

УДК 57.043

## ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ ЛЬОДОУТВОРЕННЯ В РОЗЧИНАХ КРІОПРОТЕКТОРІВ МЕТОДОМ ТЕНЗОДИЛАТОМЕТРІЇ

Г.Л. Кирилюк, В.І. Рєзніков, Т.М. Гуріна

*Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015*

Надійшла до редакції 14 вересня 2006 р.

Встановлені формули, які дозволяють визначити, як змінюється об'ємна частка льоду і концентрація кріопротектора в рідкій міжкристалічній фазі при заморожуванні кріозахисного розчину в залежності від вихідної концентрації цього розчину та режиму охолодження. За допомогою тензодилатометричного метода визначені залежності відносного об'єму розчинів диметилсульфоксид – хлорид натрію – вода ( $n_{c0}=0,1; R=14$ ) та диметилсульфоксид – хлорид натрію – вода ( $n_{c0}=0,2; R=30$ ) від температури при заморожуванні зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  та  $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  і відтаванні зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ . Встановлені залежності об'ємної частки льоду та концентрації кріопротектора в рідкій фазі цих розчинів від температури. Отримані результати свідчать про те, що зі збільшенням швидкості охолодження розчину кріопротектора кількість льоду, що утворюється в ньому при заморожуванні, при одній і тій самій температурі зменшується, що, очевидно, викликано збільшенням відхилення від термодинамічної рівноваги між кристалами льоду та оточуючим їх водним розчином зі збільшенням швидкості охолодження. Розроблений теоретико-експериментальний підхід дозволяє на підставі тензодилатометричних вимірювань визначити залежність концентрації кріопротектора в заморожуваному кріозахисному розчині від температури.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** кріопротекторний розчин, льодоутворення, тензодилатометрія, зміна об'єму, диметилсульфоксид.

Основна маса кріопошкоджень біологічних об'єктів при низькотемпературному консервуванні пов'язана з утворенням льоду в клітинних суспензіях, що заморожуються. Внаслідок того, що густина льоду менше густини води приблизно на вісім відсотків, кристалізація клітинної суспензії приводить до виникнення значної механічної напруги у зразку, що заморожується, яка, в свою чергу, приводить до пошкодження клітин при розтріскуванні і за рахунок розриву біологічних мембран виникаючою механічною напругою.

### ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ

Розглянемо процес заморожування трьохкомпонентного розчину, який крім води містить також кріопротектор та електроліт, наприклад, хлорид натрію. Вихідний (до заморожування) склад такого розчину визначається масовою концентрацією кріопротектора в ньому

$$n_{c0} = \frac{M_{c0}}{M_{c0} + M_{e0} + M_{w0}} \quad (1)$$

де  $M_{c0}$ ,  $M_{e0}$ ,  $M_{w0}$  – відповідно маса кріопротектора, електроліту і води у вихідному розчині, а також параметром  $R = M_{c0}/M_{e0}$ , тобто відношенням маси кріопротектора до маси електроліту. В процесі заморожування в міру перетворення частини води в лід склад рідкої фази, що контактує з кристалами льоду, змінюється. Проте, оскільки кристали льоду, які утворюються при заморожуванні нашого водного розчину, не захоплюють ні молекули кріопротектора, ні молекули електроліту, поточні значення маси кріопротектора  $M_c$  та електроліту  $M_e$  в рідкій міжкристалічній фазі залишаються незмінними і рівними їх первісним значенням:

$$M_c = M_{c0}, M_e = M_{e0} \quad (2)$$

Умова (2) порушується тільки тоді, коли окрім льоду в розчині, що заморожується, утворюються кристали твердої фази, яка крім молекул води містить молекули розчиненої у воді речовини, наприклад, кристалогідрат  $\text{NaCl} \times 2\text{H}_2\text{O}$ . Експерименти показують, що при відносно високій вихідній концентрації кріопротектора в розчині "кріопротектор – електроліт – вода" внаслідок кінетичних ефектів кристалогідрати електроліту не утворюються у водному розчині, що кристалізується, аж до повного затвердіння заморожуваного зразка [1]. В цьому випадку умова (2) не порушується впродовж всієї



процедури заморожування. При цьому в силу (2) параметр  $R$  для рідкої фази розчину в процесі заморожування залишається незмінним.

Позначимо через  $V$  поточне значення об'єму зразка, що заморожується. Очевидно,

$$V = V_i + V_l \quad (3)$$

де  $V_l$  і  $V_i$  – відповідно поточні значення об'єму рідкої фази в заморожуваному зразку і об'єму, зайнятого льодом. Закон збереження повної маси розчину, що кристалізується, виражається рівностями

$$M_l + M_i = M_0 = \rho_{l0} V_0 = \rho_l V_l + \rho_i V_i \quad (4)$$

де  $M_l$  і  $M_i$  – відповідно поточні значення маси рідкої фази та маси льоду в заморожуваному зразку,  $\rho_l$  – густина рідкої фази,  $\rho_l$  – густина льоду,  $M_0$  – вихідна маса розчину,  $\rho_{l0}$  і  $V_0$  – густина та об'єм заморожуваного розчину при температурі  $T_0$ .

Комбінуючи (3) і (4), знаходимо для об'ємної частки льоду в заморожуваному розчині

$$\frac{V_l}{V_0} = \frac{\rho(T_0) - \rho(T)}{\rho_l - \rho(T)} - \frac{\rho(T)}{\rho_l - \rho(T)} \frac{\Delta V}{V_0} \quad (5)$$

Масова концентрація кріопротектора в рідкій фазі, що контактує з кристалами льоду, за визначенням є

$$n_c = \frac{M_c}{M_c + M_e + M_w} = \frac{M_{c0}}{M_{c0} + M_{e0} + M_w} \quad (6)$$

або, з урахуванням попередніх співвідношень,

$$n_c = \frac{M_{c0}}{M_{c0} + M_{e0} + M_{w0} - M_l} = \frac{n_{c0}}{1 - \frac{\rho_l V_l}{\rho_{l0} V_0}} \quad (7)$$

де  $\rho_{l0}$  і  $V_0$  – вихідна густина і початковий об'єм розчину, що кристалізується, в точці початку його кристалізації.

Формули (5) і (7) дозволяють визначити, як змінюється об'ємна частка льоду і концентрація кріопротектора в рідкій міжкристалічній фазі при заморожуванні кріозахисного розчину в залежності від вихідної концентрації цього розчину та режиму охолодження шляхом дилатометричних вимірювань, тобто за експериментально вимірною залежності відносного об'єму зразка  $V/V_0$  від температури [2]. При цьому припускається, що залежність густини льоду  $\rho_l$  і густини рідкої міжкристалічній фази  $\rho_i$  від температури відомі. Перша з цих залежностей добре відома і представлена, наприклад, в довіднику [3]. Вона може бути апроксимована лінійною залежністю  $\rho_l = 0,918 - 0,001T$ .

Покажемо, що залежність величини  $\rho_i$ , що фігурує в (5) і (7), від температури легко визначити за допомогою дилатометричних вимірювань наступним чином. По-перше, при фіксованій позитивній температурі  $T_0$  необхідно виміряти густину досліджуваного розчину, наприклад, шляхом зважування заданого об'єму цього розчину. По-друге, повільно охолоджуючи указаний розчин до температури, при якій збільшення його об'єму за рахунок утворення кристалів льоду в ньому стає зниклим, по відповідній дилатограмі необхідно визначити температуру початку кристалізації в охолоджуваному зразку і температуру його плавлення  $T_m$ , а також величину відносного зменшення об'єму зразка в порівнянні з його об'ємом  $V_0$  при вихідній температурі. Далі за формулою

$$\rho_i(T_m) = \rho_l(T_0) \frac{1}{1 + \frac{V(T_m) - V_0}{V_0}} \quad (8)$$



фізичний сенс якої є очевидним, визначасмо густину рідкої фази при температурі плавлення указанного розчину. На рис. 1 наведена початкова ділянка типової дилатограми заморожуваного потрійного водного розчину. Початку кристалізації у зразку відповідає точка А, температурі плавлення відповідає точка  $T_m$  на осі абсцис, початковій (до початку охолодження зразку) температурі відповідає точка  $T_0$ .

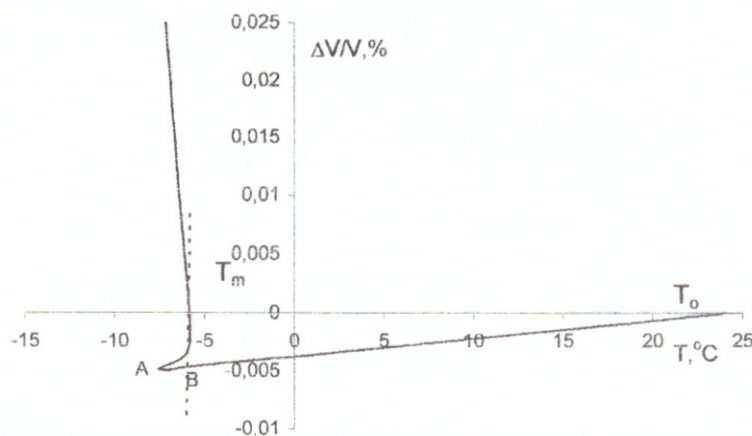


Рис. 1. Початкова ділянка типової дилатограми заморожуваного водного розчину.

В точці А в результаті утворення в охолоджуваному розчині кристалів льоду, густина якого менше густини водного розчину, з якого він утворюється, об'єм зразка починає різко збільшуватись. Точка В і відповідні їй температура  $T_m$  на указаній дилатограмі з великою точністю відповідає термодинамічно рівноважному стану між кристалами льоду і оточуючим їх рідким розчином. Вимірюючи відносну зміну об'єму заморожуваного розчину в області температур  $T_0 - T_m$ , легко визначити густину розчину при температурі  $T_m$ . За вказаним алгоритмом встановлено, що залежність щільності розчину диметилсульфоксид – хлорид натрію – вода ( $n_{c0}=0,1; R=14$ ) від температури вздовж діаграми плавлення є  $\rho(T_m)=1,003-0,00387T_m$ , а для розчину диметилсульфоксид – хлорид натрію – вода ( $n_{c0}=0,2; R=30$ ) -  $\rho(T_m)=1,0215-0,00167T_m$ .

### РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

На рис.2-5 подані визначені тензодилатометричним методом [2] залежності відносного об'єму розчину диметилсульфоксид – хлорид натрію – вода ( $n_{c0}=0,1; R=14$ ) і розчину диметилсульфоксид – хлорид натрію – вода ( $n_{c0}=0,2; R=30$ ) від температури при заморожуванні (криві 1) зі швидкістю охолодження  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  та  $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  і наступному відтаванні (криві 2) зразка  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ . Як видно, кристалізація у зразку в даному випадку приводить до збільшення об'єму замороженого розчину через перетворення води в лід.

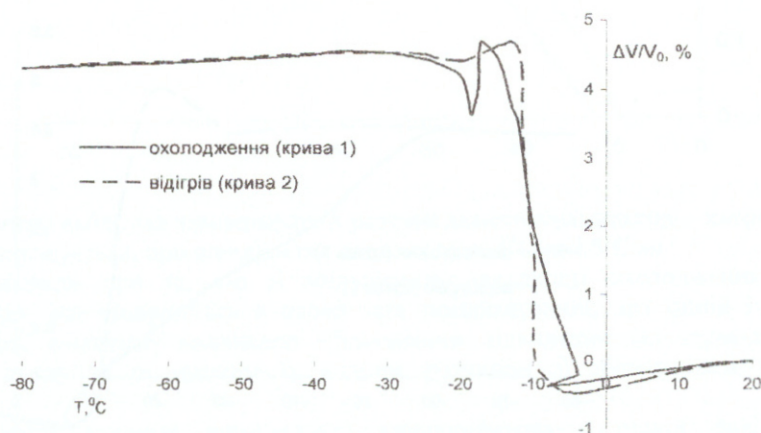


Рис. 2. Залежність відносного об'єму розчину диметилсульфоксид – хлорид натрію - вода ( $n_{c0}=0,1; R=14$ ) від температури при заморожуванні зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  та відтаванні зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ .

Рис. 5. Залежність відносного об'єму розчину диметилсульфоксиду - хлорид натрію - вода ( $n_0=0,2; R=30$ ) від температури при заморозкуванні зі швидкістю  $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  і відтаванні зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ .

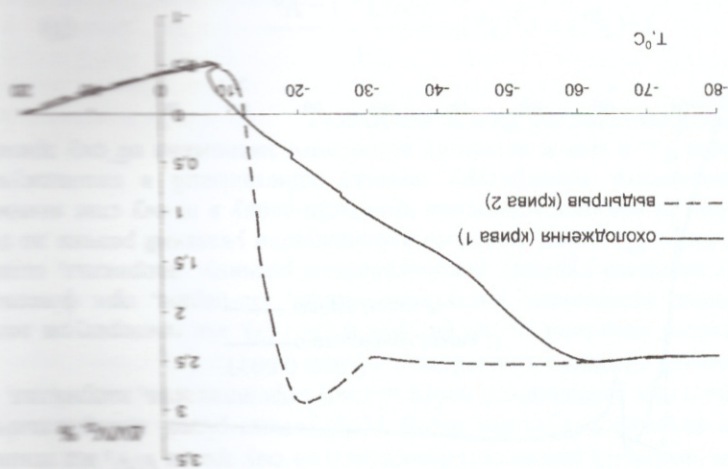


Рис. 4. Залежність відносного об'єму розчину диметилсульфоксиду - хлорид натрію - вода ( $n_0=0,2; R=30$ ) від температури при заморозкуванні зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  і відтаванні зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ .

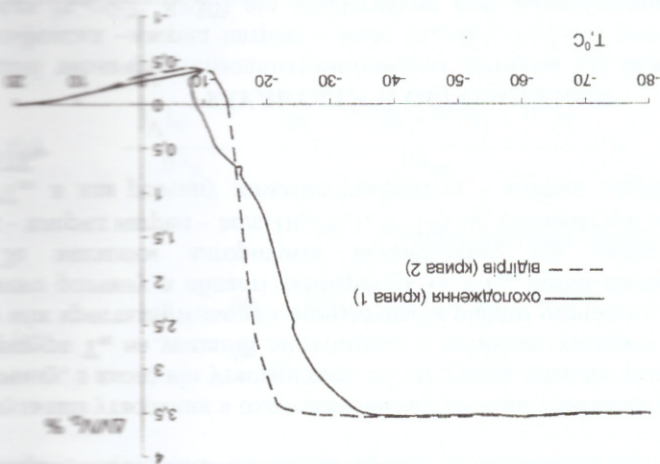
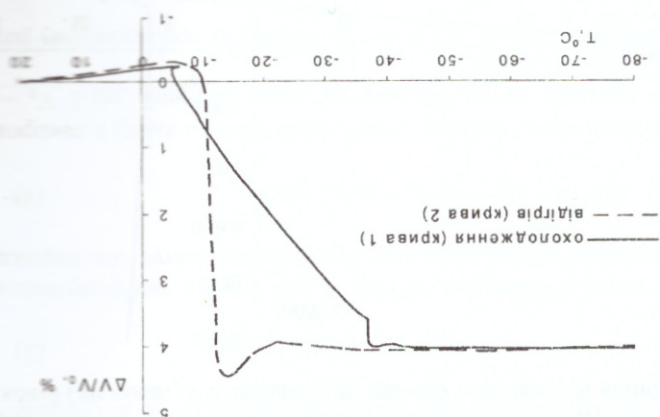


Рис. 3. Залежність відносного об'єму розчину диметилсульфоксиду - хлорид натрію - вода ( $n_0=0,1; R=14$ ) від температури при заморозкуванні зі швидкістю  $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  і відтаванні зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ .





## Теоретичне та експериментальне дослідження процесу льодоутворення...

На рис. 6, 7 подані розраховані за формулою (5) залежності об'ємної частки льоду в розчинах диметилсульфоксид – хлорид натрію - вода, що заморожуються, в залежності від температури.

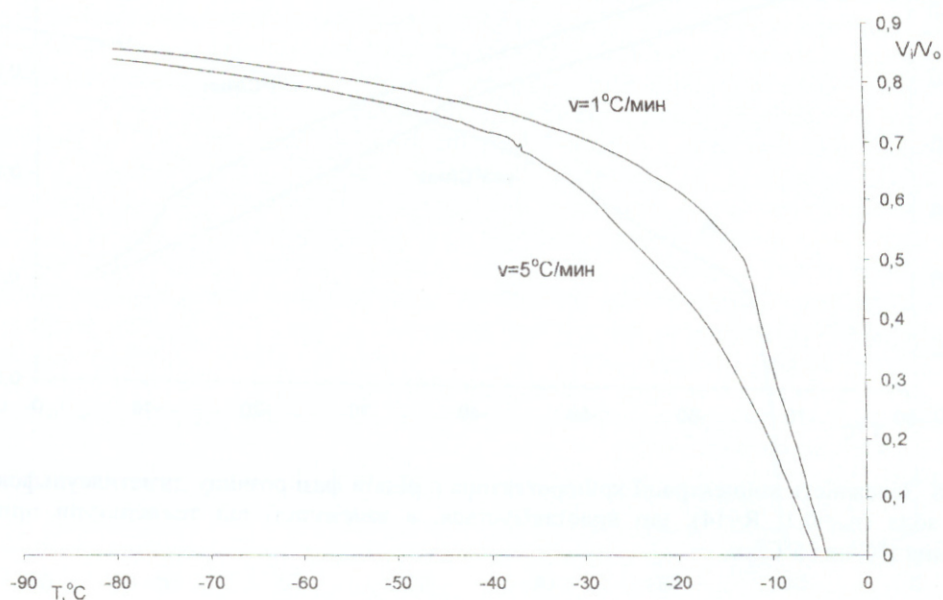


Рис. 6. Залежність об'ємної частки льоду від температури в розчині диметилсульфоксид – хлорид натрію – вода ( $n_{c0}=0,1$ ;  $R=14$ ), що заморожується, при швидкостях охолодження  $1^\circ\text{C}/\text{хв}$  і  $5^\circ\text{C}/\text{хв}$

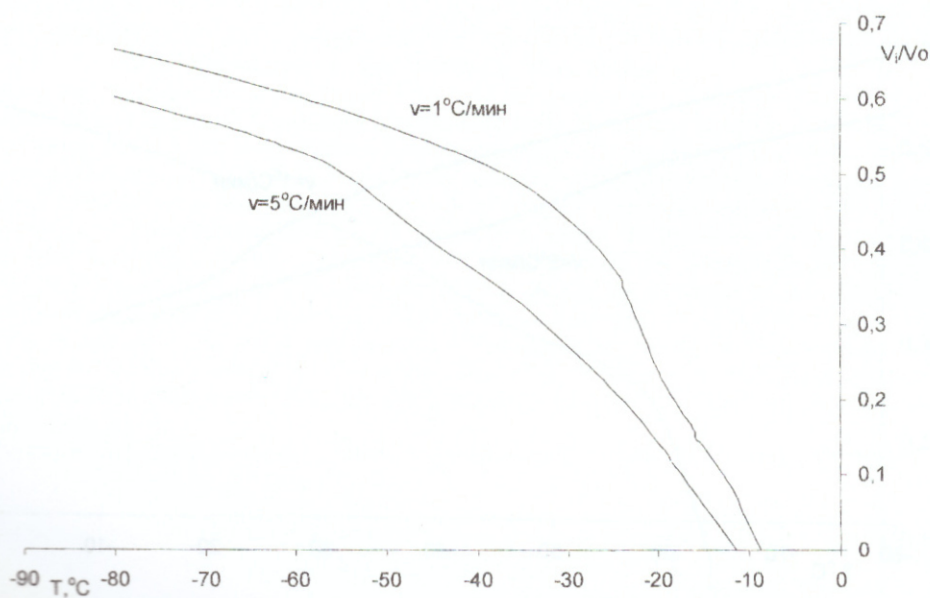


Рис. 7 Залежність об'ємної частки льоду від температури в розчині диметилсульфоксид – хлорид натрію – вода ( $n_{c0}=0,2$ ;  $R=30$ ), що заморожується, при швидкостях охолодження  $1^\circ\text{C}/\text{хв}$  і  $5^\circ\text{C}/\text{хв}$

Отримані результати свідчать про те, що зі збільшенням швидкості охолодження розчину криопротектора кількість льоду, що утворюється в ньому при заморожуванні, при одній і тій самій температурі зменшується, що, очевидно, викликано збільшенням відхилення від термодинамічної рівноваги між кристалом льоду та оточуючим їх водним розчином зі збільшенням швидкості охолодження.

На рис. 8 і 9 подані залежності концентрації криопротектора в рідкій фазі розчину диметилсульфоксид – хлорид натрію – вода, що кристалізується, в залежності від температури при швидкостях охолодження  $1^\circ\text{C}/\text{хв}$  та  $5^\circ\text{C}/\text{хв}$ .

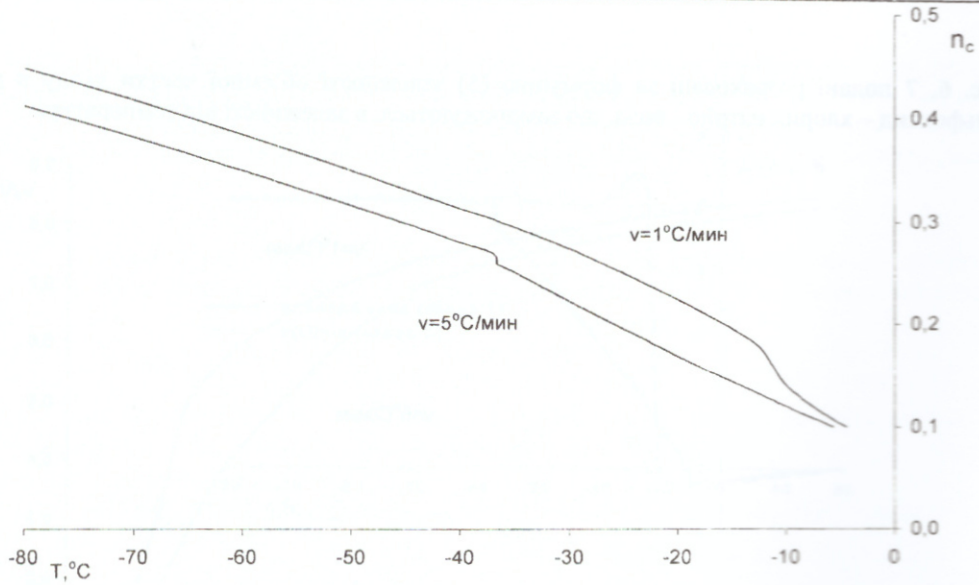


Рис. 8. Залежність концентрації кріопротектора в рідкій фазі розчину диметилсульфоксид -- хлорид натрію - вода ( $n_{c0}=0,1$ ;  $R=14$ ), що кристалізується, в залежності від температури при швидкостях охолодження  $1^\circ\text{C}/\text{хв}$  і  $5^\circ\text{C}/\text{хв}$ .

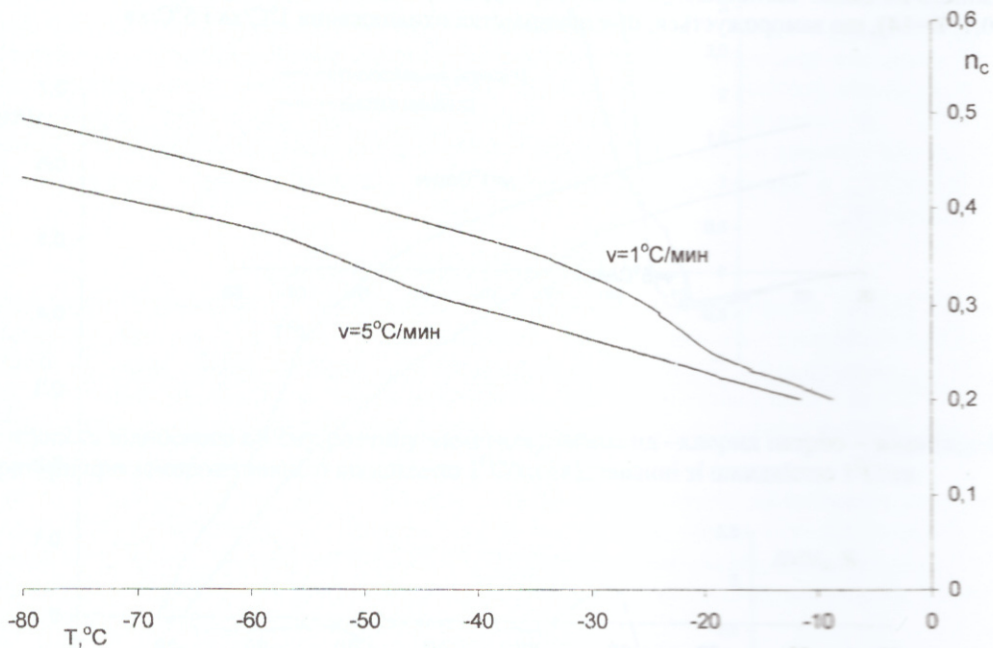


Рис. 9. Залежність концентрації кріопротектора в рідкій фазі розчину диметилсульфоксид -- хлорид натрію - вода ( $n_{c0}=0,2$ ;  $R=30$ ), що кристалізується, в залежності від температури при швидкостях охолодження  $1^\circ\text{C}/\text{хв}$  і  $5^\circ\text{C}/\text{хв}$ .

Як видно з представлених даних, зміна відносного об'єму суспензії при заморожуванні залежить від концентрації кріопротектора в позаклітинному середовищі та швидкості охолодження. Як збільшення концентрації кріопротектора, так і збільшення швидкості охолодження приводять до зменшення кількості льоду в розчині кріопротектора при його кристалізації, тобто забезпечує більш сприятливі з точки зору запобігання механічній руйнації клітин умови заморожування.

Очевидно, часткове склування розчину, розташованого між кристалами льоду і оточуючого клітини, сприяє їх виживанню. Проте, на стадії наступного відігрівання клітини можуть пошкоджуватись в результаті докристалізації розчину, що засклався, і відповідного їй збільшення об'єму при відтаванні (рис. 10, 11, злам А).



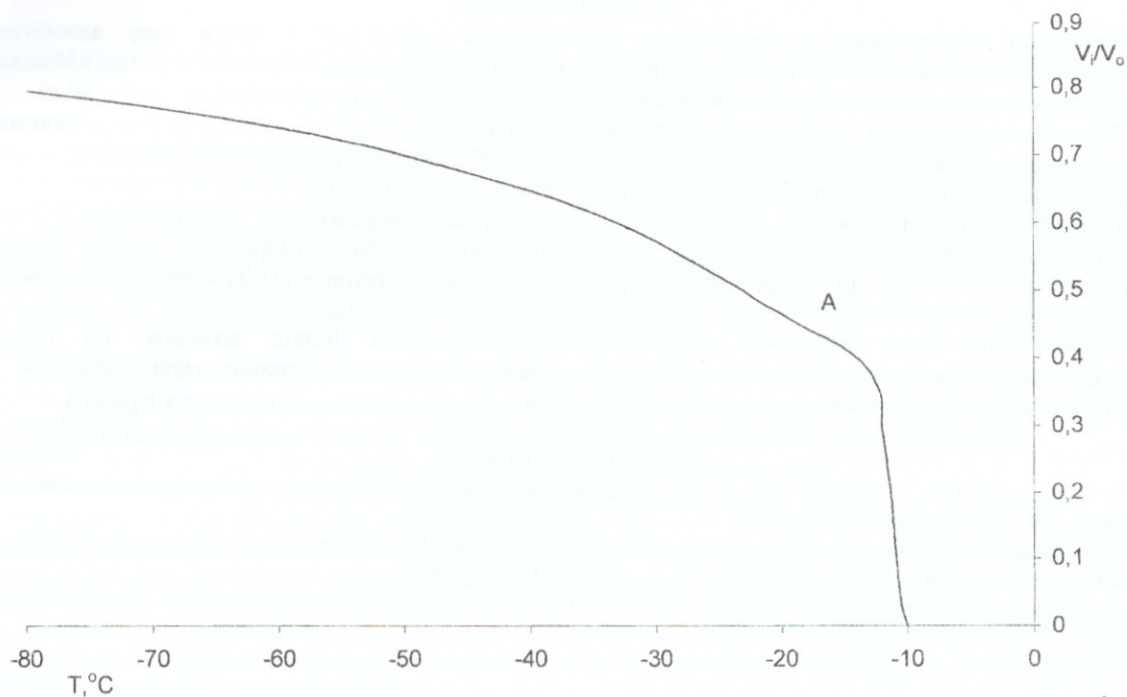


Рис. 10. Залежність об'ємної частки льоду від температури при відтаванні зі швидкістю  $1^\circ\text{C}/\text{хв}$  розчину диметилсульфоксид-хлорид натрію - вода ( $n_{c0}=0,1$ ;  $R=14$ )

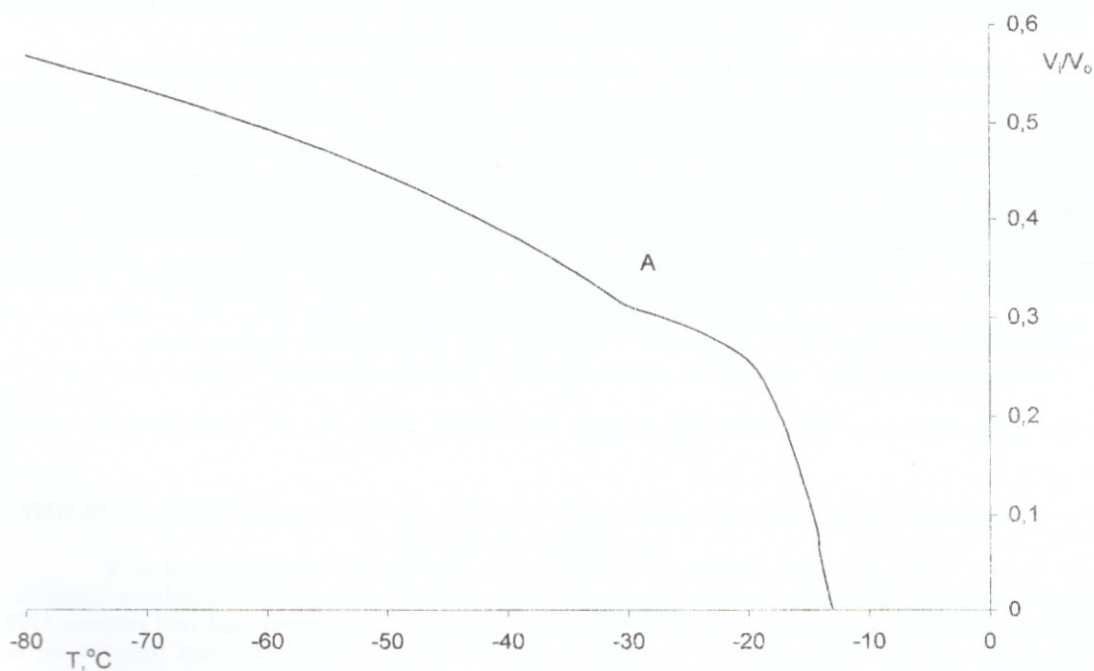


Рис. 11. Залежність об'ємної частки льоду від температури при відтаванні зі швидкістю  $1^\circ\text{C}/\text{хв}$  розчину диметилсульфоксид-хлорид натрію - вода ( $n_{c0}=0,2$ ;  $R=30$ )

Як видно, докристалізація льоду при відігріванні виникає при більшій швидкості охолодження розчину криопротектора на етапі заморожування.

### ВИСНОВКИ

Найбільш сприятливим з досліджених криозахисних середовищ з точки зору запобігання механічного пошкодження клітин є 20%-ний розчин диметилсульфоксиду, оскільки він зазнає найменшої зміни об'єму в процесі кристалізації і в найбільшому ступені сприяє склуванню евтектичної суміші.

Процеси кристалізації та плавлення розчинів кріопротекторів є термодинамічно не рівноважними, в результаті чого об'ємна частка льоду в них зменшується зі збільшенням швидкості охолодження на етапі заморожування, а в процесі відтавання може здійснюватись докристалізація.

Стабілізація значення об'єму розчину кріопротектора, що заморожується, на фіксованому рівні в області низьких температур не відповідає припиненню процесу льодоутворення в ньому, оскільки збільшення об'єму зразка, що заморожується, в результаті льодоутворення в ньому може компенсуватись за рахунок підвищення густини розчину, що контактує з кристалами льоду.

Розроблений нами змішаний теоретико-експериментальний підхід дозволяє на підставі тензодилатометричних вимірювань визначити залежність концентрації кріопротектора в заморожуваному криозахисному розчині від температури.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наук. думка, 1994. – 140 с.
2. Пушкарь Н.С., Осецкий А.И., Аненко В.И., Макаренко Б.И. Тензодилатометрия охлаждаемых растворов кріопротекторов и тканей. // Док. АН УССР, Сер. Б. – 1990. - №3. – с. 74-78.
3. Справочник по физико-техническим основам криогеники /под ред. Малкова М.П.-М.: Энергоатомиздат. 1985.-432с.