

УДК 57.043

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛИНЕЙНОГО И ДВУХСТУПЕНЧАТОГО РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

М.В. Останков

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

26 февраля 2008г.

Целью работы является теоретическое обоснование целесообразности применения для криоконсервирования эмбрионов млекопитающих нелинейных двухступенчатых режимов замораживания. На основе сравнения теоретической зависимости переохлаждения внутриклеточного раствора от времени (или температуры) при линейных и двухступенчатых режимах замораживания установлены и объяснены преимущества последнего для криоконсервирования эмбрионов млекопитающих. Теоретическая оценка оптимальной по двухфакторной теории криповреждения скорости охлаждения для двухклеточных эмбрионов мыши совпадает с экспериментальными данными.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: криоконсервирование, скорость охлаждения, быстрое двухступенчатое замораживание, эмбрион млекопитающего

подавляющее большинство процессов, которые протекают в природе, относятся к процессам активационного типа. Такие процессы (рис.1) описываются как переход из одного локального минимума энергии $U(x_{min1})$ в соседний локальный минимум $U(x_{min2})$

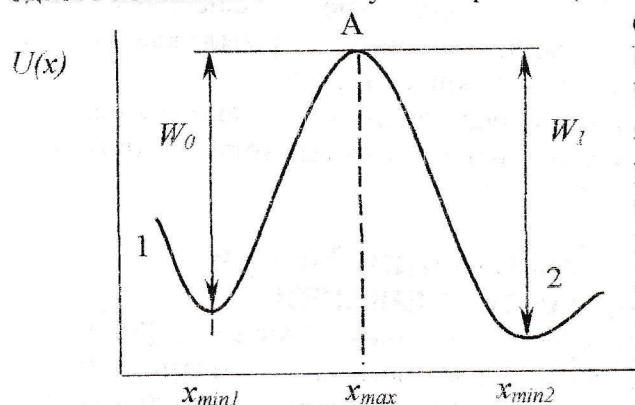


Рис.1 Зависимость энергетического потенциала системы от параметра x , который характеризует ее состояние

одного локального минимума энергии $U(x_{min1})$ в соседний локальный минимум $U(x_{min2})$ через разделяющий их энергетический барьер. Процессами указанного типа являются, например, изменение конформации макромолекулы, в частности, ее денатурация, химическая реакция или процесс образования зародышей кристаллов льда в охлажденном водном растворе. Среднее время перехода $T_{1 \rightarrow 2}$ из левого локального минимума в правый равно [1]

$$T_{1 \rightarrow 2} = \frac{\pi RT}{D \sqrt{\frac{d^2 U}{dx^2}(x_{min1}) \frac{d^2 U}{dx^2}(x_{max})}} \exp\left[\frac{U(x_{max}) - U(x_{min1})}{RT}\right] \quad (1)$$

где R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура. Параметр D имеет смысл коэффициента диффузии системы по координате состояния x .

Среднее время обратного перехода $T_{2 \rightarrow 1}$ из правого локального минимума в левый равно

$$T_{1 \rightarrow 2} = \frac{\pi RT}{D \sqrt{-\frac{d^2 U}{dx^2}(x_{\min 2}) \frac{d^2 U}{dx^2}(x_{\max})}} \exp\left[\frac{U(x_{\max}) - U(x_{\min 2})}{RT}\right] \quad (2)$$

Эти выражения является решением второго уравнения Понтрягина, которое получено из самых общих физических соображений и при довольно слабых ограничениях. Подробный вывод этого равенства и его обсуждение применительно к криобиологии изложены в работе [2].

Как видно, скорость любого процесса активационного типа резко падает с понижением температуры, что как раз и обуславливает целесообразность использования низких температур для длительного хранения биологических объектов без существенного нарушения их структуры. Так, например, при температуре хранения $+20^\circ\text{C}$ титр комплемента морской свинки падает на 50% за 12 часов, а при температуре хранения -25°C — за полгода [2]. Однако, для того, чтобы охладить биообъект до температуры, при которой любые процессы практически останавливаются, нужно преодолеть диапазон температур, где в замораживаемом объекте могут произойти кардинальные изменения его структуры, в том числе изменение агрегатного состояния. Считается, что именно с образованием кристаллов льда прямо или косвенно связаны основные факторы, вызывающие повреждение клеточных структур. Таким образом, подбор режимов охлаждения, при которых не происходит внутриклеточного льдообразования, лежит в основе любого способа криоконсервирования биобъектов. Поскольку вероятность внутриклеточного кристаллообразования непосредственно связана с величиной переохлаждения цитоплазмы в процессе замораживания, для сравнения эффективности линейных режимов охлаждения по сравнению с нелинейными необходимо сопоставить эффективное переохлаждение внутриклеточного раствора при различных режимах замораживания.

Целью работы является теоретическое обоснование целесообразности применения для криоконсервирования эмбрионов млекопитающих нелинейных двухступенчатых режимов замораживания.

ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЕ ЦИТОПЛАЗМЫ ПРИ ЛИНЕЙНОМ И ДВУХСТУПЕНЧАТОМ РЕЖИМЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

В соответствии с двухфакторной теорией криоповреждения П.Мейзура [3] в процессе кристаллизации клеточной суспензии на выживаемость клеток оказывают влияние два типа явлений и связанных с ними повреждающих факторов. Первый тип криоповреждений обусловлен контактом клеток со средой, которая в силу значительно повышенных по сравнению с нормой осмотического давления и йонной силы, значительного сдвига рН (как правило, в кислую сторону) оказывает цитотоксическое действие. Оно усугубляется по мере увеличения времени экспозиции клеток в области температур от начала внеклеточной кристаллизации в клеточной суспензии до полного затвердевания криоконсервируемого образца. Очевидно, неблагоприятное действие этих так называемых факторов раствора можно понизить, увеличив скорость охлаждения клеточной суспензии на этапе кристаллизации и тем самым уменьшив время контакта клеток с цитотоксической кристаллизующейся средой. Второй тип повреждений клеток на этапе кристаллизации клеточной суспензии согласно двух факторной теории криоповреждения вызывается образованием кристаллов льда внутри клеток, что, как правило, является губительным для клеток.

Теоретический анализ эффективности линейного и двухступенчатого режимов...

Применяя универсальное выражение для среднего времени перехода термодинамической системы из одного локального минимума в другой локальный к описанию процесса льдообразования, необходимо учесть, что в этом случае (слайд 2)

$$U(r) = \frac{4}{3} \pi r^3 \frac{1}{v_l} (\mu_l - \mu_w) + 4\pi r^2 \sigma \quad (3)$$

где r – радиус кристалла льда, v_l – объем моля льда, μ_l и μ_w – молярный химический потенциал воды и льда соответственно, σ – удельная энергия единицы поверхности раздела между твердой и жидкой фазами. При $\mu_w < \mu_l$ энергия системы монотонно возрастает с увеличением радиуса зародыша кристаллической фазы, и поэтому образование твердой фазы является термодинамически невыгодным. График зависимости $U=U(r)$ при $\mu_w > \mu_l$ имеет максимум, который энергии соответствует следующему значению радиуса зародыша кристаллической фазы:

$$r_{cr} = \frac{2\sigma v_l}{\mu_w - \mu_l} \quad (4)$$

С образованием поверхности раздела энергия системы всегда увеличивается, то есть $4\pi r^2 \sigma > 0$. При образовании зародыша льда с радиусом $r < r_{cr}$ в переохлажденной ($\mu_w > \mu_l$) жидкой фазе выигрыш в объемной энергии ($\sim \frac{4}{3} \pi r^3$) не компенсирует проигрыш в энергии за счет образования поверхности раздела. Однако, при $r > r_{cr}$ увеличение ($\sim r^2$) энергии за счет образования поверхности раздела фаз перекрывается уменьшением ($\sim r^3$) объемной энергии, так что с увеличением размера кристалла полная энергия раствора уменьшается. Поэтому, если размер кристаллического зародыша превышает значение r_{cr} , энергетически выгодным становится самопроизвольный рост количества кристаллической фазы. Для образования зародыша критического радиуса r_{cr} необходимо преодолеть энергетический барьер

$$U(r_{cr}) = \frac{4}{3} \pi r_{cr}^3 \frac{1}{v_l} (\mu_l - \mu_w) + 4\pi r_{cr}^2 \sigma = \frac{16\pi\sigma^3 v_l^2}{3(\mu_w - \mu_l)^2} \quad (5)$$

Следовательно, среднее время, необходимое для образования кристаллического зародыша критического размера, то есть до начала кристаллизации переохлажденной жидкости составляет

$$T_{cr} = \frac{kT}{4\sqrt{3}D\sigma} \exp \frac{16\pi\sigma^3 v_l^2}{3RT(\mu_w - \mu_l)^2} \quad (6)$$

где k – постоянная Больцмана, $D \sim \frac{1}{\eta}$ – коэффициент диффузии молекул воды в кристаллизующемся растворе, η – динамическая вязкость кристаллизующегося раствора.

Как видно, для того, чтобы кристаллизация в переохлажденном растворе началась за ограниченный промежуток времени, раствор должен быть обязательно переохлажден ($\mu_w - \mu_l > 0$). Как только начинается внеклеточная кристаллизация раствора, с точностью до эффектов, связанных с отличной от нуля кривизной кристаллов льда, химический потенциал воды во внеклеточном растворе $\mu_w^{out}(c_s^{out}, T, P)$ равен химическому потенциалу льда $\mu_l(T, P)$:

$\mu_w^{out}(c_s^{out}, T, P) = \mu_l(T, P)$. Эффективное переохлаждение же внутриклеточного раствора есть $\mu_w^{in}(c_s^{in}, T, P) - \mu_l(T, P)$ или, с учетом предыдущего равенства, равно $\mu_w^{in}(c_s^{in}, T, P) - \mu_w^{out}(c_s^{out}, T, P) = RT(c_s^{in} - c_s^{out})$. Из сказанного выше ясно, что, если концентрации растворенного вещества вне и внутри клеток в процессе замораживания остаются одинаковыми, то образование льда внутри клеток не происходит. Эффективное переохлаждение цитоплазмы $RT(c_s^{in} - c_s^{out})$, которое в соответствии с изложенными выше результатами является движущей силой кристаллообразования, одновременно является и термодинамической движущей силой обезвоживания клеток в процессе кристаллизации. Действительно, из неравновесной термодинамики прерывных систем известно, что объемный поток из клетки наружу, в результате которого значения концентраций растворенного вещества вне и внутри клеток приближаются одно к другому, описывается уравнением [4]

$$\frac{dV}{dt} = SL_p RT(c_s^{in} - c_s^{out}) \quad (7)$$

где $\frac{dV}{dt}$ - объем воды, покидающей клетку в единицу времени, S - площадь поверхности клеточной мембраны, L_p - коэффициент фильтрации клеточной мембраны. Характерное время, за которое происходит выравнивание концентраций вне и внутри клеток, то есть эффективное переохлаждение цитоплазмы спадает до нуля, в предположении, что суммарный объем клеток в клеточной суспензии пренебрежимо мал по сравнению объемом криозащитной среды, есть $\tau = \frac{1}{\frac{S}{V_0} L_p RT c_s^{out}}$, где $\frac{S}{V_0}$ -

поверхностно-объемное отношение клетки. Для того, чтобы избежать губительной для криоконсервируемых клеток внутриклеточной кристаллизации, достаточно, чтобы в процессе замораживания клеточной суспензии при каждой температуре в области кристаллизации $T_0 \div T_E$ (T_0 - температура, при которой начинается кристаллизация биобъекта, T_E - температура эвтектики) выполнялось условие: $\beta \sim \frac{T_0 - T_E}{\tau(T_E)}$, где β -

скорость охлаждения на этапе кристаллизации. При этом на любом участке кристаллизации клетки успевают обезвоживаться настолько, что в каждый момент времени $(c_s^{in} - c_s^{out}) \approx 0$ и, следовательно, вероятность внутриклеточной кристаллизации мала.

Как известно, эмбрионы млекопитающих имеют аномально низкие значения коэффициента фильтрации их мембран и сравнительно небольшое поверхностно-объемное отношение. Для двух клеточных эмбрионов мыши при температуре 20°C τ составляет около 4 минут. При эвтектической температуре, учитывая, что понижение температуры на каждые 10°C примерно в два раза понижает τ , получим $\tau(T_E) \approx 500$. Таким образом, для оптимального с точки зрения предотвращения внутриклеточной кристаллизации в эмбрионах мыши значения скорости охлаждения получаем оценку $\beta = 0,12^\circ\text{C}/\text{мин}$. Эта оценка вполне удовлетворительно согласуется с экспериментальными данными по криоконсервированию эмбрионов мыши под защитой 10% диметилсульфоксида [5]. Самым крупным недостатком этого способа

Теоретический анализ эффективности линейного и двухступенчатого режимов...

криоконсервирования является чрезвычайно длительная процедура замораживания - оттаивания особенно с учетом того, что более высокая сохранность эмбрионов при указанной скорости охлаждения достигается при настолько же медленном оттаивании.

Устранить указанный недостаток, то есть чрезвычайно длительную процедуру замораживания-оттаивания эмбрионов мыши, оказалось возможным, применяя так называемый способ быстрого двухступенчатого замораживания эмбрионов. При таком способе замораживания охлаждение на этапе кристаллизации начинается со скоростью $\sim 1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{мин}}$, которая значительно превышает значение оптимальной по двух факторной

теории скорости охлаждения. Однако, при некоторой заданной температуре из области умеренно низких температур (от -25°C до -35°C) охлаждение прекращается, и клетки выдерживаются при этой температуре в течение 10-30 минут, после чего они охлаждаются путем погружения контейнера с биоматериалом в жидкий азот.

Эффективность способа быстрого двухступенчатого замораживания лежат следующие соображения. Согласно двухфакторной теории криоповреждения быстрое охлаждение клеток в отличие от медленного приводит к значительному эффективному переохлаждению внутриклеточного раствора, в результате чего внутриклеточное льдообразование становится неизбежным. На рис 2а показаны рассчитанные по уравнениям неравновесной термодинамики зависимости переохлаждения цитоплазмы от температуры в процессе кристаллизации клеточной суспензии под защитой диметилсульфоксида для случаев, когда охлаждение производится с постоянной скоростью. Характерной особенностью этих зависимостей является монотонный рост переохлаждения внутриклеточного раствора с температурой (со временем), причем более резкий при более быстром охлаждении. Из этих расчетов, на первый взгляд, следует простой вывод: необходимо снизить скорость охлаждения до такого значения, при котором вплоть до полного затвердевания препарата эффективное переохлаждение цитоплазмы остается незначительным. Однако быстрое двухступенчатое замораживание представляет собой в некоторой степени альтернативный подход к предотвращению внутриклеточной кристаллизации. Для того, чтобы понять, почему двухступенчатое замораживание эффективно, рассмотрим рассчитанную по уравнениям неравновесной термодинамики зависимость переохлаждения цитоплазмы от температуры для случая, когда клеточная суспензия под защитой 10% диметилсульфоксида замораживается путем погружения контейнера в спиртовой криостат с умеренно низкой температурой на несколько десятков минут (рис.2, б).

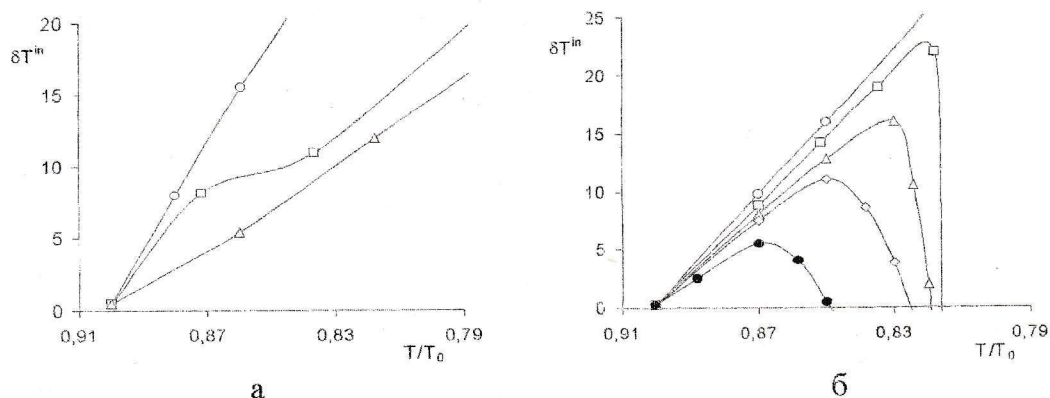


Рис.2 Зависимости переохлаждения цитоплазмы от температуры в процессе кристаллизации клеточной суспензии под защитой диметилсульфоксида для случаев, когда охлаждение производится с постоянной скоростью (а) и при ступенчатом замораживании (б)

Как видно, в отличие от случая охлаждения с постоянной скоростью переохлаждение внутриклеточного раствора при ступенчатом замораживании вначале достигает сравнительно небольшого максимума, а затем, как следует из уравнения (7), за время порядка τ падает до нуля. Таким образом, при быстром двухступенчатом замораживании с оптимально подобранными параметрами переохлаждение цитоплазмы достигает меньших максимальных значений, чем при постоянной скорости охлаждения, и после этого сравнительно быстро уменьшается. Оба эти эффекта приводят к уменьшению вероятности внутриклеточной кристаллизации и, следовательно, к повышению сохранности деконсервированных клеток.

ВЫВОДЫ

Поскольку при быстром двухступенчатом замораживании эмбрионов млекопитающих оптимальным является быстрый отогрев, процедура замораживания в целом оказывается значительно более короткой, чем при линейном режиме охлаждения. Кроме того, вследствие менее продолжительного, чем при линейном режиме охлаждения, контакта клеток с окружающим клетку гипертоническим раствором клетки, замороженные с использованием быстрого двухступенчатого режима, после возвращения в нормальную физиологическую среду являются более устойчивыми к постгипертоническому лизису.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ланда П.С. Автоколебания в системах с конечным числом степеней свободы. -М.:Наука. Гл. ред физ.-мат. лит.-ры.-1980.-360с.
2. Е.А.Гордиенко, Н.С.Пушкаръ. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. Киев: Наук. думка, 1994.- 143с.
3. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological objects//Science.-1970.-168. N3934/-p.939-949.
4. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. -М.:Мир.-1980.-341с.
5. Wood M.J., Farrant J. Preservation mouse embryos by two-step freezing//Cryobiology.-1980.-17.-p.178-180.