

Создание технологии и аппаратуры для криоконсервирования эмбрионов крупного рогатого скота

А.С. Снурников

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Designing the Technique and Equipment for Cattle Embryos Cryopreservation

SNURNIKOV A.S.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Ускоренное воспроизводство высокопродуктивных сельскохозяйственных животных, повышение элитности крупного рогатого скота (КРС) стало возможным благодаря разработке и внедрению технологии трансплантации эмбрионов.

На этом пути пришлось решить комплекс задач по установлению условий поддержания жизни яйцеклеток и эмбрионов вне организма: создание сред с определенным составом солей, сахаров, аминокислот, растворимых гормонов; разработка различного оборудования для поиска, идентификации, оценки, инкубации и криоконсервирования эмбрионов [4-11].

В 1984 г. на основе теоретических разработок метод трансплантации эмбрионов КРС с учетом зарубежного опыта стали внедрять в практику: было создано 22 центра при НИИ и более 50 станций в животноводческих хозяйствах. Сравнительные исследования замораживателей эмбрионов КРС фирмы КАССУ (Франция), ПЛАНЕР БИОМЕД (Англия) и СКТЬ с ОП ИПКиК НАН (Украина), проведенные в Институте животноводства (г.Подольск, Московской обл.) в 1988 году, показали, что замораживатели типа ЗЕМ Украинского производства дешевле зарубежных в 3-5 раз, существенно проще в обслуживании и надежнее в эксплуатации, устойчивы к изменению напряжения в сети. Это позволило Госагропрому СССР прекратить закупки замораживателей за рубежом. В 1988-1990 гг. Опытным производством института было изготовлено более 90 программных замораживателей эмбрионов КРС, которые поставлялись на станции трансплантации и в НИИ.

Замораживатель ЗЕМ [1-3] состоит из камеры замораживания, блока программного охлаждения

An increased breeding of highly productive farm animals, the rise of cattle elite level have become possible due to the elaboration and introduction into practice of the technology of their embryos transplantation. When passing this way we had to solve a number of tasks on maintaining the life conditions of the oocytes and embryos outside an organism: creating the media with a distinct composition of salines, sugars, amino acids, soluble hormones; designing the equipment for the search, identification, evaluation and embryo cryopreservation [4-11].

Since 1984 basing on theoretical elaborations considering the international experience the method of cattle embryo (CE) transplantation was introduced into practice: there were created 22 centers at R&D Institutes and more than 50 stations at cattle farms. Comparative trials of cattle embryo freezers of PLANER BIOMED (UK), CASSOU (France) and Special Design Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine performed at the Institute of cattle breeding (Podolsk, Moscow region) in 1988 have demonstrated the freezers of Ukrainian production to be 3-5 times cheaper, easier in the use and more reliable and resistant to the voltage change. This fact allowed the State Agricultural Industrial Committee to stop purchasing the freezers from abroad. In 1988-1990 the Experimental production unit of the Institute produced more than 90 programmable freezers for CE, delivered to the transplantation stations and R&D Institutes.

ZEM freezer [1-3] consists of a freezing chamber, the block of programmable cooling and the system of the coolant supply. The absence of moving elements in a coolant zone allowed to increase its reliability and the term of use of the

Адрес для корреспонденции: Снурников А.С. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-20-07, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Snurnikov A.S., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7722007, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

и системы снабжения хладагентом. Отсутствие подвижных элементов в зоне хладагента позволило повысить надёжность и долговечность оборудования. В камере замораживания, размещенной в горловине сосуда Дьюара, используется газовая фаза азота.

Несмотря на то что не используется холод газообразования, это не приводит к увеличению расхода хладагента, так как его потери на компенсацию внешних теплопритоков сведены к минимуму. Отсутствие интенсивного теплообмена было компенсировано размещением ампул или пайет в укладке, изготовленной из материала с высокой теплопроводностью, что обеспечило достаточную для практических целей идентичность условий для каждого замораживаемого эмбриона.

Информация о текущем значении температуры снимается с термометра сопротивления, расположенного в камере, и подается на регулятор, выходное импульсное напряжение - на нагреватель в сосуде Дьюара. Длительность импульсов постоянной амплитуды и частоты формируется регулятором в зависимости от сигнала рассогласования между термометром сопротивления и задающим программирующим устройством регулятора.

Характерной особенностью устройства для замораживания эмбрионов является необходимость искусственного инициирования кристаллизации криопротектора, чтобы избежать гибели биообъектов. Известные методы (внесение переохлажденного кристаллика, применение элементов Пельтье, переохлажденной детали и т. д.) оказались малоэффективными, так как температура инициирования кристаллизации выбирается и устанавливается на регуляторе оператором. Различные теплофизические свойства криопротекторов в связи с различной степенью очистки, например глицерина, приводят часто к тому, что температура инициирования выбирается неправильно. Это вызывает гибель эмбрионов или снижает их жизнеспособность после замораживания.

Наиболее щадящим для эмбрионов режимом является такое инициирование, при котором кристаллизация происходит без переохлаждения и последующего отогрева криопротектора. Такой режим был достигнут в конструкции камеры, у которой верхняя часть ампул или пайет находится в постоянно переохлажденной по сравнению с укладкой зоне; кристаллы в верхней части ампул или пайет зарождаются уже при положительных температурах и рост их в основную часть криопротектора начинается при достижении их верхнего значения температурного гистерезиса

equipment. In a freezing chamber located in a Dewar neck, a nitrogen gas phase is used.

Despite the fact that gas-formation cold is not used, it does not result in the rise of coolant expenditure, as its expenditures for compensation of an outer heat influx are minimized. The absence of an intensive heat-exchange was compensated by storage of the ampoules or straws in a cassette made of the material with a high heat conductivity, that provided the sufficient for practical aim identical conditions for each of the embryos being frozen.

The data on current temperature is recorded using the resistance thermometer located in the chamber and is supplied to the regulator, the output impulse voltage, a heater in Dewar vessel. The impulse duration of constant amplitude and frequency is formed by a regulator depending upon the error signal between the resistance thermometer and the main programmable device of the regulator.

The necessity of artificial initiating of the cryoprotectant crystallization to avoid the death of bioobjects is known to be the characteristic feature of the embryo freezing device. The existing methods (introduction of over-cooled crystal, use of Peltier elements, an overcooled detail etc.) occurred to be slightly efficient as the temperature of initiation crystallization is selected and set in the regulator by an operator. Different thermophysical properties of cryoprotectants due to various purification degree, for example, of glycerol, have often resulted in the fact that the initiation temperature is wrongly selected. It causes the embryos death or decreases their viability following freezing.

A kind of initiation at which crystallization occurs with no overcooling and further thawing of cryoprotectant is the mildest regimen for embryos. Such a regimen was achieved in the chamber design in which the top of the ampoules or straws was always in a constantly overcooled zone comparing to the one of cassette; crystals at the top of the ampoules or straws appeared even at positive temperatures and their growth into the main part of a cryoprotectant starts when the highest degree of their temperature hysteresis independently on the cryoprotectant's thermophysical properties reaches their upper value.

In such a way the errors in the regulator when setting the program are excluded, and the freezing process is getting absolutely automatic. The process of crystal formation is recorded in thermograms and visually.

Main technical characteristics of ZEM freezers:
Coolant - liquid nitrogen; Interval for the temperature regulation: 40.....-160°C; Range of cooling rates: -0.1...30°C/min; Cooling rate –

независимо от теплофизических свойств криопротектора. Таким образом, исключаются ошибки при наборе программы в регуляторе, а процесс замораживания становится полностью автоматическим. Процесс кристаллообразования фиксируется по термограммам и визуально.

Основные характеристики замораживателей ЗЕМ:

холодоноситель – жидкий азот; интервал регулирования температуры – 40...-160°C; диапазон скоростей охлаждения – 0,1 ... 30°C/мин; режим охлаждения – автоматический по многоэтапным программам.

Замораживатели ЗЭМ обеспечивают:

1) автоматическое инициирование кристаллизации в щадящем для эмбрионов режиме: без переохлаждения и отогрева независимо от теплофизических свойств криопротектора; камера замораживания – одновременное замораживание эмбрионов, которые размещены в 7 пластиковых ампулах или 21 соломинке диаметром 2 мм, с обеспечением достаточной для практической цели идентичностью условий для каждого эмбриона;

2) технологичность, долговечность и высокую надежность замораживателя из-за отсутствия подвижных частей (двигателей, клапанов, реле давления и т.д.);

3) безопасность обслуживающего персонала без применения специальных мер из-за отсутствия в открытом сосуде Дьюара избыточного давления в процессе работы;

4) высокую степень автоматизации управления работой замораживателя, снижение требований к квалификации обслуживающего персонала;

5) возможность выполнять работы как в стационарных, так и мобильных условиях, в том числе на животноводческих фермах;

6) расход жидкого азота не более 400 г на программу, что позволяет без дозаправки сосуда Дьюара типа X-34 провести в течение месяца 15-20 циклов замораживания эмбрионов.

Потребляемая мощность не более 50 Вт при питании от однофазной сети 220 В.

Габариты блока управления – 300×150×250 мм.

С 1991 года в связи с экономическими трудностями выпуск программных замораживателей эмбрионов КРС был прекращен. В настоящее время замораживатели типа ЗЕМ на станциях трансплантации исчерпали ресурс работы.

В последние годы СКТЬ с ОП института усовершенствовало технологию и аппаратуру для криоконсервирования на основе применения современной элементной базы и дизайна. Изготовлена опытная партия мобильных замораживателей, преимуществами которых являются режим замораживания по стандартным программам (не менее

automatic on multi-step programs.

ZEM freezers provide:

1) Automatic initiation of the crystallization in a mild regimen for the embryos: with no overcooling and thawing independently on thermophysical properties of cryoprotectant; freezing chamber - simultaneous freezing of the embryos placed into 7 plastic ampoules or in 21 straws with 2 mm diameter providing with the practical aim the sufficient identity of the conditions for every embryo;

2) high technological characteristics, long-term usage and extra reliability of the freezer due to the absence of movable parts (engines, valves, the pressure relays etc.);

3) the personnel safety providing with no the special measures applied due to the absence of an excessive pressure in an open Dewar vessel;

4) high automatization level of the freezing control that provides the decrease of the requirements to the personnel qualification;

5) possibility to perform the work both under stationary and mobile conditions, as well as at cattle farms;

6) liquid nitrogen expenditure of not more than 400g per programme that allows to perform up to 15-20 cycles of embryo freezing within a month with no refilling the X-34 type Dewar vessel.

Power consumption of not more than 50Wt at power supply of 220V.

Parameters of the control block: 300×150×250mm

Since 1991 the production of programmable embryo freezers was stopped because of the economic difficulties. Such freezers nowadays have exhausted themselves.

Within the recent years at a SDTB with EU at the Institute there has been improved the equipment for cryopreservation basing on the application of modern elements' and design base. There was produced an experimental series of mobile freezers with a freezing regimen according to the standard programs (not less than 10 programs with 16 stages in each of them), crystallization with a mild regimen for an embryo, the absence of movable details, valves, pressure relays, that provides the technological characteristics and high reliability. Microprocessor control system of the cryobank allows to provide the reliability of cattle embryos long term storage.

Cryopreservation technology for cattle embryos, the equipment for cryopreservation, embryos' long-term storage and transportation can be introduced into practice of R&D Institutes of the National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Ukrainian Agricultural University, stock-breeding stations with the aim of embryo transplantation. Mobile programmable freezers may be recommended

10 программ по 16 этапов в каждой), прохождение кристаллизации в щадящем для эмбриона режиме, отсутствие подвижных частей (двигателя, клапанов, реле давления), что обеспечивает технологичность, высокую надёжность. Микропроцессорная система управления криобанком позволяет обеспечивать надёжность длительного хранения эмбрионов КРС.

Технология криоконсервирования эмбрионов КРС, аппаратура для криоконсервирования, длительного хранения и транспортировки эмбрионов могут быть внедрены в научно-исследовательских институтах Национальной академии аграрных наук Украины, Украинском аграрном университете, на племенных станциях для трансплантации эмбрионов. Мобильные программные замораживатели могут быть рекомендованы для НИИ и племенных станций России, Казахстана, Болгарии, Венгрии, Словакии, Литвы, куда в 1988-1990 гг. поставлялись предыдущие модификации.

Литература

1. Грищенко В.И., Снурников А.С. Новые технологии в криобиологии и криомедицине // Холодильное дело.– 1998.– №2. – С. 20- 21.
2. Дажно Ф. В. , Грошевой М. И., Снурников А. С., Тельнюк В.Н. Современная аппаратура для криоконсервации эмбрионов млекопитающих // Пробл. криобиологии.– 1991.– № 1.– С. 50-54.
3. Снурников А.С., Полончук А.М. Разработка технических средств для научных исследований и практического применения в криобиологии и криомедицине // Пробл. криобиологии.– 1997.– №1-2.– С. 54-60.
4. А.с. 1303796 СССР МКИ F25 D 3/10. Устройство для замораживания биоматериалов/ А.Д.Швец, В.Н.Тельнюк (СССР).– №3979999/31-13. Заявлено 25.11.85. Оpubл. 15.04.87. Бюл. № 14.– С. 157.
5. А.с. 1354004 СССР МКИ F25 D 3/10. Устройство для замораживания биологических объектов/ А.Д.Швец, А.Н.Новиков, М.И. Грошевой, В.Н. Тельнюк. (СССР) №3980000/ 31-13. Заявлено 25.11.85. Оpubл. 23.11.87. Бюл. № 43.– С. 140.
6. А.с. 1421953 СССР МКИ F25 D 3/10. Устройство для замораживания биологических материалов/ В.П.Пясецкий, В.Н. Тельнюк, В.А. Вырвич. (СССР) № 4172440/28-13. Заявлено 24.12.86. Оpubл. 7.09.88. Бюл. №33.– С. 142.
7. А.с. 1446429 СССР МКИ F25 D 3/10. Камера для замораживания биообъектов/ В.П.Пясецкий, С.И.Ткаченко (СССР). №4110612/31-13. Заявлено 13.06.86. Оpubл. 23.12.88 Бюл. №47.– С. 180.
8. А.с. 1446430 СССР МКИ F25 D 3/10. Камера для замораживания биообъектов/ В.П.Пясецкий, С.И.Ткаченко (СССР) №4110612/31-13. Заявлено 13.06.86. Оpubл. 23.12.88 Бюл. №47.– С. 181.
9. А.с. 1782568 СССР МКИ А61 D 19/04. Способ замораживания эмбрионов или яйцеклеток / Ф.И.Осташко, Н.Д. Безуглый, Е.Г. Валигура (СССР) №4855540/15. Заявлено 30.07.90. Оpubл. 23.12.92. Бюл. №47.– С. 35.
10. А.с. №1659040 СССР МКИ А62 D 19-02. Устройство для замораживания зародышей / Ф.И.Осташко, Н.Д.Безуглый. №4652166. Заявлено 20.02.89. Оpubл. 30.06.91 Бюл. №24.– С. 33.
11. Пат. №5449 Украина. МКВ А61 D 19-00. Установка для замораживания зародків/ Ф.И. Осташко, М.Д. Безуглый, К.Г. Валигура, Л.В. Горбунов. №94250621 пр. СРСР 29.03.91. Оpubл. 28.12.94 Бюл. №7-1.– С. 3.39.

Поступила 09.10.2003

for R&D Institutes and stock-breeding stations in Ukraine, Russia, Kazakhstan, Bulgaria, Slovakia, Lithuania, where within 1988-1990 the previous modifications of the device were supplied.

References

1. *Grischenko V.I., Snurnikov A.S.* New technologies in cryobiology and cryomedicine// *Kholodilnoe delo.*– 1998.– N2.– P.20-21.
2. *Dakhno F.V., Groshevoj M.J., Snurnikov A.S., Tel'nik V.N.* Modern equipment for mammalian embryos cryopreservation // *Problems of cryobiology.*– 1991.– N1.– P. 50-54.
3. *Snurnikov A.S., Polonchuk A.M.* Development of technical means for scientific research and its practical application in cryobiology and cryomedicine // *Problems of Cryobiology.*– 1997.– N1-2.– P. 54-60.
4. *Authors certificate 1303796 USSR. IIC F25 D 3/10.* Freezing device for Biomaterials/ A.D. Shvets, V.N. Tel'nik (SRSR).– N3979999/31-13. Accepted in 25.11.85. Published in 15.04.87. Bulletin N14.– P. 157.
5. *Authors Certificate 1354004. USSR. IICF25 D 3/10.* Freezing device for biomaterials/ A.D.Shvets, A.N. Novikov, M.I. Groshevoy, V.N. Tel'nik (USSR) N3980000/31-13. Submitted in 25.11.85. Published in 23.11.87. Bul. N43. – P. 140.
6. *Author's Certificate 1421953 USSR. IIC F25 D 3/10.* Freezing device for biological materials/ V.P. Pyasetsky, V.N. Tel'nik, V.A. Vyrvich (USSR) N4172440/28-13. Submitted in 24.12.86. Published in 07.09.88. Bul.N33.– P. 142.
7. *Author's Certificate 1336429, USSR. IIC F25 D 3/10.* Freezing chamber for bioobjects/ V.P. Pyasetsky, S.I. Tkachenko (USSR) N4110612/31-13. Submitted in 13.06.86. Published 23.12.88 Bul. N47.– P. 180.
8. *Author's certificate 1446430 USSR. IIC F25 D 3/10.* Freezing chamber for cryoobjects/ V.P. Pyasetsky, S.I. Tkachenko (USSR) N4110612/31-13. Submitted in 13.06.86. Published in 23.12.88. Bul. N47.- P. 181.
9. *Author's Certificate 17825 USSR. IIC A61 D 19/04.* Freezing method for embryos and oocytes/ F.I. Ostashko, N.D. Bezugly, E.G. Valigura (USSR), N4855540/15. Submitted in 30.07.90. Published in 23.12.92. Bul. N47.– P. 35.
10. *Author's Certificate N1659040 USSR. IIC A62 D 19-02.* Device for the embryo freezing. F.I. Ostashko, N.D. Bezugly, N4652166. Submitted in 20.02.89. Published in 30.06.91, Bul. N 24.– P. 33.
11. *Patent of Ukraine N5449. IIC A61 D 19-00.* Embryo freezing device/ F.I. Ostashko, M.D. Bezugly, K.T. Valigura, L.V. Gorbunov. Published in 28.12.94, N7-1.– P. 339.

Accepted in 09.10.2003