

УДК 57.043-536.421.4:53.086

## МЕХАНИЗМ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ НУКЛЕАЦИИ ЛЬДА В КРИОБИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Л.Г.Кулешова

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61015 Харьков, ул. Переяславская, 23*  
Поступила в редакцию 27 марта 2006 г.

В работе методом мелких капель криомикроскопически исследован механизм нуклеации внеклеточного льда в биологической системе на основе лиофилизированной плазмы крови человека. Установлено, что первичное зародышеобразование в модельной системе в исследованном диапазоне переохлаждений почти полностью реализуется гетерогенным механизмом, вклад которого в реализацию фазового перехода составляет 98,7%. Показано, что частота зародышеобразования увеличивается как при увеличении скорости охлаждения системы, так и ее переохлаждения.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** биологическая система, нуклеация льда, криомикроскопия.

Специфичностью метода низкотемпературного консервирования биологических объектов является наличие фазового перехода «вода-лед». Однако образование и рост кристаллов льда в криобиологии рассматриваются как неизбежные факторы и изучаются лишь последствия тех физико-химических явлений, которые ими обусловлены. Между тем выяснение механизма возникновения зародышей новой фазы и механизма их дальнейшего развития имеет существенное значение, поскольку они определяют морфологию кристаллической структуры [1, 2], особенности которой коррелируют с жизнеспособностью клеток [3].

Основной переход «вода-лед» представляет собой сложный взаимосвязанный многостадийный процесс. Стадия первичного зародышеобразования предусматривает возникновение зародышей в среде еще не содержащей кристаллов кристаллизующего вещества. Эта стадия может реализоваться тремя механизмами: гомогенным или флуктуативным (за счет случайного соединения ионов, атомов, молекул в кристаллические зародыши - гомогенная нуклеация), гетерогенным (за счет образования зародышей на поверхности частиц нерастворимой твердой примеси в результате полимолекулярной адсорбции частиц кристаллизующего вещества - гетерогенная нуклеация), гетерофазным (за счет образования зародышей на аморфной поверхности раздела фаз жидкость-газ, жидкость-жидкость, жидкость-твердое тело - гетерофазная нуклеация) [1,2].

Основная трудность изучения механизма нуклеации льда в криобиологических системах заключается в том, что непосредственное определение числа центров кристаллизации в клеточных системах невозможно ввиду большой линейной скорости кристаллизации воды и малых размеров кристаллических зародышей. Установлено, что при температуре  $-0,9^{\circ}\text{C}$  линейная скорость кристаллизации воды составляет 230 мм/мин, а при  $-7^{\circ}\text{C}$  она возрастает на порядок и составляет 2800мм/мин [1]. Капля диаметром 1мм замерзает при  $-41^{\circ}\text{C}$  за 0,6с при этом скорость или частота образования зародышей  $I$  составляет  $10^{23}$  ядер/см<sup>3</sup>с [4]. При температуре  $-1^{\circ}\text{C}$  для построения кристаллической решетки льда необходимо  $4 \times 10^6$  молекул, в то время как при температуре гомогенной нуклеации чистой воды (около  $-40^{\circ}\text{C}$ ) критический размер зародыша составляет  $10\text{Å}$ , что соответствует флуктуации примерно из 100 молекул воды [5]. Уменьшение критического размера зародышей связано с уменьшением работы их образования при увеличении переохлаждения [1,2] Так, при температуре  $-10^{\circ}\text{C}$  работа образования зародышей кристаллов льда составляет  $24 \times 10^{-14}$  эрг, а при температуре  $-40^{\circ}\text{C}$  она падает до  $2 \times 10^{-14}$  эрг [6].

Попытка отдельно изучить приведенные выше механизмы нуклеации привели к созданию так называемого капельного метода [7], при использовании которого жидкость диспергируют в дифференциальной среде и наблюдают за появлением кристаллов в отдельных каплях малых размеров (до 100 мкм). При таком разбиении частицы примеси макроскопического размера, на которых возможна гетерогенная нуклеация, попадают лишь в отдельные капли. При охлаждении эти капли кристаллизуются раньше других, то есть при меньших переохлаждениях. Основная же масса капель достигает максимального переохлаждения и, как полагают, кристаллизуется в результате гомогенного образования зародышей. В отличие от переохлаждений, при которых происходит гетерогенное затвердевание капель, максимальное переохлаждение хорошо воспроизводится, что и позволяет судить о том или ином характере зарождения.



Строго говоря, максимальное переохлаждение не является величиной, позволяющей найти частоту зарождения ( $I$ ,  $\text{см}^{-3}\text{с}^{-1}$ ), так как акт образования зародыша осуществляется в результате флуктуации и является, следовательно, случайным. Вероятность его совершения за время  $dt$  есть  $IVdt$  – где  $V$  объем капли. Поэтому доля капель, не замерзших к моменту  $\tau$ , равна  $\exp(-IV\tau)$ , а доля замерзших  $1-\exp(-IV\tau)$ . Экспериментальная зависимость числа капель, не замерзших к моменту  $\tau$ , действительно падает экспоненциально со временем, подтверждая случайность образования зародышей. Зная объем каплей  $V$ , из хода экспериментальных кривых находят скорость или частоту нуклеации  $I$  [8]. Анализ характера замерзания ансамбля каплей статистически эквивалентен многократному проведению опытов с одной каплей. Таким образом, использование методики малых каплей и статистических методов обработки времени жизни переохлажденных каплей позволяет разделить гомогенное и гетерогенное зарождение [8, 9].

Описанный метод физического моделирования был использован авторами [10, 11] для исследования кинетики кристаллизации переохлажденных каплей крови. Ими был разработан статистический метод определения числа центров кристаллизации посредством счета замерзших и незамерзших каплей крови в модельной системе. Исходя из вида функции экспериментального распределения по размерам каплей крови и теорий гомогенного и гетерогенного зародышеобразования, им удалось получить аналитическое выражение для кинетических характеристик процесса изотермической кристаллизации переохлажденных каплей. Кинетические уравнения позволили авторам [10,11] на основании экспериментальных данных определить скорость образования центров кристаллизации в единице объема при различных переохлаждениях каплей крови, однако не позволили сделать вывод о наиболее вероятном механизме их зарождения.

Цель работы - изучить механизм нуклеации льда в модели внеклеточной среды биологической суспензии.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами в качестве индифферентного дисперсионного агента был использован гептан. Дисперсная фаза, моделирующая внеклеточную среду, представляла собой раствор лиофилизированной плазмы крови человека группы 0(1). Раствор сухой плазмы крови человека и гептан смешивали в объемном соотношении 1:1. В качестве стабилизатора эмульсионной системы был выбран стандартный фосфатидилхолин. Эмульсию получали путем механического встряхивания пробирки с указанными компонентами. Аликвоту эмульсии пробоотборником переносили в кювету, установленную в рабочей камере криомикроскопа. Микроскопически препарат представлял собой монослой изолированных каплей размером 28-56мкм (рис. 1).

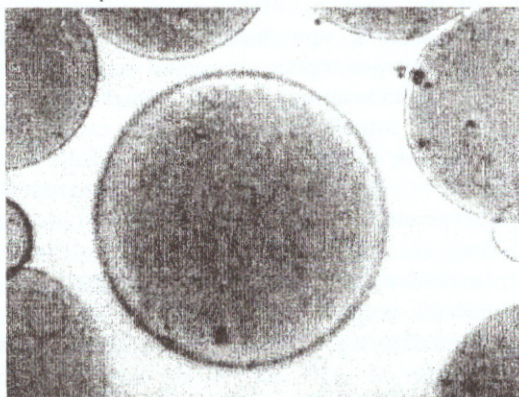


Рис.1. Эмульсионная модельная система в поле зрения криомикроскопа. Увеличение при съемке  $\times 120$

Экспериментально было изучено влияние двух факторов на кинетику процесса кристаллизации модельной системы: скорости охлаждения и переохлаждения. В первом случае модельную систему охлаждали с различными скоростями (14,5, 12,0, 8,7, 3,9, 1,6 $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) до одной и той же температуры экспозиции ( $-25^{\circ}\text{C}$ ); во втором случае модельную систему охлаждали с постоянной скоростью (4,6 $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) до различных температур экспозиции ( $-22,5$ ,  $-25,0$ ,  $-27,5$ ,  $-30,0^{\circ}\text{C}$ ), обеспечивая таким образом различное переохлаждение в эмульсионной системе. Кинетику процесса изотермической кристаллизации каплей при заданной температуре фиксировали фотографически. Затем подсчитывали процент закристаллизовавшихся каплей во времени, что являлось количественной характеристикой процесса первичного зародышеобразования. Поскольку рост кристаллов происходит значительно быстрее, чем их

образование, момент появления видимого кристалла вполне корректно отождествлять с моментом образования центра кристаллизации.

Точность результатов, выраженная величиной стандартного отклонения, составляла  $\pm 4,4\%$  в доверительном интервале 95%.

Для обработки экспериментальных данных было использовано уравнение, описывающее процесс зародышеобразования в каплях эмульсии [12]. Уравнение выведено в предположении, что в каждой капле раствора процесс первичного зародышеобразования может одновременно и независимо



## Механизм внеклеточной нуклеации льда в криобиологических системах

реализоваться тремя путями: гетерогенным, флуктуативным и гетерофазным. В общем виде уравнение имеет следующий вид:

$$\alpha = 1 - \frac{2}{3} \int_0^{\infty} \exp \left\{ -\frac{2}{3} V - mV [1 - \exp(-I_k \tau)] - \left( I_v V + I_s V^{\frac{2}{3}} \right) \tau \right\} dV, \quad (1)$$

где  $\alpha$  - доля закристаллизовавшихся капель эмульсии;  $V$  - относительный размер капли: отношение кубов фактического размера капли  $r$  к наиболее вероятному  $r_0$ ;  $m$  - среднее число твердых примесей в капле характеристического размера:  $m = \frac{\pi}{6} r_0^3 n$ ;  $\frac{\pi}{6} r_0^3$  - характеристический объем капли,  $n$  - частичная концентрация твердых примесей;  $I_k$  - частота зародышеобразования на твердой примеси;  $I_v$  - частота флуктуативного зародышеобразования в капле характеристического размера;  $I_s$  - частота гетерофазного зародышеобразования в капле характеристического размера;  $\tau$  - время.

Уравнение (1) упрощается при вводе некоторых ограничений. Если зародышеобразование происходит в каплях определенной размерной фракции, то

$$\alpha = 1 - \exp \left\{ -mV [1 - \exp(-I_k \tau)] - \left( I_v V + I_s V^{\frac{2}{3}} \right) \tau \right\}; \quad (2)$$

Если нет основания предполагать, что гетерофазный механизм нуклеации не реализуется  $I_s = 0$ , то

$$\alpha = 1 - \frac{1}{1 + \frac{3}{2} I_v \tau + \frac{3}{2} m [1 - \exp(-I_k \tau)]} \quad (3)$$

Параметры уравнений (2) и (3) были получены методом нелинейного оценивания Маркуардта [13].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 приведены экспериментальные данные о кинетике процесса зародышеобразования в плазме крови человека в зависимости от скорости охлаждения и переохлаждения модельной системы.

Таблица 1

Влияние скорости охлаждения и температуры экспозиции на кинетику зародышеобразования в плазме крови человека

Скорость охлаждения, °С/мин	Температура экспозиции, °С	Доля закристаллизовавшихся капель в % за время в мин					
		1	2,5	5	7,5	10	12,5
4,5	-22,5	10,0	12,0	18,5	18,0	23,5	24,0
4,5	-25,0	25,5	28,5	30,0	32,0	33,5	35,0
4,5	-27,5	38,0	41,5	42,5	42,0	42,0	43,0
4,5	-30,0	54,0	56,0	56,5	58,5	59,5	59,0
1,6	-25,0	19,5	25,0	28,0	29,5	30,0	30,5
3,9	-25,0	20,0	26,6	28,5	30,5	30,0	32,0
8,7	-25,0	38,5	43,5	43,5	44,0	44,5	45,0
12,0	-25,0	54,0	56,0	56,5	60,0	60,5	60,0
14,5	-25,0	61,0	65,0	65,5	66,0	65,5	65,5

Рисунок 2 (а и б) иллюстрирует характер закристаллизовывания модельной системы в зависимости от переохлаждения. Видно, что при переохлаждении  $\Delta T = 21,9^\circ\text{C}$  рост возникших зародышей кристаллов льда происходит в условиях близких к равновесным о чем свидетельствует структура равновесного фронта кристаллизации (рис.2а). При увеличении переохлаждения системы ( $\Delta T = 29,4^\circ\text{C}$ ) фронт кристаллизации теряет устойчивость, и из исходно равновесного превращается в дендритный (рис.2б), что связано с возникновением температурных градиентов и сменой механизма роста кристаллов льда.[2]



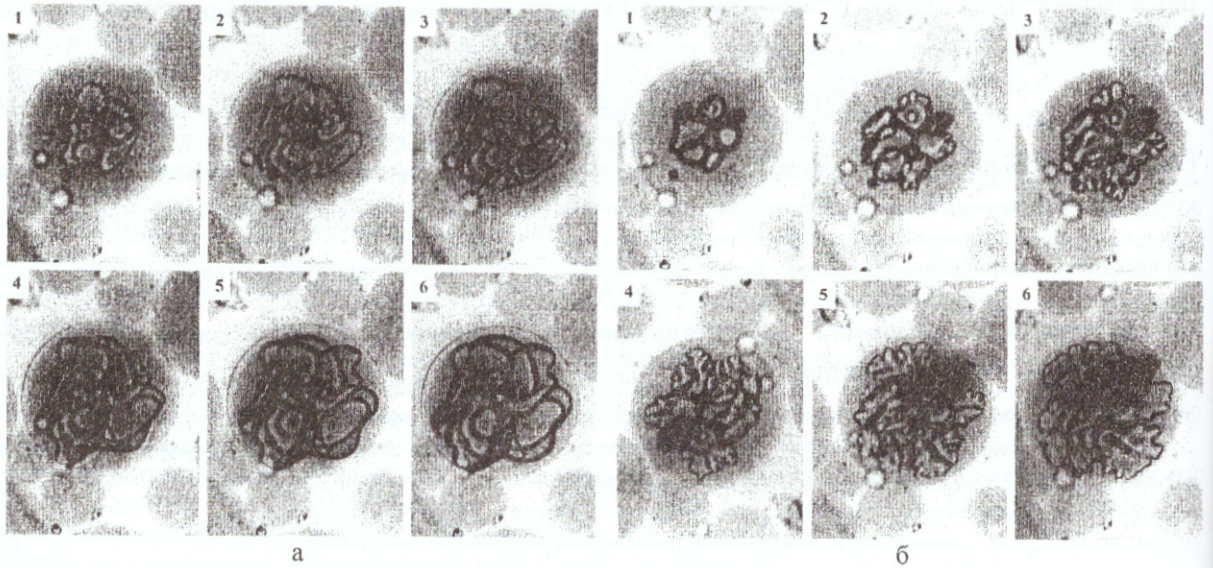


Рис.2. Морфология кристаллов льда в модельной системе в зависимости от переохлаждения: а.  $\Delta T=21,9^{\circ}\text{C}$ ; б.  $\Delta T=29,4^{\circ}\text{C}$ . Увеличение при съемке  $\times 120$

В таблицах 2 и 3 приведены количественные оценки ряда параметров, входящих в уравнения (2) и (3). Сравнение значений частот гетерогенного и флуктуативно-гетерофазного зародышеобразования, рассчитанных по уравнению (2), а также значений частот гетерогенного и флуктуативного зародышеобразования, рассчитанных по уравнению (3) (табл.2), показывает, что в среднем вклад в первичное зародышеобразование гетерогенного механизма составляет 98,7%. Количество активных твердых примесей в системе в исследованном диапазоне переохлаждений порядка  $10^6-10^7$  в 1 мл и зависит от переохлаждения: с увеличением последнего количество активных примесей возрастает (табл.2). Активность твердых примесей, характеризуемая частотой гетерогенного зародышеобразования на поверхности одной примеси, также возрастает с увеличением переохлаждения системы (табл.2).

Как следует из анализа данных таблицы 3, при увеличении скорости охлаждения системы также увеличивается как количество активных примесей в ней, так и их активность. Акт образования зародыша кристалла критического размера у частицы твердой примеси является результатом полимолекулярной адсорбции частиц кристаллизующего вещества на поверхности этой примеси. Характер адсорбции зависит как от свойств поверхности примеси, так и от свойств среды, в которой этот процесс происходит [1,2]. Вполне понятно, что увеличение скорости охлаждения модельной системы может повлиять только в сторону уменьшения адсорбционной активности поверхности частиц, поскольку в этом случае сокращается время, необходимое для образования адсорбционных слоев. Однако полученные данные противоречат этому, поскольку наблюдаемое увеличение количества активных примесей и их активности должно быть следствием повышения адсорбционной активности поверхности примесей. Установленный факт позволил предположить, что скорость охлаждения может влиять на процессы, происходящие в исследуемой системе еще в жидкой фазе, которые и определяют характер адсорбции. Известно, что вода представляет собой размытый тепловым движением вариант структуры льда [14]. Ближняя упорядоченность расположения частиц выражена в воде, являющейся сильно ассоциированным веществом, лучше, чем в других жидкостях. Упорядоченность и число водородных межмолекулярных связей в воде возрастает с понижением температуры [6]. Следовательно, наличие льдоподобной структуры в жидкой фазе облегчает фазовый переход «жидкость – кристалл». Поскольку плазма крови имеет сложный белково-солевой состав [15] при взаимодействии ее компонентов с водной фракцией возможно образование структурных комплексов и искажение льдоподобного каркаса. При уменьшении скорости охлаждения в жидкой фазе исследуемой системы могут более полно завершиться процессы структурирования ее частиц, а образовавшиеся структуры хуже адсорбироваться на твердых примесях, результатом чего и является замедление процесса первичного зародышеобразования. Для выяснения возможной природы образующихся структур при небольших скоростях охлаждения была исследована кинетика первичного зародышеобразования в каплях чистой воды и растворов солей, имитирующих солевой состав плазмы крови человека. Результаты показали, что вариации скорости охлаждения в пределах  $1,5-15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  не влияют на процессы зародышеобразования в чистой воде и солевых растворах. Следовательно, можно предположить, что при пониженных скоростях охлаждения более полно успевают развиться структуры воды и органических составляющих плазмы крови человека (белков, глюкозы, полисахаридов и др.), которые связывают воду и таким образом тормозят процессы



Таблица 2  
Оценка параметров уравнений (2) и (3) из экспериментов по влиянию температуры экспозиции (величины переохладения) на кинетику первичного зародышеобразования в плазме крови человека

скорость охлаждения системы, °C/мин	температура экспозиции, °C	переохлаждение системы, °C	Расчетные параметры по уравнению (2)			Расчетные параметры по уравнению (3)				
			частота гетерогенного зародышеобразования в 1 мл $I_k \times n \times 10^6$ , мин <sup>-1</sup> ·мл <sup>-1</sup>	частота флукутативного и гетерофазного зародышеобразования в 1 мл $\frac{6(I_V + I_S V^i)}{\pi \rho_0^3} \times 10^4$	дисперсия расч. $S^2 \times 10^{-4}$	частота гетерогенного зародышеобразования в 1 мл $I_k \times n \times 10^6$ , мин <sup>-1</sup> ·мл <sup>-1</sup>	частота флукутативного зародышеобразования в 1 мл $\frac{6I_V}{\pi \rho_0^3} \times 10^4$ , мин <sup>-1</sup> ·мл <sup>-1</sup>	число активных примесей в 1 мл $n \times 10^6$	частота гетерогенного зародышеобразования на твердой примеси $I_k$ , мин <sup>-1</sup>	дисперсия расч. $S^2 \times 10^{-4}$
4,6	-22,5	21,9	3,05	9,99	5,1	2,78	8,37	4,21	0,66	3,6
4,6	-25,0	24,4	11,51	12,48	5,4	9,98	12,14	7,28	1,37	4,9
4,6	-27,5	26,9	23,87	19,10	0,58	21,09	3,25	11,29	1,87	0,7
4,6	-30,0	29,4	45,27	25,20	5,3	37,98	11,20	17,34	2,19	12,7

Таблица 3.

Оценка параметров уравнения (3) из экспериментов по влиянию скорости охлаждения на кинетику первичного зародышеобразования в плазме крови человека

скорость охлаждения системы, °C/мин	температура экспозиции, °C	Расчетные параметры по уравнению (3)				
		частота гетерогенного зародышеобразования в 1 мл $I_k \times n \times 10^6$ , мин <sup>-1</sup> ·мл <sup>-1</sup>	частота флукутативного зародышеобразования в 1 мл $\frac{6I_V}{\pi \rho_0^3} \times 10^4$ , мин <sup>-1</sup> ·мл <sup>-1</sup>	число активных примесей в 1 мл $n \times 10^6$	частота гетерогенного зародышеобразования на твердой примеси $I_k$ , мин <sup>-1</sup>	
1,6	-25,0	5,31	4,51	6,81	0,78	1,0
3,9	-25,0	5,92	5,10	7,13	0,83	1,2
8,7	-25,0	19,97	4,87	11,82	1,69	0,4
12,0	-25,0	29,34	17,91	17,26	1,70	22,2
14,5	-25,0	38,13	2,61	22,04	1,73	2,9



зародышеобразования. При увеличении скорости охлаждения эти процессы не успевают завершиться в полной мере, с чем, возможно, и связано увеличение числа активных примесей и их активности, обуславливающие, увеличение скорости процесса зародышеобразования.

Таким образом, анализ рассчитанных параметров, входящих в уравнения (2) и (3), позволил получить информацию как о механизме нуклеации льда в модели внеклеточной среды, так и о характере влияния на него степени переохлаждения системы и скорости ее охлаждения.

### ВЫВОДЫ

Процесс нуклеации льда в плазме крови человека в исследованном диапазоне переохлаждений практически полностью протекает по гетерогенному механизму. Увеличение степени переохлаждения системы повышает активность твердых примесей, вызывающих зародышеобразование. Снижение скорости процесса зародышеобразования при снижении скорости охлаждения системы обусловлено более полным развитием структур воды и органических составляющих плазмы крови человека.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бакли Г. Рост кристаллов.- М.: Иностранная литература.- 1954.- 406 с.
2. Козлова О.Г. Морфолого-генетический анализ кристаллов.- М.: МГУ, 1991.-224 с.
3. Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Роль структуры внеклеточного льда в процессе криоконсервирования клеток // Моделирование криобиологических процессов.- Харьков.- 1988.- С. 25-34.
4. Беляев В.И. Об определении критического размера зародышевых кристаллов // Известия Академии наук СССР. Серия геофизическая.- 1960.- №8.- С. 1278-1281.
5. Самыгин Г.А. Причины вымерзания растений.- М.: Наука, 1974.- 192 с.
6. Розенталь О.М. О работе льдозарождения в воде // ЖСХ.- 1965.-Т.6, №4.- С. 635-636.
7. Turnbull D., Cech R.E. Microscopic observation of the solidification of small metal droplets // J. Appl. Phys.- 1950.- Vol.21, N8.- P. 804-810.
8. Козлов Г.А., Равдель А.А. Кинетика изотермической кристаллизации переохлажденных капель воды, составляющих дисперсную фазу эмульсии типа вода-масло // Коллоидный журнал.- 1971.- Т. 33, №6.- С. 847-853.
9. Чернов А.А., Гиваргизов Е.И., Багдасаров Х.С., Кузнецов В.А. Современная кристаллография. Том 3. Образование кристаллов.- М.: Наука, 1980.- 407 с.
10. Козлов Г.А., Теодорович В.И. Кинетика изотермической кристаллизации переохлажденных капель крови // Биофизика. – 1970. – Т. 15, №4. – С. 657-664.
11. Козлов Г.А., Теодорович В.И., Равдель А.А. Об образовании центров кристаллизации при замораживании крови с защитными веществами// Биофизика. –1967. - Т. 12, №3. – С. 483-488.
12. Мелихов И.В., Присяжнюк В.А. О нуклеации в диспергированных жидкостях // ЖФХ.- 1979.- Т. 43, №5.- С. 1108-1113.
13. Marquardt D. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters // J. Soc. Ind. Appl. Math.-1963.- Vol. 11, N2.- P. 431-435.
14. Зацепина Г.Н. Свойства и структура воды.- М.: МГУ, 1974.- 167 с.
15. Справочник по переливанию крови и кровезаменителей / Под. ред. О.К. Гаврилова.- М.: Медицина, 1982.- 303 с.