

УДК 577.35

## ЗАВИСИМОСТЬ ВЕРОЯТНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ЛЬДООБРАЗОВАНИЯ ОТ УРОВНЯ ПЕРЕСЫЩЕНИЯ В ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ ГРИБАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

**В.В. Марущенко, Е.А. Гордиенко**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,*

*ул. Переяславская, 23, 61015, Харьков,*

*e-mail: gordienko@gala.net*

Поступила в редакцию 15 апреля 2009 г.

Принята 18 мая 2009 г.

На основе общей термодинамической теории кристаллообразования в бинарных растворах определена зависимость между пересыщением внутриклеточного раствора и средним временем, по истечении которого при этом пересыщении в дрожжеподобных грибах *Saccharomyces cerevisiae* начинается внутриклеточная кристаллизация, при замораживании этих микроорганизмов. Вид функциональной зависимости предэкспоненциального множителя в выражении для вероятности внутриклеточного льдообразования от пересыщения внутриклеточного раствора установлен, исходя из общей теории процессов активационного типа. Поскольку вывод искомого выражения опирается только на общие термодинамические соображения, то полученный результат является универсальным и может быть применен к анализу процесса зародышеобразования в любом бинарном водном растворе. Специфические свойства замораживаемых клеток и водного внеклеточного раствора при этом могут быть учтены путем задания равновесной кривой плавления конкретного внеклеточного раствора и подбора (с помощью небольшого количества вспомогательных экспериментов) одной константы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** бинарный водный раствор, пересыщение, внутриклеточная кристаллизация.

В настоящее время общепринятым является представление о том, что наиболее значительные факторы криповреждения клеток непосредственно или косвенно связаны с образованием внутриклеточных кристаллов льда в замораживаемой клеточной суспензии [1,2]. Поэтому выяснение условий, при которых происходит внутриклеточное льдообразование при замораживании клеточных суспензий является необходимым шагом на пути к определению оптимальных режимов их замораживания.

Цель работы: на основе термодинамической теории кристаллизации растворов получить зависимость между пересыщением внутриклеточного раствора и средним временем, по истечении которого при этом пересыщении в дрожжеподобных грибах *Saccharomyces cerevisiae* начинается внутриклеточная кристаллизация.

Среднее время  $\langle t \rangle_i$ , которое необходимо для возникновения кристалла льда в пересыщенном бинарном водном растворе при постоянной температуре  $T$ , как и для любого процесса активационного типа, определяется выражением [3]

$$\langle t \rangle_i = C \exp \frac{\Delta F}{kT}$$

где  $\Delta F$  - изменение свободной энергии пересыщенного раствора при образовании кристалла льда в нем,  $k$  - постоянная Больцмана,  $T$  - абсолютная температура.

Предэкспоненциальный множитель  $C$  является медленно меняющейся по сравнению с  $\exp \frac{\Delta F}{kT}$  функцией пересыщения.

При образовании кристалла льда, который содержит  $N_i$  молекул воды, изменение свободной энергии рассматриваемой термодинамической системы равно

$$\Delta F = N_i(\mu_i - \mu_w) - V_i(P_i - P_A) + \sigma S_i \quad (1)$$

где  $\mu_i$  и  $\mu_w$  - отнесенный к одной молекуле химический потенциал воды в кристаллической и жидкой фазе соответственно,  $V_i$  - объем образовавшегося кристалла льда,  $P_i$  и  $P_A$  - гидростатическое давление внутри кристалла льда и в окружающем его растворе соответственно,  $\sigma$  - коэффициент поверхностного натяжения границы раздела твердой и жидкой фаз,  $S_i$  - площадь поверхности кристалла льда.

Если кристалл льда не содержит молекул вещества, растворенного в бинарном водном растворе, химический потенциал воды во льду зависит только от давления в кристалле  $P_i$  и температуры раствора  $T$ :

$$\mu_i = \mu_i(P_i, T) \quad (2)$$

Химический потенциал молекулы воды в окружающем кристалл водном растворе зависит от гидростатического давления  $P_A$ , температуры  $T$  и концентрации растворенного в нем вещества  $c_e$ :

$$\mu_w = \mu_w(P_A, T, c_e) \quad (3)$$

Разлагая функции  $\mu_i(P_i, T)$  и  $\mu_w(P_A, T, c_e)$  в ряд Тейлора вблизи состояния  $P_A, T, \tilde{c}_e$ , получаем

$$\mu_i(P_i, T) = \mu_i(P_A, T) + \left( \frac{\partial \mu_i}{\partial P} \right)_{P=P_A, T} (P_i - P_A) \quad (4)$$

$$\mu_w(P_A, T, c_e) = \mu_w(P_A, T, \tilde{c}_e) + \left( \frac{\partial \mu_w}{\partial c_e} \right)_{P=P_A, T, c=\tilde{c}_e} (c_e - \tilde{c}_e) \quad (5)$$

Считая, что форма кристалла является сферической, имеем

$$V_i = N_i v_i = \frac{4}{3} \pi R_i^3 \quad \text{и} \quad S_i = 4 \pi R_i^2 \quad (6)$$

где  $R_i$  - радиус кристалла льда,  $v_i$  - объем молекулы воды в кристаллической фазе.

Используя условие механического равновесия между сферическим кристаллом льда и окружающим его раствором (равенство Лапласа)  $P_i - P_A = \frac{2\sigma}{R_i}$  и термодинамическое равенство  $\frac{\partial \mu_i}{\partial P} = \nu_i$ , получаем вместо (4)

$$\mu_i(P_i, T) = \mu_i(P_A, T) + \frac{2\sigma\nu_i}{R_i} \quad (7)$$

Полагая, что  $c_e$  – это количество молей растворенного вещества в единице объема бинарного водного раствора, и используя выражение для химического потенциала воды в идеальном растворе  $\mu_W = -RT\nu_W c_e$ , где  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $\nu_W$  – молекулярный объем воды в жидкой фазе, получаем вместо (5)

$$\mu_W(P_A, T, c_e) = \mu_W(P_A, T, \tilde{c}_e) - RT\nu_W(c_e - \tilde{c}_e) \quad (8)$$

Используя (5) и (7), можно преобразовать (8) в равенство

$$\Delta F = N_i \left[ \mu_i(P_A, T) - \mu_W(P_A, T, \tilde{c}_e) + RT\nu_W(c_e - \tilde{c}_e) \right] + \sigma S_i \quad (9)$$

Как известно [4], равенство  $\mu_i(P_A, T) = \mu_W(P_A, T, \tilde{c}_e)$  определяет зависимость температуры плавления бинарного раствора от его исходной концентрации, то есть диаграмму плавления раствора. В соответствии с этим величину  $\tilde{c}_e$  в равенстве (9) можно трактовать как концентрацию водного раствора, при которой температура плавления водного раствора равна  $T$ . С учетом последнего равенства можно представить (9) в следующем виде

$$\Delta F = N_i RT\nu_W(c_e - \tilde{c}_e) + \sigma S_i \quad (10)$$

Из равенств (6) для сферического зародыша льда следует  $R_i = \left( \frac{3\nu_i}{4\pi} \right)^{\frac{1}{3}} N_i^{\frac{1}{3}}$  и  $S_i = 4\pi R_i^2 = (4\pi)^{\frac{1}{3}} (3\nu_i)^{\frac{2}{3}} N_i^{\frac{2}{3}}$ . С помощью последнего равенства можно преобразовать (10) к следующему виду

$$\Delta F = N_i RT\nu_W(c_e - \tilde{c}_e) + (4\pi)^{\frac{1}{3}} (3\nu_i)^{\frac{2}{3}} \sigma N_i^{\frac{2}{3}}$$

При условии  $c_e < \tilde{c}_e$  изменение свободной энергии рассматриваемой термодинамической системы при образовании в растворе сферического кристалла льда имеет экстремальное значение при количестве молекул воды в кристалле

$$N_i^* = \frac{32}{3} \frac{\pi v_i^2 \sigma^3}{(RT)^3 v_w^3 (\tilde{c}_e - c_e)^3}$$

При этом указанный экстремум является максимумом, поскольку

$$\left( \frac{\partial^2 \Delta F}{\partial N_i^2} \right)_{N_i=N_i^*} = - \frac{(RT)^4 v_w^4 (\tilde{c}_e - c_e)^4}{16(4\pi)^3 v_i^2 \sigma^3} < 0 \quad (11)$$

Поэтому величина  $\Delta F(N_i^*) = \frac{16\pi}{3} \frac{v_i^2 \sigma^3}{(RT)^2 v_w^2 (\tilde{c}_e - c_e)^2}$  играет роль энергии активации процесса льдообразования в переохлажденном бинарном растворе и среднее время, необходимое для образования кристалла льда в переохлажденном растворе, в соответствии с общей формулой (1) равно

$$\langle t \rangle_i = C \exp \left[ \frac{16\pi}{3kT} \frac{v_i^2 \sigma^3}{(RT)^2 v_w^2 c_0^2 \left( \frac{c_e - \tilde{c}_e}{c_0 - c_0} \right)^2} \right] \quad (12)$$

где  $c_0$  – исходная концентрация кристаллизующегося водного раствора.

Очевидно, при бесконечно большом пересыщении внутриклеточного раствора  $\tilde{c}_e - c_e$  время образования кристалла льда  $\langle t \rangle_i$  должно обращаться в нуль. Чтобы удовлетворить этому требованию, допустим  $C \approx \frac{A}{x^2}$ . Тогда

$$\langle t \rangle_i \approx \frac{A}{x^2} \exp \frac{B}{\left( \frac{T}{T_0} \right)^3 x^2} \quad (13)$$

где  $x = \frac{\tilde{c}_e - c_e}{c_0 - c_0}$ ,  $B = \frac{16\pi v_i^2 \sigma^3}{3kT_0 (RT_0)^2 v_w^2 c_0^2}$ ,  $T_0$  – Константа  $B$  при  $\frac{v_i}{v_w} \approx 1,08$ ,  $\sigma \approx 0,001$

Н/м,  $k \approx 1,38 \cdot 10^{-23}$  Нм/К,  $T_0 = 272,6$  К,  $R \approx 8,314$  Нм/моль · К,  $c_0 = 0,15 \cdot 10^3$  моль/м<sup>3</sup> равна 44,95.

Справедливость допущения  $C \approx \frac{A}{x^2}$  следует из общей теории процессов активационного типа, в соответствии с которой [5] предэкспоненциальный множитель  $C$  в равенстве (12) равен

$$C = \frac{2\sqrt{2\pi} (kT)^{\frac{3}{2}}}{D \frac{d\Delta F}{dN_i}(0) \sqrt{-\frac{d^2\Delta F}{dN_i^2}(N_i^*)}}$$

где  $D = const$ . С учетом (11) получаем

$$C = \frac{8\sqrt{2\pi}(4\pi)^{\frac{2}{3}}v_i\sigma^{\frac{3}{2}}}{D\frac{d\Delta F}{dN_i}(0)(kT)^{\frac{1}{2}}\tilde{v}_w^2c_0^2\left(\frac{\tilde{c}_e}{c_0} - \frac{c_e}{c_0}\right)^2},$$

что подтверждает сделанное допущение о зависимости преэкспоненциального множителя  $C$  в (12) от приведенного пересыщения  $x$ .

Для того, чтобы экспериментально определить константу  $A$  в выражении (13) мы впрыскивали в предварительно охлажденный на предметном столике криомикроскопа до  $-3,5^\circ\text{C}$  слой (толщиной порядка 100мкм) 10%-ного (объем/объем) водного раствора глицерина 1 мкл суспензии дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae* и отсчитывали время, которое прошло от момента впрыскивания до момента потемнения клеток. Явление потемнения клетки обусловлено рассеянием проходящего через нее света образующимися внутри клетки мелкими кристалликами льда. Поэтому отсчитываемое указанным образом время можно отождествить с искомым временем образования внутриклеточного кристалла в исследуемых клетках при эффективном переохлаждении  $272,6\text{K} - 269,65\text{K} = 2,95\text{K}$ , которое в соответствии диаграммой плавления внеклеточного раствора эквивалентно пересыщению  $x = 5,9$ . По установленному в результате этих экспериментов значению  $\langle t \rangle_i = 12 \pm 3\text{c}$  при  $x = 5,9$  определили значение константы  $A$ :  $A = 120$ .

На рис. 1 приведен вычисленный по (13) при  $A = 120$  и  $B = 44,95$  график зависимости времени, при котором начинается внутриклеточное льдообразование в дрожжеподобных грибах *Saccharomyces cerevisiae*, от величины пересыщения их внутриклеточного раствора  $x$ .

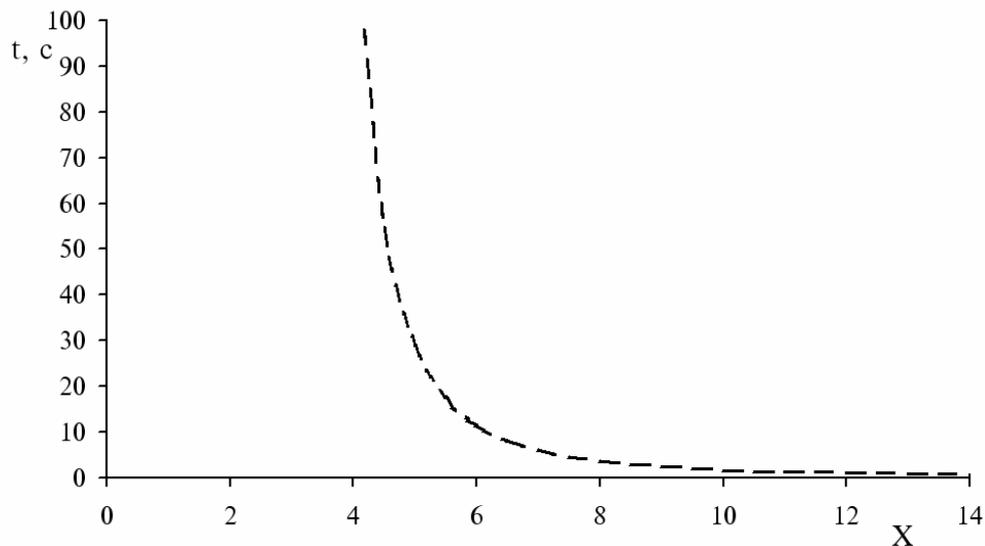


Рис. 1. Зависимость среднего времени, через которое происходит льдообразование внутри одноклеточных микроорганизмов *Saccharomyces cerevisiae*, от степени пересыщения внутриклеточного раствора

Как следует из (13), необходимым для образования внутриклеточного кристалла льда условием является не только достаточно большое пересыщение внутриклеточного раствора, но и достаточно длительное время нахождения клеток в условиях этого пересыщения. Большое, но кратковременное пересыщение может не вызвать образование внутриклеточных кристаллов, тогда как сравнительно небольшое, но длительно сохраняющееся пересыщение, может вызвать внутриклеточное льдообразование. Формула (13) является универсальной, а специфические свойства замораживаемых клеток и водного внеклеточного раствора определяются фигурирующими в ней параметром  $A$  и функцией  $\tilde{c}(T)$ . Она может быть использована для определения вероятности внутриклеточной кристаллизации в замораживаемой клеточной суспензии на основе расчета или экспериментального измерения значений пересыщения внутриклеточного раствора при кристаллизации клеточных суспензий по хорошо известным в криобиологии методикам [6,7].

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells at supraoptimal rates // *Cryobiology*. - 1977. - Vol. 14, №2. - P. 251-272.
2. Mazur P., Pinn I.L., Kleinhans F.W. Intracellular ice formation in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling // *Cryobiology*. - 2007. - V. 55, N2. - P. 158-166.
3. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. - К.: Наукова думка, 1994. - 143 с
4. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Статистическая физика. - М.: Наука. - 1976. – 584 с. (серия “Теоретическая физика”, Т.V, часть 1)
5. Ланда П.С. Автоколебания в системах с конечным числом степеней свободы. - М.: Наука, 1980. - 360с.
6. Thirumala S.A., Devireddy R.V. Simplified procedure to determine the optimal rate of freezing biological systems // *J. Biomech. Eng.* – 2005. - V.127, N2. - P. 295-300.
7. Woelders H., Chaveiro A. Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes // *Cryobiology*. - 2004. - V.49, N3. - P. 258-271.