

615.47:616:615.44[612.014.43]

PŘÍSTROJ PRO AUTOMATICKÉ ZMRAZOVÁNÍ BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

Major Jaroslav ČINÁTL, prom. lék., a Miloš NOVÁK
Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha

Otázka možnosti konzervace biologického materiálu se dotýká řady praktických oborů, a to nejen ve zdravotnictví, ale i v národním hospodářství. Zmíníme se o tom v úvodu v následující práci (1). Řada biologických objektů však potřebuje k tomu, aby úspěšně přežila hluboké zmrazení, nejen dostatečně nízkou teplotu a tekutinu umožňující tzv. vitrifikaci celého systému (přechod roztoku v sol a gel krystalizace vody), ale také určitou rychlost zmrazovacího postupu. Tato skutečnost byla pečlivě prostudována u buněčných linií. Scherer a Hoogasian zjistili, že zatímco HeLa buňky zmrazené velmi rychle přežívají výborně po řadu týdnů konzervační teplotu, jsou L buňky naproti tomu značně poškozovány a přežívají teprve tehdy, použijeme-li postupného způsobu zmrazování (2). Ale ani HeLa buňky rychle zmrazené nelze oživit po jednom roce konzervace, zatímco pomalu zmrazované si uchovávají životnost i po pětiletém uchovávání v tuhém CO₂ (3). Otázka pomalého zmrazování byla studována řadou autorů, u nás to byl dr. Janda (4), a všeobecně se pokládá za nejvýhodnější, snižujeme-li teplotu zmrazovaného materiálu přibližně o 1° C za minutu, a to až do -25° C. Od této teploty směrem dolů není již životnost biologických objektů nijak podstatně ovlivňována. Tato zkušenost se týká nejen zvířecích a lidských buněk a tkání, ale také např. parazitických protozoí a jiných biologických objektů. Je velmi důležité udržet postupný pokles teplotní křivky v předepsaných časových intervalech. Za tímto účelem byla zkonstruována řada zařízení. Nejprimitivnější z nich je nádoba s alkoholem postavená na elektromagnetickou míchačku. V této nádobě jsou ampule s materiálem a sem se také vhadzují kousky suchého ledu tak, aby teplotní křivka vykazovala pravidelný pokles. Jiné z nich využívají schopnosti glycerolu, který ponořen do teploty -78° C se ochlazuje postupně uvedenou rychlostí až do

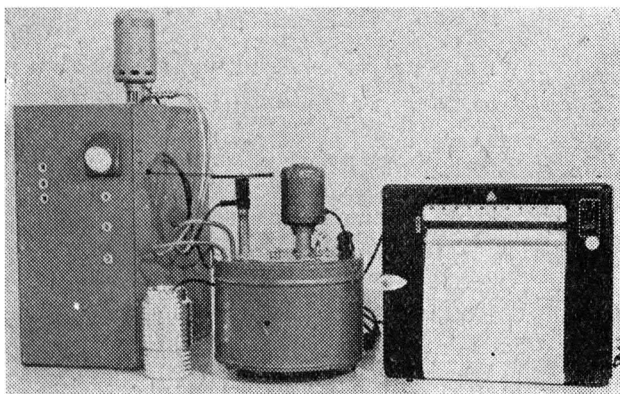
-15° C a pak se teprve jeho teplota sníží rychle až na -78° C (5). Americké firmy vyrábějí složitá elektronická zařízení využívající tekutého dusíku (6). Prvá zařízení jsou velmi jednoduchá a podle našeho názoru nevyhovují zcela požadavkům kladeným na pozvolné zmrazování. Materiál ponořený do alkoholu, jehož teplota je zchlazována přímo přiřazováním suchého ledu, musí prodělávat velké teplotní výkyvy a v druhém případě pozvolně dosažená teplota -15° C se nám nezdá být dostatečná. Elektronické zařízení je jistě dokonalé, ale je ho třeba objednat, čekat než přijde a zaplatit za ně v cenných devizách.

Proto jsme se rozhodli vypořádat se s touto otázkou podle svých možností a výsledkem naší práce je zařízení sestavené z dostupného materiálu, na kterém lze jednoduchým způsobem dosáhnout snižování teploty o jeden stupeň za minutu zcela automaticky, při čemž kolísání je v rozmezí ± 0,5° C.

Materiál a výsledky

Přístroj se skládá celkem z tří hlavních částí. První z nich je nádoba, v níž probíhá postupný proces zmrazování biologického materiálu. Druhá část je zásobník s chladicí směsí a třetí součástí je registrace teploty (tato část není nezbytná).

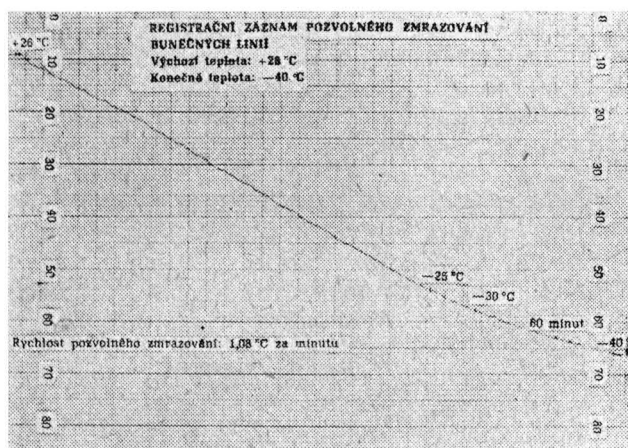
Nádoba, v níž probíhá vlastní zmrazování, má obsah 20 l. V našem případě jsme použili nádobu z Höpplerova ultratermostatu, ale lze použít jakékoli, při čemž velikost řídíme podle potřeby. Po vnitřním obvodu nádoby je stočena 12 m dlouhá měděná trubka o průměru 1 cm, kterou protéká při zapnutí druhé části přístroje chladicí směs. Tím se snižuje teplota ve zmrazovací nádobě, v níž je ochlazovaný alkohol promícháván pumpou z Höpplerova termostatu. Nejdůležitější v této části přístroje a vůbec v celém zařízení je



Obr. 1

Přístroj pro automatické zmrazování biologického materiálu: Uprostřed je vlastní zmrazovací nádoba s pumpou z Hepple-
rova termostatu, obyčejným teploměrem a kontaktním
teploměrem (má připojenou řemeničku).
Vlevo je chladicí agregát s pumpou U 8 a vpravo regis-
trační zařízení adaptované na měření teploty.

kontaktní teploměr na -60°C , dělený po stup-
ních. Abychom snížili kontaktní drátek teplomě-
ru o 10° , musíme provést otočným magnetem 22
obrátek. Toto otáčení je na našem přístroji za-
jištěno řemeničkou o průměru 14 cm, která je
připojena pevně na hlavici otáčivého magnetu.
Z ní vede řemínek k řemeničce o průměru 0,2 cm,
jíž je upravená osa elektrického motorku s po-
čtem obrátek 76 za minutu. Tento systém řeme-
niček otočí magnetem, pomocí uvedeného mo-
torku, 2,2krát za minutu, což se rovná snížení
kontaktního drátku o jeden stupeň. Kontaktní
teploměr je zapojen na elektromagnetické relé,
ovšem opačně, než je tomu u kultivačních termo-
statů. U těchto dochází v okamžiku, kdy se



Graf 1

Registrační záznam pozvolného zmrazování:
Počáteční teplota 26°C .
Konečná teplota -40°C .
Rychlost zmrazování je $1,08^{\circ}\text{C}$ za minutu.

dotkne kontaktní drátek rtuti k přerušení obvo-
du a tím k vypnutí zahřívacích těles. U zmrazo-
vacího zařízení naopak dotyk rtuti s drátkem
znamená zapojení elektrického obvodu, čímž se
uvede do provozu ochlazovací agregát.

Druhá část přístroje je tvořena 10 l Dewarovou
nádobou zasazenou do polystyrénového obalu.
V ní je zavěšena ještě plechová nádoba o obsahu
asi 4 l. V této druhé nádobě je vychlazený alko-
hol, který je používán jako vlastní chladicí směs.
Ochlazení tohoto alkoholu dosahujeme směsí su-
chý led a alkohol, jíž je plechová nádobka obklo-
pena. Chladicí směs je přečerpávána pumpou
U 8, která bývá součástí termostatu a je schopná
pracovat i v teplotě -80°C . Jakmile poklesne
teplota v zmrazovací nádobě a rtuť se odpojí od
kontaktního drátku, vypne se tato pumpa a chla-
dicí směs přestane proudit do měděného potrubí.
Magnet na teploměru se však stále otáčí a sni-
žuje pravidelně kontaktní drátek v kapiláře
teploměru. Jakmile se drátek znovu dotkne rtuti,
zapne se obvod a pumpa začne opět pumpovat
chladicí směs, a tak to postupuje, až dosáhneme
teploty -25°C (viz graf 1).

Konečně třetí část zařízení představuje kom-
penzační a registrační přístroj EZ 4, sestavený
k automatické registraci teploty. Zařízení je
vhodným doplňkem ke zmrazovacímu přístroji,
ale není nezbytné a lze pracovat bez něho. Graf
1 představuje registrační záznam z průběhu
zmrazování. Křivka pravidelně a bez výkyvů kle-
sá až na hodnotu -25°C . Od této teploty se za-
číná její pokles zpomalovat. Rychlost poklesu je
 $1,08^{\circ}\text{C}$ za minutu.

Přístroj na automatické zmrazování biologic-
kého materiálu o jeden stupeň za minutu se
nám prakticky osvědčil. Je jednoduchý a pracuje
zcela automaticky. Lze ho velmi snadno sestavit
tam, kde je k dispozici Höpplerův ultratermostat.

Souhrn

V práci je popsán přístroj vlastní konstrukce po-
užitelný k postupnému zmrazování biologického ma-
teriálu. Jeho podstatou je zařízení dodávané k Höp-
plerovu ultratermostatu. Snížování teploty o 1°
za minutu je zajištěno pomocí kontaktního teploměru,
elektromagnetického relé, pomocí systému řemení-
ček a elektrického motorku na 76 obr. za minutu.
Chladicí směs představuje alkohol vychlazený tu-
hým CO_2 na -78°C . Přístroj pracuje zcela auto-
maticky a je velmi jednoduchý.

Literatura

1. Činát J., Novák M.: Polystyrénové boxy na uchování biologického materiálu v nízkých teplotách. V tisku.
2. Scherer W. E., Hoogasian A. C.: Proc. Soc. Exptl. Biol., N. Y., 87, 480, 1954.
3. Scherer W. E.: Exptl. Cell Research, 19, 175, 1960.
4. Janda Z.: Čs. epidemiol., mikrobiol., immunol., XI, 3, 189, 1962.
5. Parker R. C.: V knize „Tissue Culture“, 3. vydání, New York 1961, str. 295.
6. Veselý P.: Ústní sdělení.