

616-072.5-085.47[679.5]-085.44[612.034.434]

## POLYSTYRÉNOVÉ BOXY NA UCHOVÁVÁNÍ BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU V NÍZKÝCH TEPLOTÁCH

Major Jaroslav ČINÁTL, prom. léc., a Miloš NOVÁK

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha

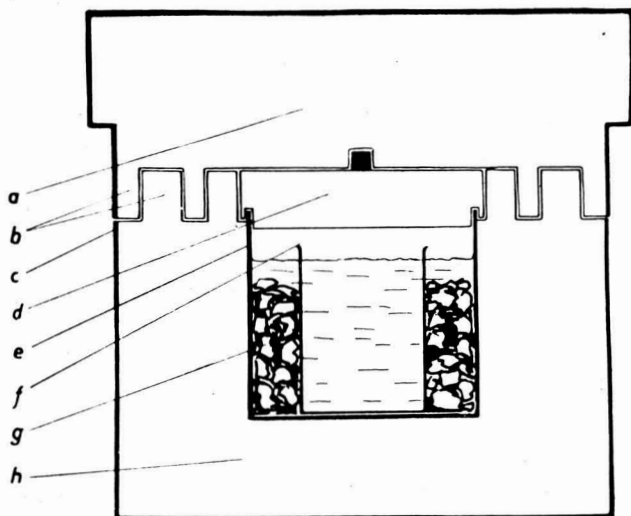
Od roku 1948, kdy Audrey U. Smithová zjistila (1), že glycerol umožňuje téměř 100% přežití ptačích spermatozoidů po jejich zmrazení na sublimační teplotu „suchého ledu“ (tuhý  $\text{CO}_2$ ), prodělává vědní obor zabývající se vlivem nízkých teplot na organismy bouřlivý rozvoj. Zjiště-

ní, že teploty od  $-70^\circ\text{C}$  směrem dolů umožňují ve spojení s glycerolem úspěšné přežití biologického materiálu, nebo dokonce jeho konzervaci, přineslo již řadu výsledků a z teoretického bádání se stala praktická záležitost. Zmrazením lze např. uchovat spermatozoidy hovězího dobytka na mnoho měsíců nebo i let, přičemž jejich schopnost oplodnit vajíčko zůstává neporušena (2). Tímto způsobem můžeme také dlouhodobě uchovávat rohovku, kterou pak je možné v případě potřeby použít k transplantaci (3). Tento postup se také zdá být schůdný pro dlouhodobou konzervaci savčích i lidských erytrocytů, které by pak bylo možné použít k transfúzním zákrokům (4). Dále lze těchto nízkých teplot použít ke konzervaci bakteriálních, protozoárních a virových kmenů a uchovávat je po dlouhou dobu, i roky, beze změny virulence, jež se často mění stálým pasážováním in vitro. Konečně lze těchto teplot využít ke konzervaci buněčných linií a primokultur nebo diploidních buněčných kmenů (5, 6). Jednoduchá manipulace se zmrazenými buňkami umožňuje i na malém virologickém pracovišti udržovat značný buněčný potenciál pro diagnostické účely.

Základním požadavkem v těchto případech je možnost udržet teplotu pod  $-70^\circ\text{C}$  nekonečně dlouho. Nejjednodušším způsobem, jak toho dosáhnout, je využití termoizolačních hmot. V této práci se zabýváme zpracováním polystyrénových desek na izolační boxy použitelné pro shora uvedené účely. Zařízení jsou velmi jednoduchá a pro svoji důležitost by měla být součástí každé diagnostické rutinní laboratoře.

### Materiál a výsledky

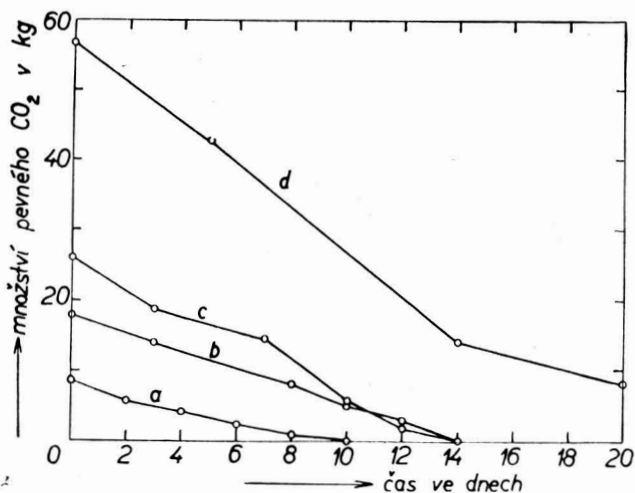
Jako základní materiál pro zhotovení termo-boxů jsme použili pěněný polystyrén, který je u nás běžně dostupný. Jeho izolační schopnost je 8krát lepší než izolační schopnost cihlového zdiva a 1,65krát lepší než izolační schopnost expandovaného korku (7). Polystyrénová deska o síle 10 cm odpovídá izolační schopnosti 80cm zdi. Ke zhotovení boxů jsme použili polystyrénové desky o rozměrech  $200 \times 17 \times 30$  cm. Materiál byl uzpůsoben a slepen tak, aby se jednotlivé desky navzájem překrývaly. Jako lepidlo jsme použili Epoxyd. Vnitřní prostor boxu je zhotoven z laminátu, jehož horní okraj o několik centimetrů přečnívá. Na tento laminát bylo nasazeno vnitřní víko (polystyrénové), řešené tak, aby zapadalo zároveň do zářezů v polystyrénu, který laminát bezprostředně obklopuje. Vlastní polystyrénový box je nahoře opatřen dvěma zářezy, do kterých zapadají obdobné zuby na vnějším



Obr. 1

Schematické znázornění polystyrénového izolačního boxu ke konzervaci biologického materiálu.

a) Vnější víko b) Zářezy ve víku a horní ploše boxu  
c) Sklolaminátový obal d) Vnitřní víko e) Vnitřní laminátový obal a stěna kovové vany f) Drátěný košík, do kterého se ukládá materiál ke konzervaci g) Suchý led ponořený do alkoholu h) Vlastní polystyrénový box



Graf 1

a — úbytek tuhého  $\text{CO}_2$  při síle stěny 38 cm, b — úbytek tuhého  $\text{CO}_2$  při síle stěny 32,5 cm, c — úbytek tuhého  $\text{CO}_2$  při síle stěny 27 cm, d — úbytek při síle stěny 34 cm (box o velkém ložním prostoru k udržování zásoby tuhého  $\text{CO}_2$ )

víku. Zevně je polystyrénový box pokryt sklola-minátém a nastříkán hliníkem. Jeho schematický nákres je znázorněn na obraze 1.

Byly zhotoveny a vyzkoušeny čtyři různé boxy, které se lišily silou stěny a obsahem vnitřního prostoru. První měl vnitřní rozměry 28×20×24 cm a sílu stěny 38 cm. Vnější rozměry byly 100×105×98 cm. Druhý box měl téměř stejné vnější rozměry, ale o něco větší vnitřní prostor, a to 40×28×28 cm. Síla stěny byla 32,5 cm. Třetí měl opět vnější rozměry přibližně stejné, vnitřek však byl opět o něco větší, 40×50×42 cm. Síla stěny byla jen 27 cm. Konečně čtvrtý box měl vnější rozměry 132×131×135 cm a vnitřní 56×60×60 cm a sílu stěny 34 cm.

Izolační schopnost těchto boxů je udána na grafu 1 a odpovídá teplotě 25° C. Stručně lze říci, že v prvním případě byla ztráta asi 1 kg suchého ledu za 24 hodin (celkový obsah asi 9 kg tuhého CO<sub>2</sub>), v druhém 1,2 kg (celkový obsah asi 19 kg), v třetím 2,1 kg (celkový obsah 60 kg) a ve čtvrtém asi 2,6 kg (celkový obsah 160 kg).

Je třeba zdůraznit, že první tři boxy byly míněny jako boxy pro úschovu a konzervaci biologického materiálu, kdežto čtvrtý jako zásobárna suchého ledu. V tomto posledním boxu nám suchý led podle propočtu vydrží 60 dní. Prakticky to však u nás provádíme tak, že každých 14 dní dovážíme 150 kg tuhého CO<sub>2</sub>, přičemž během této doby počítáme se ztrátou 37 kg (finančně to představuje 37 Kčs). Zbývajících 123 kg použijeme na konzervaci biologického materiálu, lyofilizaci a pozvolné zmrazování.

Boxy pro úschovu a konzervaci materiálu mají poněkud jiné uspořádání vnitřního prostoru než box udržující zásobu tuhého CO<sub>2</sub> (viz obr. 1). Navíc jsou vybaveny kovovou vanou a drátěným košíkem. Vana je naplněna etanolem denaturovaným benzínem a velikost drátěného košíku je volena tak, aby do prostoru mezi vanou a stěnami košíku bylo možné dát 20–30 kg suchého ledu k udržení teploty –78 °C. Materiál ke konzervaci se tudíž nedává přímo do suchého ledu, ale do vychlazeného alkoholu. Spotřebu suchého ledu a doplňování boxu lze vypočítat podle údajů, které jsou uvedeny výše (alkohol o něco snižuje spotřebu tuhého CO<sub>2</sub>). Do boxu o obsahu 40×50×42 cm se nám podle propočtu vejde více než 800 ampulí se zmrazeným materiálem.

### Diskuse

Naše zkušenosti s tímto druhem izolačních boxů jsou výtečné. Dewarovy nádoby o obsahu 10 l, se kterými jsme dříve pracovali, ztrácejí denně asi 1 kg suchého ledu, avšak jsou velmi často špatně evakuovány, a mají tudíž i daleko větší ztráty než naše polystyrénové boxy. Dále jsou Dewarovy nádoby skleněné, lehce se rozbíjí, a provoz s nimi je tedy mnohem dražší. Mimoto

jsou nepraktické tím, že materiál v nich není možné uložit tak přehledným způsobem jako v boxech. Zařízení z jiného materiálu, např. wellitu, expandovaného korku, popř. pěnového skla, není tak vhodné pro podstatně větší váhu a horší izolační schopnost tohoto materiálu (7). Výhodnější by jistě bylo použít pěněný polyuretan, který má 1,5 krát lepší izolační schopnost než polystyrén, není však prozatím tak dostupný.

Pro srovnání bychom chtěli ještě ukázat na některé číselné údaje týkající se amerických výrobků, které jsou vzaty z knihy Parkerovy (8). Tak např. americká firma Breeders Servis vyrábí izolační jednotky na uchovávání biologického materiálu v –78 °C a udává, že tyto boxy mají při 20 °C ztrátu asi 5,5 kg suchého ledu za 24 hodiny. Do boxu se vejde 52 l alkoholu a 37 kg suchého ledu. Ložní prostor je na 350 2ml ampulí. Celé zařízení má vnější rozměry 64×64×55 cm, je tedy o polovinu menší než náš box. Jak je vidět, nehrála v tomto případě hlavní roli co nejmenší spotřeba suchého ledu, nýbrž hlavní byla otázka co nejmenšího prostoru, který by tato termoizolační jednotka zabrala. V našich podmínkách jsme však byli nuceni klást hlavní důraz na to, jak dosáhnout co nejmenších ztrát tuhého CO<sub>2</sub>. Podle získaných výsledků jsme propočítali, že box, který by měl přibližně tutéž velikost jako izolační jednotka uvedené americké firmy, by při síle polystyrénu 12 cm ztrácel 6,3 kg suchého ledu za 24 hodin.

Nakonec je třeba se ještě zmínit o tom, že polystyrénové termoboxy, které jsou zavedeny v armádě, jsou konstruovány pro jiné účely a pro konzervaci biologického materiálu jsou naprosto nevhodné.

### Souhrn

V práci jsou popsány boxy na udržování tuhého CO<sub>2</sub> a na uchování a konzervaci biologického materiálu v nízkých teplotách. Jsou zhotoveny z polystyrénových desek a mají značnou izolační schopnost. Box, který má sílu stěny 27 cm, ztratí za 24 hodin 2,1 kg suchého ledu a box se silou stěny 38 cm ztratí během stejné doby přibližně 1 kg. V boxu se silou stěny 34 cm a s vnitřním prostorem o rozměrech 56×60×60 cm lze udržet 160 kg tuhého CO<sub>2</sub> po 60 dní. Zahraniční izolační jednotky vyráběné ke stejným účelům mají horší izolační schopnost a ztrácejí více než 5 kg suchého ledu za 24 hodin. Jsou však menších rozměrů.

### Literatura

1. Polge C., Smith A. U., Parkes. A. S.: Nature, 1964, 666, 1949.
2. Polge C.: Proc. Roy. Soc., B, 147, 498, 1957.
3. Ridge J. W.: Proc. Roy. Soc., B, 147, 531, 1957.
4. Tullis J. L., Ketchel M. M., Pyle H. M., Pennell R. B., Gibson J. C., Tinch R. J., Driscoll S. G.: J. Amer. Med. Ass., 168, 399, 1958.
5. Scherer W. E., Hoogasian A. C.: Proc. Soc. Exptl. Biol., N. Y., 87, 480, 1954.
6. Hayflick L., Moorhead P. S.: Exptl. Cell Research, 25, 585, 1961.
7. Ibl V.: Průmysl potravin, 15, 27, 1964.
8. Parker R. C.: V knize „Tissue Culture“, 3. vydání, str. 295, 1961.