміни характеру швидкості заморожування термоблок занурюють на задану глибину для досягнення кінцевої температури охолодження біооб'єкта (від 0 до -100°C), при цьому час попереднього охолодження блока триває від 0 до 60 хв. [5]. Після заданого часу попереднього охолодження термоблока в нього вміщують пробірку Уленгута або соломинку і витримують протягом 90 хв. для збезводнювання клітин. Після цього контейнери з біооб'єктом переносять у рідкий азот.

Успішне використання заморожувача, побудованого на пасивному остиганні термоблока в горловині посудини Дьюара Х-34А і Х-34Б, дозволило визначити оптимальні параметри його застосування на базі посудини Х-5. Зручність даного пристрою, загальною масою біля семи кілограмів, полягає в можливості його ручного транспортування на великі відстані і здійснення процесу заморожування як в лабораторних, так і у виробничих умовах. Розкид температури щодо середньої величини в посудині Х-5 (при імітації умов транспортування) склав $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Пристрій реалізує режими короткострокового збереження біля 0°C і заморожування, що здійснюється до -32°C . Контроль і підтримка температури здійснюється за допомогою позистора СТ-17-380 Ом з точністю до 2°C . Зручність застосування даного термодатчика зумовлюється відсутністю необхідності використання підсилювача, як у випадку вимірів, здійснюваних термопарою, а також виключає його безпосереднє розміщення в середовищі з біооб'єктом. Розбіжність показань температури в середовищі і місці перебування термодатчика пояснюється впливом градієнта температури при заданих швидкостях охолодження та враховується при проведенні калібрування.

Високий рівень збереження заморожено-відталих ембріонів 90% ($n=65/72$) свідчить про можливість застосування запропонованого пристрою як у лабораторних, так і у виробничих умовах, до яких варто віднести широку варіацію навколишньої температури, процес транспортування і можливу відсутність електроенергії.

З метою спрощення технологічного процесу заморожування здійснена спроба розробити спосіб штучної ініціації кристалоутворення заморожуваного у пробірках Уленгута середовища без втручання оператора. Суть запропонованого способу полягає в тому, що проростання кристалів льоду в пробірках повинно відбуватися зверху вниз для виключення виділення теплоти кристалоутворення. За нашими уявленнями, це стає можливим за рахунок конструювання термоблока, у якому спрямованість градієнта розподілу температури протилежна такому розподілу в горловині посудини Дьюара. У результаті проведеної роботи вдалося змінити напрямок градієнта температур на один градус при використанні дисків товщиною 15мм у наступній послідовності: пінопласт, дюраль, пінопласт і пластик. Проте, даної величини переохолодження верхньої частини пробірки виявилось не досить для одержання стабільних результатів по кристалоутворенню середовища. На основі отриманих результатів зроблено висновки, що поставлена задача не вирішується з використанням тільки «пасивних» властивостей матеріалів з різними коефіцієнтами теплопровідності. Далі розпочаті дослідження зі створення умов росту кристалів льоду в середовищі за рахунок «активного» теплообміну між пробірною і джерелом холоду, який підводиться у визначений момент часу.

Для цього був модифікований розроблений раніше спосіб штучної ініціації кристалізації охолоджуваного середовища [6]. Суть цього способу полягає в наступному: сталевий стрижень ($d=2\text{мм}$) занурюється через термоблок, що пасивно охолоджується в горловині посудини Дьюара, у рідкий азот на 30÷60 секунд при температурі $-7\pm 2^{\circ}\text{C}$, яка необхідна для одержання високого рівня збереження біооб'єктів. Результати свідчать, що посів льоду у такий спосіб варто проводити при ступеню відкритості термоблока від 10 до 100%, так як основою для росту кристалів льоду є пара азоту.

Таким чином, запропонований спосіб ініціації кристалоутворення покращує технологічність режиму заморожування, що дає можливість ініціювати ріст кристалів одночасно в усіх контейнерах. Вважаємо, що необхідною умовою удосконалення існуючих технологій та створення нової є оптимізація характеру зміни швидкості заморожування ооцитів і ембріонів ссавців за допомогою її підвищення в області інтенсивного кристалоутворення і зниження – в області активної дегідратації.

Висновки:

1. Розроблений пристрій реалізує широкий спектр зміни швидкостей від 0,1 до $134,6^{\circ}\text{C/хв}$ за допомогою зміни характерного часу охолодження термоблока і занурення його на різні рівні в горловину посудини Дьюара від 6,1 до 22,5 см із кінцевими температурами заморожування відповідно від 0 до -100°C .

2. Модифікований спосіб ініціації кристалоутворення дає змогу одночасно проводити самопосів льоду у восьми пробірках Уленгута за рахунок одномоментного занурення сталевго стрижня на 30÷60 секунд у рідкий азот через термоблок зі ступенем відкритості від 10 до 100% при $-7\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Бібліографічний список

1. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота: Руководство для работы по пересадке эмбрионов / Кауффольд П., Тамм И., Шихов И.Я. и др. – М.: Агропромиздат, 1990. – 56 с.

2. Осташко Ф.И., Безуглый Н.Д., Валигура Е.Г., Горбунов Л.В. Устройство для замораживания эмбрионов // Авторское свидетельство № 1802700, приоритет от 29.03.1991 г.

3. Горбунов Л.В., Антоненко Т. С. Пристрій для заморожування статевих клітин і ембріонів ссавців у широкому спектрі швидкостей заморожування // НТБ №78 ІТ УААН. – 2000.- Харків. - С. 18-21.

4. Замораживатель программный эмбрионов мобильный. // Руководство по эксплуатации ЗЭМ4.00.00.00.РЭ.-1989.- Харьков. – С. 17.

5. Горбунов Л.В., Антоненко Т.С. Оптимальный характер режиму заморожування ембріонів ссавців // НТБ №79 ІТ УААН. – 2001. – Харків. – С. 23-27.

6. Устройство для замораживания зародышей: А.с.1659040 СССР, МКИ А 61 D 19/02/ Ф.И. Осташко, Н.Д. Безуглый (СССР). – №4652166/15; Заявлено 20.02.89; Опубл. 30.06.91, Бюл. №24. – 3 с.

Разработано устройство для замораживания половых клеток и эмбрионов млекопитающих в широком диапазоне скоростей от 0,1 до 134,6⁰С/мин и характеров изменения этих скоростей. Определены оптимальные параметры применения устройства на базе сосуда Дьюара X-5. Модифицирован способ инициации кристаллообразования среды в пробирках Уленгута.

The device for freezing of mammal sexual cells and embryos in the wide range of rates from 0.1 to 134.6⁰ C/min had been designed. It had been shown the characters of change for these rates. The optimal parameters for use of designed device on the basis of Dewar vessel X-5 was determined. The way of initial crystallization of medium into Ulengut test tubes was modified.