

Розподіл швидкості охолодження у циліндричних контейнерах різного розміру на етапі кристалізації суспензії *Saccharomyces cerevisiae*

UDC 57.043

V.V. MARUSCHENKO¹, I.P. VYSEKANTSEV^{2*}

Distribution of Cooling Rates in Cylinder Containers with Different Diameters at Crystallisation Stage of *Saccharomyces cerevisiae* Suspension

Визначено розподіл швидкості охолодження в суспензії мікроорганізмів *S. cerevisiae* у фізіологічному розчині при її заморожуванні в контейнерах циліндричної форми різного розміру (10, 20 і 30 мм) зі швидкістю 1, 5 і 10°C/хв. Показано, що клітини, розташовані у різних точках зразка, на етапі кристалізації суспензії клітин охолоджуються з істотно різними режимними параметрами. Це приводить до зменшення збереженості біооб'єкта у міру збільшення розміру зразка і швидкості охолодження. Встановлено аналітичний вираз, що апроксимує поле температур суспензії *S. cerevisiae* у фізіологічному розчині на етапі кристалізації в циліндричному контейнері в залежності від його діаметра і швидкості охолодження зовнішньої поверхні контейнера.

Ключові слова: контейнери, режими охолодження, поле температур, *Saccharomyces cerevisiae*.

Определено распределение скорости охлаждения в суспензии микроорганизмов *S. cerevisiae* в физиологическом растворе при ее замораживании в контейнерах цилиндрической формы разного размера (10, 20 и 30 мм) со скоростью 1, 5 и 10°C/мин. Показано, что клетки, находящиеся в разных точках образца, на этапе кристаллизации суспензии клеток охлаждаются при существенно разных режимных параметрах. Это приводит к уменьшению сохранности биообъекта по мере увеличения размера образца и скорости охлаждения. Установлено аналитическое выражение, которое аппроксимирует поле температур суспензии *S. cerevisiae* в физиологическом растворе на этапе кристаллизации в цилиндрическом контейнере в зависимости от его диаметра и скорости охлаждения внешней поверхности контейнера.

Ключевые слова: контейнеры, режимы охлаждения, поле температур, *Saccharomyces cerevisiae*.

The distribution of cooling rates in *S. cerevisiae* microorganism suspension in physiological solution under its freezing in cylinder containers with different diameters (10, 20 and 30 mm) with 1, 5 and 10°C/min rates has been determined. Cells, being in different sample's points at the stage of cell suspension crystallisation, are shown as cooled under very different regimen parameters. This results in a decrease of bioobject's integrity with the augmentation of samples' size and cooling rate. There has been established the analytic expression, approximating the temperature field of *S. cerevisiae* suspension in physiological solution at crystallisation stage in cylinder container, depending on its diameter and cooling rate of container external surface.

Key-words: containers, cooling regiments, temperature field, *Saccharomyces cerevisiae*.

Одним з наріжних каменів сучасної теорії пошкодження клітинних суспензій при їх низькотемпературній консервації є двохфакторна теорія [1, 2], згідно з якою збереженість усіх клітинних суспензій куполоподібно залежить від швидкості охолодження на етапі кристалізації (рис. 1). Максимальну збереженість забезпечує визначена для даного типу клітин швидкість охолодження β_{opt} . При відхиленні від неї у бік зростаючих (за абсолютною величиною) значень збільшується величина переохолодження цитоплазми клітин, які консервуються, що призводить до згубної для них внутрішньоклітинної кристалізації [3, 4]. При відхиленні швидкості охоло-

дження у бік меншої, ніж оптимальна, подовжується час дії на клітини несприятливих чинників, які виникають при кристалізації клітинної суспензії (гіпертонія, підвищена іонна сила, зсув рН і т. інш.), внаслідок чого клітини пошкоджуються. Впродовж заморожування клітинної суспензії у контейнері з кінцевим розміром поле швидкостей охолодження є неоднорідним. В різних точках зразка швидкість охолодження на етапі кристалізації неоднакова і змінюється у межах $\beta_{min} \div \beta_{max}$ (рис. 1). При цьому збереженість будь-якої клітини залежить від місця її знаходження у зразку. Чим більший розкид швидкостей охолодження, тим менша збереженість

¹Національний технічний університет "ХПІ", м. Харків

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

* Автор, якому необхідно направляти кореспонденцію: вул. Перейславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

¹National Technical University "Kharkiv Polytechnical Institute", Kharkov, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereiaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua



Рис. 1. Типова залежність збереженості клітин від швидкості охолодження на етапі кристалізації [1].

клітин в цілому у зразку, оскільки більша частина клітин заморожується зі швидкістю, яка відрізняється від її оптимального значення.

При заморожуванні біооб'єкта з використанням програмного заморожувача датчик вимірювання температури, по відхиленню показань якого від заданої програми здійснюється керування процесом охолодження, розташовується на осі симетрії контейнера або на зовнішній його поверхні. В обох випадках програма охолодження відхиляється від заданої. Дійсно, якщо керування процесом охолодження здійснюється по датчику, який розташований на зовнішній поверхні контейнера, неможливо точно витримати задану швидкість охолодження у зразку, зокрема через нестаціонарність теплообміну, пов'язану з переміщенням границь поділу між рідкою, твердою та змішаною фазами. Крім того, керування процесом охолодження зразка у програмному заморожувачі при знаходженні датчика температури у геометричному центрі контейнера неможливе через те, що прихована теплота льодоутворення, яка виділяється на фронті кристалізації,

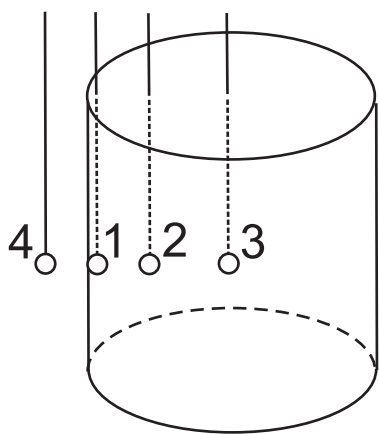


Рис. 2. Розташування термопар (1, 2, 3) і термометра опору (4) у криокамері та зразка циліндричної форми з діаметрами 20 і 30 мм.

екранує вимірювач температури від зони, розташованої поза рідкою фазою, що його оточує.

Отже, при криоконсервуванні зразків відносно великого розміру усі режимні параметри заморожування змінюються в залежності від розташування клітини у зразку. При цьому неможливо реалізувати оптимальні умови заморожування для всіх клітин одночасно. У зв'язку з цим виникає проблема оптимізації умов заморожування біологічних об'єктів, що мають порівняно великі розміри, з урахуванням розкиду режимних параметрів охолодження для окремих клітин у зразку.

Мета роботи – визначення розподілу швидкості охолодження в суспензії мікроорганізмів *S. cerevisiae* у фізіологічному розчині при її заморожуванні в контейнерах циліндричної форми різного розміру (10, 20 і 30 мм) зі швидкістю 1, 5 і 10°C/хв (за датчиком на зовнішній поверхні контейнера).

Матеріали і методи

Циліндричні пластикові контейнери з діаметрами 10, 20 і 30 мм, заповнені суспензією мікроорганізмів *S. cerevisiae* у фізіологічному розчині, охолоджували до температури -196°C за допомогою програмного заморожувача УОП-6 (СКТБ з ДВ ПКіК НАН України). Початкова кількість клітин в 1 мл суспензії складала близько 6×10^7 . Швидкість охолодження β на зовнішній стінці контейнера, яку контролювали термометром опору 4 (рис. 2), складала 1, 5 або 10°C/хв. Розподіл температурного поля у контейнері контролювали трьома (при діаметрах контейнера 20 і 30 мм) або двома (при діаметрі контейнера 10 мм) термопарами, спай яких у першому випадку були розміщені в контейнері (рис. 2: спай термопари 1 – на внутрішній стінці контейнера; спай термопари 2 – посередині між спаями термопар 1 і 3, спай термопари 3 – на осі циліндричного контейнера), а у другому випадку спай термопари 1 був розташований на внутрішній стінці контейнера, спай другої термопари 3 – на осі контейнера. Неробочі спай диференціальних термопар розміщували у термостаті, який містив суміш льоду і води з температурою 0°C . Контейнери вміщували у спеціальну укладку, що фіксувалась у криогенній камері приладу УОП-6. Термограми охолодження реєстрували багатоканальним самописцем.

Результати та обговорення

На рис. 3 подана типова термограма охолодження мікроорганізмів *S. cerevisiae* у 0,15 М водному розчині хлориду натрію. Момент часу t_A відповідає початку льодоутворення у зразку. Фронт кристалізації фізіологічного розчину є термодинамічно нестійким. Тому цей розчин кристалізується у вигляді суміші дендритів льоду 1 і розчину 2 з

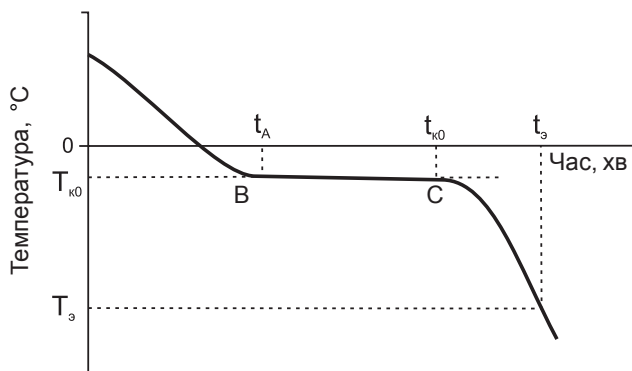


Рис. 3. Типова термограма охолодження суспензії охолодження *S. cerevisiae* у фізіологічному розчині на етапі кристалізації в циліндричному контейнері: t_A – момент початку кристалізації у клітинній суспензії; T_{k0} – температура початку кристалізації; t_e – момент досягнення евтектичної температури у визначеній точці зразка; t_{k0} – момент часу проходження умовного фронту кристалізації через точку, в якій знаходиться термопара.

підвищеною по відношенню до початкового значення концентрацією електроліту (рис. 4). Тому фронтом кристалізації умовно можна вважати циліндричну поверхню АВ, що співпадає з ізотермою, на якій температура дорівнює початковій рівноважній температурі кристалізації фізіологічного розчину T_{k0} . По мірі охолодження умовний фронт кристалізації просувається від стінки циліндричного контейнера вглиб зразка. Швидкість охолодження, яка до моменту часу t_A є сталою, після початку кристалізації у зразку уповільнюється за рахунок утворення на фронті поділу фаз прихованої теплоти кристалізації. З моменту t_A до моменту t_{k0} термопар,

розташовані на деякій відстані від стінки контейнера, не „відчують” охолодження, оскільки в цей проміжок часу температура на умовному фронті кристалізації залишається майже сталою і приблизно дорівнює початковій рівноважній температурі кристалізації позаклітинного розчину. Це відбувається внаслідок того, що тепловіддача від фронту кристалізації компенсується теплом, яке утворюється при кристалізації. Тільки з моменту часу t_{k0} , при якому фронт кристалізації досягає спаю термопар, відбувається його охолодження. Оскільки наявність термопар у зразку суттєво не викривлює поле температури порівняно з полем за відсутності термопар, можна стверджувати, що клітина, яка розташована біля термопар, охолоджується по відповідній термограмі. Рівноважна температура евтектики водного розчину хлориду натрію T_e (див. рис. 3), при якій за термодинамічної рівноваги завершується кристалізація, дорівнює $-21,8^\circ\text{C}$. Проміжок часу, який минає від початку кристалізації у зразку до досягнення рівноважної температури евтектики у визначеній точці зразка, позначимо t_e , а швидкість охолодження у цій точці – β_3 .

Відповідно до двохфакторної теорії кріопшкодження кожної окремої клітини значною мірою визначається режимом її охолодження на ділянці термограми ВС (див. рис. 3). В табл. 1–3 подані вказані вище параметри t_{k0} , t_e і β_3 , визначені за експериментальними термограмами заморожування мікроорганізмів у циліндричних пластикових контейнерах різного діаметра зі швидкостями охолодження в 1, 5 і $10^\circ\text{C}/\text{хв}$.

Таблиця 1. Параметри охолодження t_{k0} , t_e і β_3 охолодження *S. cerevisiae* у фізіологічному розчині на етапі кристалізації в циліндричному контейнері з діаметром 30 мм в залежності від швидкості охолодження зовнішньої поверхні контейнера β і розташування термопар у зразку ($M \pm m$)

Номер термопар	Швидкість охолодження, $^\circ\text{C}/\text{хв}$	$t_{k0}, \text{хв}$	$t_e, \text{хв}$	$\beta_3, ^\circ\text{C}/\text{хв}$	$\gamma, (^\circ\text{C}/\text{хв})^2$
1	1	0	29 ± 1	$3,65 \pm 1$	10,004
	5	0	$10,25 \pm 2,25$	$4,42 \pm 0,1$	59,914
	10	0	$5,4 \pm 0,7$	$7,31 \pm 0,35$	238,56
2	1	$15,8 \pm 2,72$	$28,1 \pm 1,9$	$6,5 \pm 0,5$	29,963
	5	$6,8 \pm 2,3$	$11,5 \pm 2$	$9,06 \pm 2,02$	149,82
	10	4 ± 1	$5,8 \pm 1,7$	$14,0 \pm 1,5$	448,63
3	1	$26,8 \pm 0,8$	$28,9 \pm 1,2$	$14,4 \pm 2,6$	499,97
	5	$20 \pm 0,5$	$21 \pm 1,25$	$30 \pm 3,4$	1999,9
	10	$7,05 \pm 0,7$	$7,87 \pm 0,63$	$38,5 \pm 3,6$	3999,7

Таблиця 2. Параметри t_{k0} , t_e і β_3 охолодження *S. cerevisiae* у фізіологічному розчині на етапі кристалізації в циліндричному контейнері з діаметром 20 мм в залежності від швидкості охолодження зовнішньої поверхні контейнера β і розташування термопар у зразку ($M \pm m$)

Номер термопар	Швидкість охолодження, °C/хв	t_{k0} , хв	t_e , хв	β_3 , °C/хв	γ , (°C/хв) ²
1	1	0	25,5±1,5	3,72±0,47	15,006
	5	0	8,8±1,4	5,73±0,73	89,871
	10	0	5,58±0,85	8,4±1,2	357,84
2	1	15,9±1,9	26,5±2,0	5,01±0,9	44,945
	5	6,25±1,75	9,47±0,90	12±4,2	224,73
	10	2,25±0,25	6±0,9	14±2,1	672,94
3	1	22,9±1,6	26,1±0,65	6,71±0,45	749,95
	5	8,7±1,2	9,6±0,9	42±8,3	2999,8
	10	6,13±0,65	6,25±0,50	49,1±10,2	5999,6

Встановлено, що швидкість охолодження клітини на етапі кристалізації суспензії змінюється в декілька разів в залежності від її розташування у зразку. Швидкість охолодження біля внутрішньої стінки контейнера, як правило, на ділянці термограми ВС перевищує швидкість охолодження, що фіксується термопарою, розташованою на зовнішній стінці. При віддаленні клітин від стінки контейнера швидкість охолодження збільшується у декілька разів, що, можливо, пов'язано зі зменшенням теплоємності льоду у порівнянні з рідкою фазою і поліпшенням умов тепловіддачі по мірі збільшення кількості льоду у зразку. Швидкість

охолодження зразка, який повністю затвердів, відповідно до отриманих експериментальних даних практично не відрізняється від швидкості охолодження, що реєструється термометром опору, розташованим на зовнішній стінці контейнера. Розкид виміряних параметрів заморожування збільшується при підвищенні швидкості охолодження та розміру зразка.

Отримані експериментально термограми охолодження на етапі кристалізації суспензії *S. cerevisiae* у фізіологічному розчині апроксимуються функцією:

$$\frac{T - T_{k0}}{T_e - T_{k0}} = \exp \left[-\beta_3 \frac{t_e - t}{T_{k0} - T_e} - \gamma \frac{(t_e - t)^2}{(T_{k0} - T)^2} \right], \quad (1)$$

де $\beta_3 > 0$ (швидкість охолодження вважається позитивною величиною). Функція γ [°C/хв] визначається за наступною формулою:

$$\gamma \left(\beta, \frac{r}{R}, R \right) = 347,2 \left\{ 1 - \frac{9,6 \frac{r^2}{R^2} + 8,8 \frac{r}{R} - 12,9}{8 \frac{r^2}{R^2} + 6 \frac{r}{R} + 5} \frac{\beta}{\beta_M} + \frac{1,6 \frac{r^2}{R^2} + 3 \frac{r}{R} + 0,1}{8 \frac{r^2}{R^2} + 6 \frac{r}{R} + 5} \frac{\beta^2}{\beta_M^2} \right\} \times \left(1 - \frac{2R}{5R_M} \right) \times \left(1 - 2,5984 \frac{r}{R} + 1,6736 \frac{r^2}{R^2} \right) \quad (2)$$

де r – відстань точки, в якій вимірюється температура, від осі зразка; R – радіус зразка; β_M і R_M – мінімальні з використаних в експериментах значення швидкості охолодження на зовнішній поверхні контейнера і радіуса контейнера відповідно. Розраховане за формулою (2) значення γ наведено в табл. 1–3. При порівнянні експери-

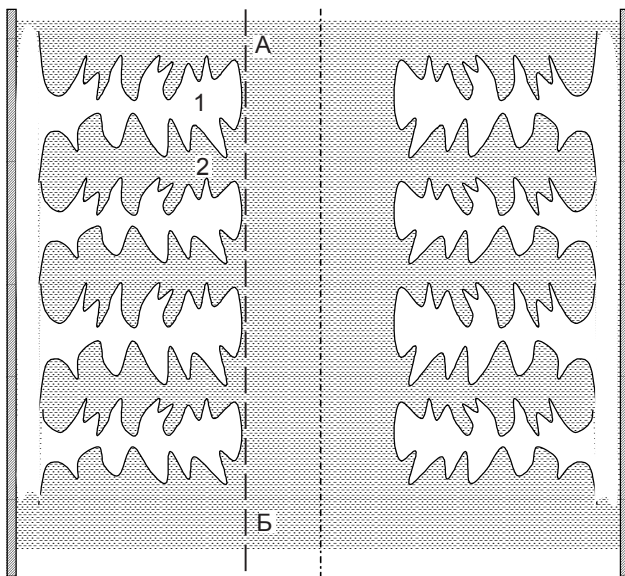


Рис. 4. Дендритний ріст кристалів льоду у циліндричному контейнері: 1 – лід; 2 – рідка фаза; А – Б – умовний фронт кристалізації.

Таблиця 3. Параметри t_{k0} , t_e і β_3 охолодження *S.cerevisiae* у фізіологічному розчині на етапі кристалізації в циліндричному контейнері з діаметром 10 мм в залежності від швидкості охолодження зовнішньої поверхні контейнера β і розташування термопар у зразку ($M \pm m$)

Номер термопар	Швидкість охолодження, °C/хв	t_{k0} , хв	t_e , хв	β_3 , °C/хв	γ (°C/хв) ²
1	1	0	14,8±1,95	6,72±0,9	20,008
	5	0	6,58±0,45	15±1	119,83
	10	0	4,4±0,25	14±2,1	477,12
3	1	12,1±1,9	15,2±2,3	8,4±2,1	999,94
	5	5,6±0,3	6,85±0,35	26±4	3999,7
	10	3,25±0,75	4,27±0,5	58±12	7999,5

ментально отриманих термограм з формул (1) і (2) встановлено, що вищевказані мінімальні значення швидкості охолодження цілком апроксимують експериментальні дані.

Отримані дані свідчать про необхідність перегляду існуючих уявлень щодо оптимального режиму охолодження клітинних суспензій. Необхідно з'ясувати, як збереженість певної клітинної суспензії залежить від розміру зразка, що заморожується, та швидкості охолодження. Виникає потреба в уточненні самого поняття оптимальної швидкості охолодження зразка порівняно великого об'єму, а також у розробці нових, більш точних вимог до визначення і подання оптимальних умов низькотемпературного консервування клітинних суспензій.

Висновки

1. Клітини, розташовані у різних точках зразка, на етапі кристалізації суспензії клітин охолоджуються з істотно різними режимними параметрами.

2. Неоднорідність температурних полів та швидкостей охолодження в контейнері порівняно великого розміру з точки зору двохфакторної теорії кріопшкодження клітин неминуче приводить до зменшення збереженості біооб'єкта у міру збільшення розміру зразка і швидкості охолодження.

3. Встановлено аналітичну функцію, що апроксимує поле температур суспензії *S.cerevisiae* у

фізіологічному розчині на етапі кристалізації в циліндричному контейнері в залежності від його діаметра і швидкості охолодження зовнішньої поверхні контейнера.

4. Значна частина клітин перед початком кристалізації позаклітинного розчину у безпосередній близькості від них досить тривалий проміжок часу (від t_A до t_{k0}) експонується при температурі T_{k0} . Тому при розробці методу низькотемпературного консервування доцільно завчасно визначити їх резистентність до гіпотермічного зберігання у відповідному кріозахисному середовищі.

Література

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– 144 с.
2. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells at supraoptimal rates // Cryobiology.– 1977.– Vol. 14, N2.– P. 251–272.
3. Thyrumata S., Ferrer M.S., Bruce A. et al. Cryopreservation of canina spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents // Cryobiology.– 2003.– Vol. 47, N1.– P. 109–124.
4. Yu I., Songsasen N., Godke R.A., Leibo S.P. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates // Cryobiology.– 2002.– Vol. 44, N1.– P. 62–78.

Надійшла 29.04.2008