

Замораживание спермиев животных в лабораторных и полевых условиях

UDC 636:57.086.13:591.463.1

L.V. GORBUNOV*, A.S. SALINA

Animal Sperm Freezing Under Laboratory and Field Conditions

Предложено устройство для криоконсервирования половых клеток млекопитающих и рыб в полевых условиях, обеспечивающее скорости замораживания от 0,5 до 30°C/мин. Изменение скорости замораживания достигается посредством дозирования интенсивности теплоотвода “рубашкой” от металлического “стакана”, содержащего биообъект, в горловине сосуда Дьюара X-35. Размещение контейнеров с биообъектом в предварительно охлажденном термоблоке позволяет реализовывать изменения скорости. При помощи методов математического моделирования выбраны материалы и параметры металлического “стакана”, обеспечивающего в нем минимальный градиент распределения температуры ($\leq 1^\circ\text{C}/\text{cm}$) при охлаждении, что дает возможность замораживать суспензии клеток объемом до 5 мл в контейнере. Установлены изменение положения “рубашки” относительно металлического “стакана” и глубина его погружения в горловину сосуда Дьюара X-35, необходимые для реализации оптимальных режимов замораживания спермиев быка и пресноводных видов рыбы. Сохранность деконсервированных спермиев карпа составила 45, а быка – 40%.

Ключевые слова: криоконсервирование биообъекта, медленные скорости теплообмена, спермии рыбы, устройство.

Запропоновано пристрій для криоконсервування статевих клітин ссавців і рыб у польових умовах, що забезпечує швидкість заморожування від 0,5 до 30°C/хв. Зміна швидкості заморожування досягається за допомогою дозування інтенсивності тепловідводу “оболонкою” від металевого “стакану”, що містить біооб’єкт, у горловині посудини Дьюара X-35. Розміщення контейнерів з біооб’єктом у попередньо охолодженному термоблоці дозволяє реалізувати зміни швидкості. За допомогою методів математичного моделювання обрано матеріали і параметри металевого “стакану” розподілу температури, що забезпечує в ньому мінімальний градієнт ($\leq 1^\circ\text{C}/\text{cm}$) при охолодженні, який дає можливість заморожувати суспензії клітин обсягом до 5 мл у контейнері. Установлено зміну положення “оболонки” щодо металевого “стакану” і глибина його занурення в горловину посудини Дьюара X-35, необхідні для реалізації оптимальних режимів заморожування спермій бугаїв і прісноводних видів риби. Збереженість деконсервованих спермій коропа склала 45, а бугая – 40%.

Ключові слова: криоконсервування біооб’єкта, повільні швидкості теплообміну, спермії риби, пристрій.

The device for cryopreservation of sexual cells of mammals and fish under field conditions has been proposed. It provides freezing rates from 0.5 to 30°C/min. The change in freezing rate is achieved with dosed intensity of heat-conducting path by means of “mantel” from metal container with biological object in X-35 Dewar vessel neck. Location of containers with biological objects in pre-cooled thermal block helps to realize various behaviors of rate changes. Using the methods of mathematical modeling there have been chosen the materials and parameters of metal container providing minimum gradient of temperature distribution ($\leq 1^\circ\text{C}/\text{cm}$) during cooling that provides freezing of cell suspensions up to 5 ml in a container. The height location of “mantel” regarding metal container and depth of its submerging into X-35 Dewar vessel neck, necessary to realize optimal freezing regimens of bovine and fresh-water fish sperm have been established. Survival of frozen-thawed carp sperm made 45 and 40% for bovine ones.

Key-words: cryopreservation of biological object, slow rates of heat exchange, fish sperm, device.

Для решения практических задач биотехнологии воспроизводства высокопродуктивных сельскохозяйственных животных часто возникает необходимость криоконсервировать биообъект в условиях, отличных от лабораторных. Нами разработано устройство, предназначенное для криоконсервирования ооцитов и эмбрионов млекопитающих в лабораторных и полевых условиях [7]. Стоимость его на порядок ниже цены существующих программных аналогов, а результаты сохранности деконсервированного биоматериала остаются на относительно высоком уровне ($90 \pm 2\%$). Данное устройство позволяет осуществлять кратковременное хра-

To solve practical biotechnology tasks of reproduction of highly productive farm animals there has appeared the need to cryopreserve biological object under conditions differing from laboratory ones. We have developed the device designated for cryopreservation of mammalian oocytes and embryos under laboratory and field conditions [7]. Its cost is one order lower than the ones of already existing programmable analogues and the survival results of post-thaw biological material remain at quite a high level ($90 \pm 2\%$). This device enables of short-term storing a biological object at subzero temperatures and freezing down to different final temperatures with various rates and

Институт животноводства УААН Украины, пгт Кулинич, Харьковская обл.

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: пгт Кулинич, Харьковская обл., Украина 61015; тел.:+38 (057) 740-39-34

Institute of Animal Breeding of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, village Kulinichi, Kharkov region, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: village Kulinichi, Kharkov region, Ukraine 62404; tel.:+380 57 740 3934

нение биообъекта при околонулевых температурах и замораживание до разных конечных температур с различной скоростью и характером её изменения. Оптимальный режим охлаждения различных типов биообъекта реализуется за счет изменения характерного времени охлаждения термоблока заданием степени его открытости. Однако при применении устройства невозможно замораживать суспензии клеток в контейнере объемом более 0,2 мл из-за большого градиента температуры ($\approx 1^\circ\text{C}/\text{мм}$) в термоблоке.

Материалы и методы

При расчете характерного времени теплообмена термоблока использовано уравнение теплообмена цилиндра [4]:

$$\varpi(x, t) = \frac{2}{\pi}(T_2 - T') \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\sin(n\pi x/L)}{n} \cdot e^{-\frac{n^2 \pi^2 \alpha^2 t}{L^2}} + \frac{2}{\pi}(T_1 - T_2) \cdot \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \cdot \frac{\sin(n\pi x/L)}{n} \cdot e^{-\frac{n^2 \pi^2 \alpha^2 t}{L^2}}, \quad (1)$$

где ϖ – текущая температура; T_2 – начальная температура цилиндра; T' – температура у нижней кромки контейнера; T_1 – температура у верхней кромки контейнера; T' и T_1 определили в процессе эксперимента; L – высота контейнера, x – расстояние от нижней кромки контейнера до места нахождения биообъекта; t – время остывания цилиндра; α – коэффициент температуропроводности ($\text{м}/\text{с}^{1/2}$) выбранного материала термоблока рассчитывали по формуле:

$$\alpha = \sqrt{\frac{\gamma}{c \cdot \rho}}, \quad (2)$$

где γ – теплопроводность материала ($\text{Дж}/\text{с} \times \text{м} \times \text{К}$); c – теплоёмкость ($\text{Дж}/\text{кг} \times \text{К}$); ρ – плотность ($\text{кг}/\text{м}^3$).

На основе выбранной модели построены алгоритм и программа для расчета теплообмена цилиндра. Параметры цилиндра рассчитывали с использованием микрокалькулятора “Электроника БЗ-34” и электронных таблиц “Excel 97”.

Объектом исследования была сперма карпа и быков-производителей красно-рябой породы. Нативную сперму быков брали с уровнем сохранности $80 \pm 5\%$. Взятие, оценка качества, разбавление и подготовка спермы к охлаждению проводили по [6]. Сперму карпа замораживали по методу [3, 5]. Контейнерами для замораживания спермиев служили конверты, изготовленные из полиэтилена и алюминиевой фольги, пробирки Уленгута (объем $\leq 0,75$ мл).

characters of its change. Optimal cooling regimen of different types of biological object is realized due to the change in characteristic time of thermal block cooling time by setting the extent of thermal block openness. However when using the device it is impossible to freeze cell suspensions in the container more than 0.2 ml because of high temperature gradient ($\approx 1^\circ\text{C}/\text{мм}$) in thermal block.

Materials and methods

During calculation of characteristic time of heat exchange of thermal block the equation of cylinder heat exchange was used [4]:

$$\varpi(x, t) = \frac{2}{\pi}(T_2 - T') \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\sin(n\pi x/L)}{n} \cdot e^{-\frac{n^2 \pi^2 \alpha^2 t}{L^2}} + \frac{2}{\pi}(T_1 - T_2) \cdot \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \cdot \frac{\sin(n\pi x/L)}{n} \cdot e^{-\frac{n^2 \pi^2 \alpha^2 t}{L^2}}, \quad (1)$$

where ϖ – is the current temperature; T_2 is initial temperature of cylinder; T' is temperature in lower edge of container; T' and T_1 were experimentally found; L is container height; x is distance from lower edge of container to the location of biological object; t is the duration of cylinder cooling; α – coefficient of temperature conductivity ($\text{m}/\text{sec}^{1/2}$) of chosen material for thermal block was calculated according to the formula:

$$\alpha = \sqrt{\frac{\gamma}{c \cdot \rho}}, \quad (2)$$

where γ is material conductivity ($\text{J}/\text{sec} \times \text{m} \times \text{K}$); c is heating capacity ($\text{J}/\text{kg} \times \text{K}$); ρ is density (kg/m^3).

Using the chosen model there has been developed an algorithm and program for calculation of cylinder heat exchange. Cylinder parameters were calculated using “Excel 97” software.

Research object was carp and red spotted stud bull sperm. Native bull sperm was used with the survival rate of $80 \pm 5\%$. Harvesting, quality assessment, dilution and preparing sperm to cooling were performed as described [6]. Carp sperm was frozen according to the reported method [3, 5]. Containers for sperm freezing were envelopes made of polyethylene and aluminum foil, Uhlenhuth vials (volume ≤ 0.75 ml).

There were 5-7 repetitions in each experiment. Obtained results were statistically processed according to traditional methods.

Results and discussion

For fresh-water fish cryopreservation the freezing rate $B_1 = 1 \div 5^\circ\text{C}/\text{min}$ within temperature range from 5

В каждом эксперименте количество повторов составляло 5-7. Полученные результаты статистически обрабатывали по общепринятым методам.

Результаты и обсуждение

Для криоконсервирования молока пресноводных видов рыбы необходима скорость замораживания $B_1=1\div 5^\circ\text{C}/\text{мин}$ в температурном диапазоне от 5 до -15°C и $B_2=10\div 20^\circ\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне от -15 до -70°C [3, 5]. Математическим моделированием на основе формулы 1 выбраны соответствующие материалы (сталь нержавеющей и алюминий), которые обеспечивают характерное время остывания термоблока, необходимое для реализации заданных оптимальных скоростей. Результаты расчетов остывания термоблока (табл. 1) представлены на рис. 1. Начальные условия: α для каждого материала имеет своё значение, $T_1=67^\circ\text{C}$, $T_2=5^\circ\text{C}$, $T'=70^\circ\text{C}$, $L=5\div 10$ см, $x=L/2$ см.

Из полученных режимов охлаждения видно, что скорость замораживания в большей степени зависит от коэффициента температуропроводности выбранного материала. Для контейнера, изготовленного из стали, скорость замораживания в диапазоне от 5 до -15°C составляет 2, железа – 2,1, алюминия – 12, меди – 12,3 $^\circ\text{C}/\text{с}$.

Сопоставления результатов, полученных математическим моделированием, с экспериментальными данными для термоблока из алюминия показали значимые расхождения. Теоретические расчеты времени охлаждения термоблока в несколько раз превышают экспериментальные. Это, по-видимому, определяется не учетом в данной модели коэффициента теплопередачи между воздухом и термоблоком, а теплоинерционностью воздуха внутри термоблока. Очевидно, перечисленные выше допущения не учитываются в данной модели и требуют дальнейшего исследования. Однако поскольку введенный поправочный коэффициент способствует сходимости экспериментальной и

to -15°C and $B_2 = 10\div 20^\circ\text{C}/\text{мин}$ within the range from -15 to -70°C is necessary [3, 5]. Using mathematical modeling with formula 1 there have been chosen corresponding materials (stainless steel and aluminum), providing characteristic time of thermal block cooling-down, essential for realization of set optimal rates. Calculation results of thermal block cooling-down (Table 1) are represented in Fig 1. Initial conditions are as follows: α for each material has its own value, $T_1=67^\circ\text{C}$, $T_2=5^\circ\text{C}$, $T'=70^\circ\text{C}$, $L=5\div 10$ cm, $x=L/2$ cm.

Obtained cooling regimens show that freezing rate in greater extent depends on the coefficient of temperature conductivity of the chosen material. For the container made of steel, freezing rate within the range from 5 to -15°C made 2; 2.1 for iron, 12 for aluminum, 12.3 $^\circ\text{C}/\text{sec}$ for copper.

Comparison of the results obtained with mathematical modeling with experimental ones for thermal block made of aluminum has shown a significant discrepancy. Theoretical calculations of thermal block cooling-down time is some times higher than experimental ones. This is probably determined by a disregard in this model of heat transfer coefficient between air and thermal block as well as air heat inertance inside thermal block. Listed above admissions are likely not taken into account in this model and requires further studies. However since the used correction factor contributes to the convergence of experimental and theoretical curves of heat exchange, then for further researches we used the model with correction factor, $k=0.02$. Calculated and experimental data obtained for foam plastic (Table 1) have shown that this material parameters realize very low rates ($B_3 < 0.3$) which are not appropriate for the tasks set.

For aluminum there has been found the effect of thermal block height on the rate of its cooling (Fig. 2). For different heights of aluminum container freezing rate within temperature range from 5 to -15°C ($T_k = -70^\circ\text{C}$) made 13.1 for $L=5$ cm; 6.9 for $L=7$ cm and 3.8 $^\circ\text{C}/\text{мин}$ at $L=10$ cm. The change in rate depending

Таблица 1. Параметры, определяющие скорость теплообмена термоблока

Table 1. Parameters determining the heat exchange rate of thermal block

Материал Material	Температуропроводность α Temperature conductivity α	Теплопроводность γ Heat conductivity γ	Теплоёмкость C Thermal capacity C	Плотность материала ρ Material density ρ
Медь Copper	0,01059	384	383	89300
Алюминий Aluminum	0,00929	209	896	2700
Железо Iron	0,00455	73,3	452	7870
Сталь Steel	0,00364	47	460,5	7700
Пенопласт Foam plastic	0,000298	0,04	2050	220

теоретической кривой теплообмена, то в дальнейшей работе использовалась модель с поправочным коэффициентом $k=0,02$. Расчетные и экспериментальные данные, полученные для пенопласта (табл. 1), показали, что параметры этого материала реализуют слишком низкие скорости ($B_3 < 0,3$), которые не удовлетворяют поставленные задачи.

Для алюминия определили влияние высоты термоблока на скорость его охлаждения (рис. 2). Для разных высот алюминиевого контейнера скорость замораживания в температурном диапазоне от 5 до -15°C ($T_k = -70^\circ\text{C}$) составляла: 13,1 для $L=5$ см, 6,9 для $L=7$ см, а $3,8^\circ\text{C}/\text{мин}$ при $L=10$ см. Изменение скорости в зависимости от высоты алюминиевого термоблока в температурном диапазоне от -15 до -70°C ($T_k = -180$) составляла: 40,0 для $L=5$; 18,5 для $L=7$ и $8,4^\circ\text{C}/\text{мин}$ для $L=10$ см.

Таким образом, высота термоблока оказывает существенное влияние на скорость теплообмена. Экспериментальная проверка охлаждения термоблока показала, что уравнение теплообмена цилиндра достаточно точно описывает процесс его остывания с учетом введенного поправочного коэффициента. Низкий градиент температуры ($\leq 1^\circ\text{C}/\text{см}$), который наблюдается в термоблоке из стали или алюминия, позволяет замораживать суспензии клеток объемом до 5 мл.

Проведен расчет расхода жидкого азота при охлаждении термоблоков, изготовленных из стали и алюминия. Масса цилиндра из стали составила 241 г при высоте контейнера 5 см и диаметре 5 см, а масса цилиндра из алюминия – 87 г при высоте контейнера 5 см и диаметре 5 см. Вследствие этого для охлаждения стального термоблока расходуется 80 г жидкого азота, а алюминиевого – 30 г. Таким образом, использование термоблока, изготовленного из алюминия, более эффективно, так как на его охлаждение расходуется в 2,7 раза меньше жидкого азота.

На основании полученных данных предложен вариант устройства, имеющего телескопическую конструкцию термоблока, позволяющего получать заданные скорости и характеры их изменения в процессе криоконсервирования биообъекта.

Устройство для криоконсервирования биологических объектов (рис. 3) включает сосуд Дьюара 1, на котором установлены стойка 2 и термоблок 3, состоящий из диска 4 с крепежными стержнями 5, контейнеров с биоматериалом 6, расположенных внутри металлического “стакана” 7 и цилиндрического корпуса “рубашки” 8. Контроль температуры в металлическом “стакане” осуществляется терморезистором 9. Скорость охлаждения контейнеров зависит от изменения положения “рубашки” относительно “стакана” $H=0+(\ell-1)$ см ($\ell=12$ –

on the height of aluminum thermal block within the temperature range from -15 to -70°C ($T_k = -180^\circ\text{C}$) made 40.0 for $L=5$; 18.5 for $L=7$ and 8.4 for $L=10$ cm.

Thus the height of thermal block significantly affects the rate of heat exchange. Experimental investigation of thermal block cooling has demonstrated that the equation of cylinder exchange quite properly describes the process of its cooling-down with taking into account of the used correction factor. Low temperature gradient ($\leq 1^\circ\text{C}/\text{cm}$), which is observed in thermal block made of either steel or aluminum enables the freezing of cell suspensions with the volumes up to 5 ml.

Liquid nitrogen expenditure was calculated during cooling of thermal blocks made of steel and aluminum. Steel cylinder mass made 241 gram with the container 5 cm in height and 5 cm diameter. As a result of this for cooling of steel thermal block there was used 80 gram of liquid nitrogen and 30 gram for aluminum one. Thus aluminum thermal block use is more efficient because the expenditure of liquid nitrogen is in 2.7 times less for it.

Using obtained data there has been proposed the variant of device with telescopic construction of thermal block enabling to obtain the set rates and behaviors of their change during cryopreservation of biological object.

Device for cryopreservation of biological objects (Fig. 3) comprises Dewar vessel (1), at which the stand

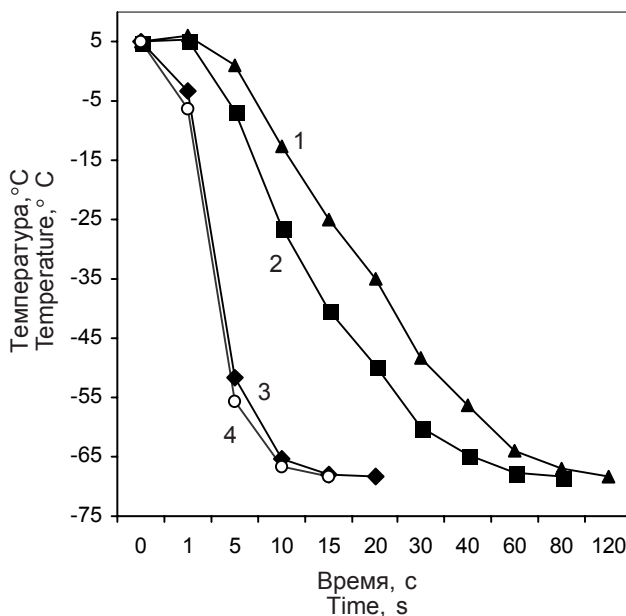


Рис. 1. Зависимость температуры термоблоков, выполненных из различных материалов, от времени охлаждения ($L=5$ см, $T_k = -70^\circ\text{C}$), рассчитанная при помощи математической модели [4]: 1– сталь; 2 – железо; 3 – алюминий; 4 – медь.

Fig. 1. Temperature change vs cooling time dependence of thermal blocks made of different materials ($L=5$ cm, $T_k = -70^\circ\text{C}$) calculated using mathematical model [4]: 1– steel; 2 – iron; 3 – aluminum; 4 – copper.

высота “рубашки”), а конечная температура замораживания – от глубины погружения термоблока L в горловине сосуда Дьюара относительно его верхнего уровня. Это возможно при использовании нарезной втулки 10 и крепёжной гайки 11. Фиксация цилиндрического корпуса относительно “стакана” в заданном положении осуществляется при помощи скобы “коромысла” 12, которое крепится к втулке 10.

Скорость охлаждения термоблока и её характер (положительное или отрицательное ускорение) можно менять в процессе замораживания определенным расположением “рубашки” относительно “стакана”, тем самым задавая различную интенсивность теплоотвода от металлического “стакана”. Для снижения скорости охлаждения тепло от “стакана” отводится за счет поднятия цилиндрической “рубашки” вверх, величина H при этом имеет знак “+”. Если интенсивность теплоотвода необходимо увеличить, то это осуществляется за счет опускания корпуса вниз относительно “стакана” и величина H имеет знак “-”. Таким образом, изменяя положение цилиндра относительно “стакана” H (от 3 до 10 см), можно задавать скорость охлаждения биообъекта от 0,1 до 30,7°C/мин в температурном диапазоне от 20 до -70°C (табл. 2).

Условия получения режимов замораживания спермиев разных видов животных при помощи разработанного устройства представлены на рис. 4. Оптимальные величины скорости данных режимов определены из [3, 5].

Для получения ускоренных режимов замораживания биообъекта с отрицательным знаком термоблок устройства располагается на глубине, необходимой для достижения конечной температуры 5, -5, -15, -70±2 °C на время от 0 до 60 мин, после чего в него помещают контейнеры с биообъектом. Средняя скорость охлаждения биообъекта в диапазоне от 5 до -15°C составляет 1,4÷15°C/мин, а до -70°C 1,4÷52°C/мин (табл. 3).

Стабильность режима замораживания и точность определения конечной температуры охлаждения определяются распределением температуры в горловине сосуда Дьюара при имитации условий транспортирования. Данная величина составляет ±5°C, при стационарных условиях без оказания механического воздействия ±2,5°C.

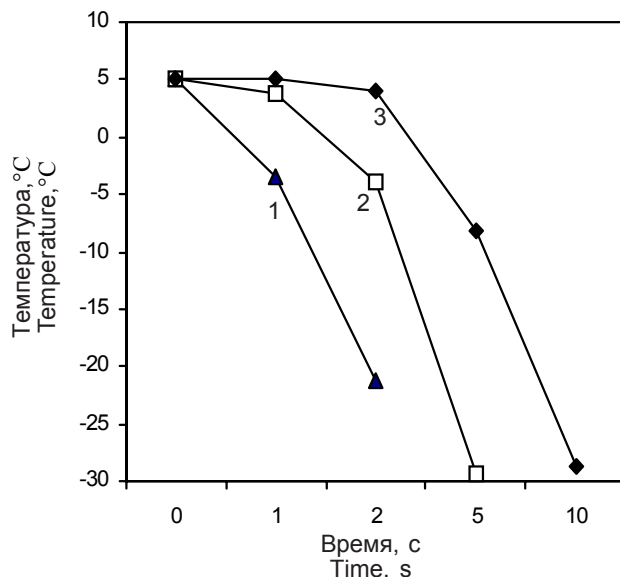


Рис. 2. Зависимость изменения температуры термоблока ($T_k = -70^\circ\text{C}$), изготовленного из алюминия высотой 5÷10 см, от времени охлаждения, рассчитанная при помощи введения поправочного коэффициента $k=0,02$: 1 – $L=5$ см; 2 – $L=7$ см; 3 – $L=10$ см.

Fig. 2. Temperature change vs cooling time dependence of aluminum thermal block ($T_k = -70^\circ\text{C}$) with the height of 5÷10 cm; dependence calculated using a correction factor, $k=0.02$: 1 – $L=5$ cm; 2 – $L=7$ cm; 3 – $L=10$ cm.

is located (2) and thermal block (3) consisting of disc (4) with holding rods (5), containers with biological material (6), located inside metal container (7) and cylinder frame of “mantle” (8). Temperature control in metal container is performed with thermal resistor (9). Cooling rate of the containers depends on the location height of “mantle” with regard to the container $H = 0 \div (\ell - 1)$ cm ($\ell = 12$ is “mantle” height) and final freezing temperature depends on the depth of thermal

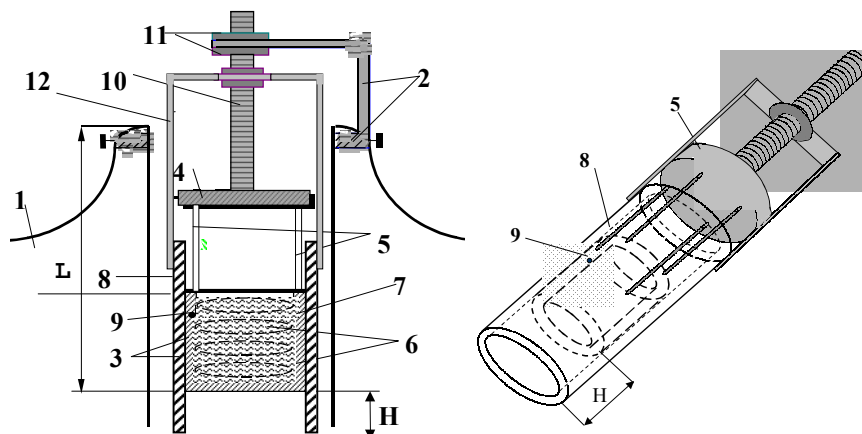


Рис. 3. Схема расположения устройства для криоконсервирования биологических объектов в горловине сосуда Дьюара X-35.

Fig. 3. Location scheme of device for cryopreservation of biological objects in X-35 Dewar vessel neck.

Таблица 2. Зависимость скорости охлаждения (B , °C/мин) от глубины погружения термоблока (L , см) в сосуд X-35 и изменения положения цилиндра (H , см) при разной конечной температуре охлаждения (T_k , °C) для полиэтиленовых конвертов

Table 2. Dependence of cooling rate (B , °C/min) on depth of thermal block submerging (L , cm) into X-35 vessel and the extent of location height of cylinder (H , cm) under different final cooling temperature (T_k , °C) for polyethylene envelopes

Конечная температура охлаждения T_k , °C Final cooling temperature T_k , °C	Скорость охлаждения (B , °C/мин) при разной степени поднятости цилиндра (H , см) и глубины погружения (L , см) Cooling rate (B , °C/min) at different extent of cylinder location height (H , cm) and submerging depth (L , cm)							
	$H = +3$		$H = 0$		$H = -5$		$H = -10$	
	B	L	B	L	B	L	B	L
5 ± 1	0,1	5,1	0,5	5,2	0,6	4,8	0,9	4,2
-15 ± 3	0,1	5,5	1,2	7,0	3,1	8,8	4,9	9,5
-30 ± 5	0,2	12,8	2,8	13,0	3,5	13,5	14,0	16,0
-70 ± 5	0,2	15,2	10,2	15,5	20,4	16	31,0	18,0

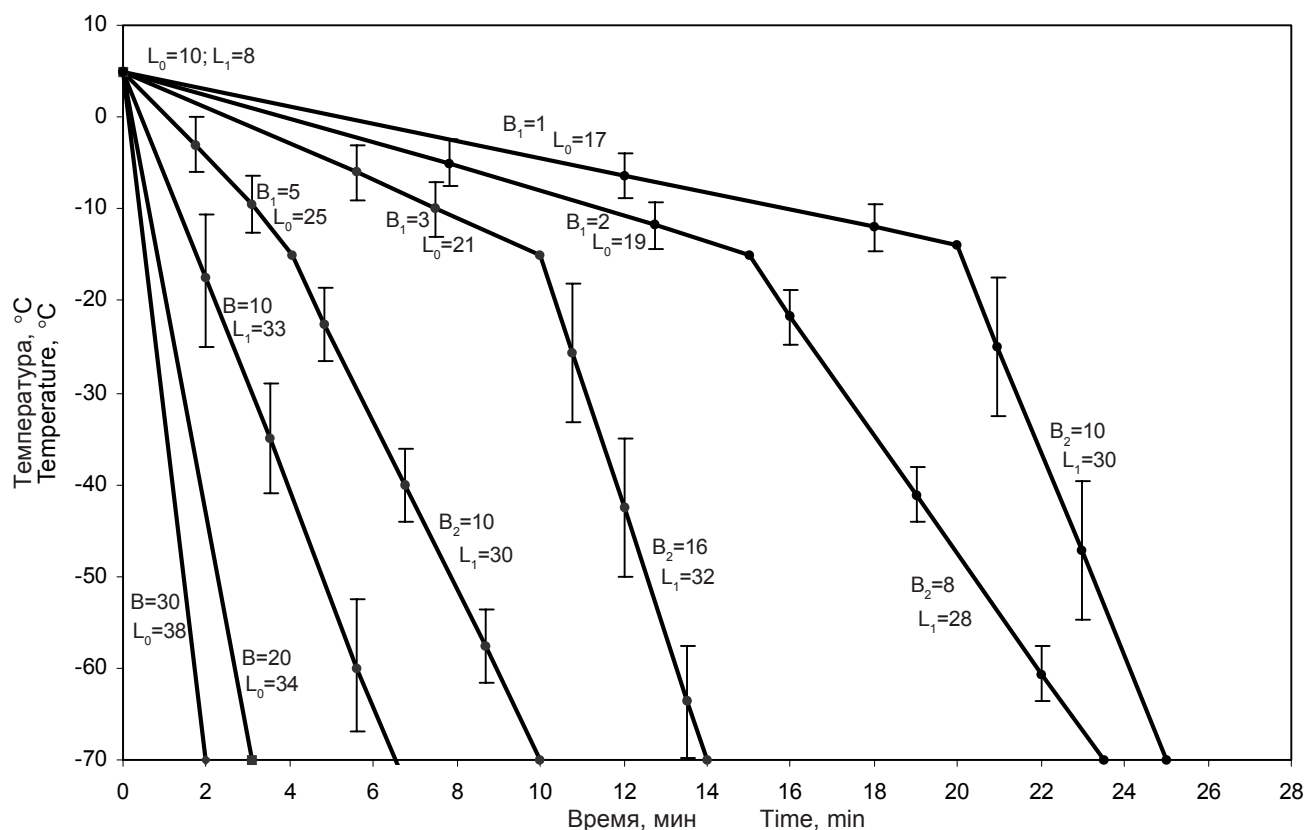


Рис. 4. Режимы замораживания спермиев животных при помощи термоблока, размещенного в горловине сосуда Дьюара X-35: карпа, сазана $B_1=1 \div 2$, $B_2=15 \div 20$ °C/мин; осетровых $B_1=2 \div 5$, $B_2=10 \div 20$ °C/мин; лососевых $B_1=2 \div 3$, $B_2=15 \div 20$ °C/мин; быков $B=10 \div 30$ °C/мин; L_1 – глубина погружения при поднятии “рубашки” относительно “стакана”; $H=5$ см; L_0 – для $H=10$ см; B_1 – скорость охлаждения в температурном диапазоне от 5 до -15 °C; B_2 – скорость охлаждения в температурном диапазоне от -15 до -70 °C.

Fig. 4. Freezing regimens for animal sperm using thermal block, located in X-35 Dewar neck: carp, wild carp $B_1=1 \div 2$, $B_2=15 \div 20$ °C/min; sturgeons $B_1=2 \div 5$, $B_2=10 \div 20$ °C/min; salmonids $B_1=2 \div 3$, $B_2=15 \div 20$ °C/min; bovine $B=10 \div 30$ °C/min; L_1 – depth of submerging at “mantel” height in respect of the container $H = 5$ cm; L_0 – for $H=10$ cm; B_1 – cooling rate within the temperature limit of 5 to -15 °C; B_2 – cooling rate within the temperature limit of -15 to -70 °C.

Таблица 3. Зависимость скорости охлаждения от времени предварительного охлаждения термоблока при поднятии цилиндра H=0
Table 3. Dependence of cooling rate on time of pre-cooling of thermal block at cylinder height H=0

Время предварительного охлаждения термоблока, мин Time of thermal block pre-cooling, min	Средняя скорость охлаждения в разных температурных диапазонах, °C/мин Average rate of cooling within different temperature ranges, °C/min	
	T = 5+ – 15 (– 15+ – 70)	T = 20+ – 5 (– 5+ – 70)
0	1,4 (10,5)	1,5 (18)
20	8,5 (24)	9,6 (27)
40	12,4 (36)	14,8 (38)
60	15,6 (48)	16,1 (52)

При апробации работоспособности данного устройства на биообъекте сохранность спермиев карпа составила 45, а быка – 40%. На основе модифицированного дифференциально-термометрического метода с помощью указанного устройства [2] определяется вероятность внутриклеточной кристаллизации спермиев и эмбрионов рыб. Определяется характер плотности вероятности распределения температуры внутриклеточной кристаллизации спермиев и зародышей рыбы по изменению жизнеспособности биообъекта в зависимости от условий его охлаждения [1].

Выводы

Таким образом, замораживание половых клеток в контейнерах объемом 0,2÷5 мл при градиенте температуры не более 1°C/см возможно в “стакане”, изготовленном из алюминия, а изменение скорости теплообмена обеспечивается за счет разной степени теплоотвода от него при помощи “рубашки” (0,1÷31°C/мин).

Литература

1. Горбунов Л.В., Морозова И.А., Ващенко А.В., Бучацкий Л.П. Температура внутрішньоклітинного кристалоутворення спермій коропа // Рибне господарство.– 2004.– Вип. 63.– С. 54-57.
2. Горбунов Л.В., Морозова И.А., Ващенко А.В., Бучацкий Л.П. Температура внутрішньоклітинного кристалоутворення ікри коропа // Ветеринарна біотехнологія. Аграрна наука.– 2004.– №5.– С. 19-23.
3. Колейка Е.Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа. – М., 1986.– 9 с.
4. Лыков А.В. Теплообмен. Справочник. – М.: Энергия, 1978.– 480 с.
5. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыбы.– М.: ВНИИ прудового рыбного хозяйства, 1997.– 10 с.

block submerging (L) in Dewar vessel neck in respect of its upper level. This is getting possible when using a riffled plug (10) and holding screw (11). Fixation of cylinder frame in respect of the container in the set position is performed by means of balancing lever (12), which is mounted to a plug (10).

Cooling rate of thermal block and its character (either positive or negative acceleration) may be varied during freezing by means of

special location of “mantle” regarding the container, thereby determining different intensities of heat-conducting path from the metal container. To reduce cooling rate the heat is drawn-off from the container due to the location height of cylinder “mantle” up, H value in this case is of “+” sign. If an intensity of heat-conducting path should be increased, then it is performed by means of frame moving-down in respect of the container and H value is of “-” sign. Thus by changing the location height of cylinder in respect of the container H (from 3 to 10 cm) one may set the cooling rate of biological object from 0.1 to 30.7°C/min within temperature range from 20 down to –70°C (Table 2).

Protocols of freezing regimens for sperm of various animal species are presented in Fig. 4. optimal values of rates for these regimens have been reported elsewhere [3, 5].

To obtain accelerated freezing regimens of biological object with negative sign a thermal block of the device is located at the depth necessary for achieving final temperature: 5, –5, –15, –70±2°C for the time from 0 to 60 min, afterwards the containers with biological objects are placed in it. An average cooling rate of biological object within the range from 5 to –15°C makes 1.4÷15°C/min and 1.4÷52°C/min down to –70°C (Table 3).

Stability of freezing regimen and accuracy of finding a final cooling temperature are determined by distribution of temperature in Dewar vessel neck at imitation of transportation conditions. This value makes ±5°C under stationary conditions with no mechanical effect ±2.5°C.

During mastering the exploitation of this device in biological object the survival of carp sperm made 45 and 45% for bovine one. On the base of modified differential thermometrical method [2] by means of this device the probability of intracellular crystallization

6. *Харьковская технология асептического взятия и криоконсервации спермы быков-производителей: Метод. рекомендации / Под ред. Ф.И. Осташко.*– Харьков, 1990.– 47 с.
7. *Пат. 60161А Україна, МКВ F 25 D 3/10.* Установа для заморожування біологічних об'єктів та спосіб ініціації кристалоутворення в кризахисному середовищі / Л.В. Горбунов, В.І. Кабачний, Т.С. Антоненко, Н.І. Горбунова, Т.О. Томаровська (Україна); Національна фармацевтична академія України. – №2003021337; Заявлено 14.02.2003; Опубл. 15.09.2003; Бюл. №9.– 2 с.

Поступила 15.04.2005

of fish sperm and embryos is found. The function of temperature distribution probability density of intracellular crystallization for fish sperm and eggs on the change of viability of biological object depending on the conditions of its cooling is found [1].

Conclusions

Thus freezing of sexual cells in containers of 0.2÷5 ml volume at temperature gradient not more than 1°C/cm is possible in aluminum container and change in the rate of heat exchange is provided due to different degrees of heat-conducting path from it with “mantle” (0.1÷31°C/min).

References

1. *Gorbunov L.V., Morozova I.A., Vaschenko A.V., Buchatsky L.P.* Temperature of intracellular crystal formation of carp sperm// *Rybne gospodarstvo.*– 2004.– Issue 63.– P. 54-57.
2. *Gorbunov L.V., Morozova I.A., Vaschenko A.V., Buchatsky L.P.* Temperature of intracellular crystal formation of carp eggs// *Veterynarna biotekhnologiya. Agrarna nauka.*– 2004.– N5.– P. 19-23.
3. *Kopeika E.F.* Instructions on low temperature preservation of carp sperm. – Moscow, 1986.– 9 p.
4. *Lykov A.V.* Heat exchange. Reference book. – Moscow: Energiya, 1978.– 480 p.
5. *Manual on cryopreservation of carp, salmon and sturgeon sperm.*– Moscow: R&D Institute of fish and pond farming, 1997.–10 p.
6. *Kharkov technology of aseptic harvesting and cryopreservation of stud bulls' sperm: Guidelines / Ed. By F.I. Ostashko.*– Kharkov, 1990.– 47 p.
7. *Patent 60161A Ukraine, IPC F 25 D 3/10.* Device for freezing of biological objects and the way to initiate crystal formation in cryoprotective medium: L.V. Gorbunov, V.I. Kabachny, T.S. Antonenko, N.I. Gorbunova, T.O. Tomarovska (Ukraine); National Pharmaceutical Academy of Ukraine. – N2003021337; Applied in 14.02.2003; Publ. in 15.09.2003; Bul. N 9. – 2 p

Accepted in 15.04.2005