

УДК 577.35

ТЕОРЕТИЧНА ОЦІНКА ЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНОЇ З ПОГЛЯДУ ДВОХФАКТОРНОЇ ТЕОРІЇ КРІОПОШКОДЖЕННЯ ШВИДКОСТІ ОХОЛОДЖЕННЯ ПРИ ЛІНІЙНИХ РЕЖИМАХ ЗАМОРОЖУВАННЯ КЛІТИННОЇ СУСПЕНЗІЇ

О.В. Сакун, О.І. Гордієнко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,

вул. Переяславська, 23, 61015, Харків,

e-mail: gordienko@gala.net

Надійшла до редакції 16 квітня 2009 р.

Прийнята 15 травня 2009 р.

На підставі загальної термодинамічної теорії кристалоутворення визначена імовірність внутрішньоклітинної кристалізації при охолодженні суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у кризоахисному розчині. Оцінені внески двох типів кріопошкоджень, пов'язаних з поза- та внутрішньоклітинною кристалізацією. На підставі отриманих співвідношень та з урахуванням індивідуальних характеристик дріжджових клітин визначені оптимальні швидкості охолодження при заморожуванні цих клітин у середовищі з кріопротектором диметилсульфоксидом в концентрації 10%. Запропонований алгоритм теоретичної оцінки оптимального значення швидкості охолодження при лінійному режимі заморожування конкретної клітинної суспензії може бути використаний при розробці способів кріоконсервування інших біологічних об'єктів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кріопошкодження, внутрішньоклітина кристалізація, ефекти розчину, *Saccharomyces cerevisiae*.

Наразі загальноприйнятим є уявлення про те, що найбільш суттєві чинники кріопошкодження клітин безпосередньо або опосередковано пов'язані з утворенням і ростом кристалів льоду у клітинній суспензії, що заморожується. Експерименти і теоретичний аналіз показують, що збереженість клітин при кріоконсервуванні куполоподібно залежить від швидкості охолодження на етапі кристалізації. Існування оптимальної швидкості охолодження пояснюється створеною Мейзуром двохфакторною теорією кріопошкодження [1], згідно з якою на збереженість клітин в процесі кристалізації клітинної суспензії впливають два типи пошкоджуючих чинників. Перший тип кріопошкоджень виникає при кристалізації позаклітинного середовища і викликаний обезводненням клітин, підвищенням концентрації та іонної сили поза- та внутрішньоклітинних розчинів за рахунок перетворення частини розчинника у лід. При збільшенні швидкості охолодження ступінь пошкоджень першого типу зменшується внаслідок скорочення часу дії пошкоджуючих чинників. Другий тип кріопошкодження клітин обумовлений утворенням внутрішньоклітинних кристалів льоду, які викликають ті ж самі ефекти, що і чинники першого типу, і крім того здатні механічно руйнувати мембранні структури. Внутрішньоклітинна кристалізація, імовірність якої зростає при високих швидкостях охолодження, вважається максимально згубною для клітин [2-4]. Метою роботи була теоретична оцінка оптимальної швидкості охолодження суспензії клітин *Saccharomyces cerevisiae* шляхом врахування впливу обох типів кріопошкодження та індивідуальних характеристик дріжджових клітин.

Відомо, що середній час утворення зародку внутрішньоклітинного льоду $\langle t \rangle_i$ залежить від пересичення протоплазми клітин, що заморожуються $\tilde{c}(T) - c_{in}$ наступним чином [5]:

$$\langle t \rangle_i = \frac{A}{\left[\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in} \right]^2} \exp \left\{ \frac{B}{(\hat{T})^3 \left[\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in} \right]^2} \right\} \quad (1)$$

де A і $B = \frac{\pi 10^4 v_i^2 \sigma^3}{81 (kT_{k0})^3 c_{k0}^2}$ – константи, v_i – об'єм молекули води у кристалічній фазі, σ –

коефіцієнт поверхневого натягу границі розділу твердої та рідкої фаз, k – постійна Больцмана, T_{k0} – абсолютна температура, при якій завершується плавлення позаклітинного розчину, T – поточне значення абсолютної температури, c_{k0} – сумарна мольна частка розчинених у позаклітинному середовищі речовин при температурі плавлення позаклітинного розчину T_{k0} , c_{in} – поточне значення сумарної мольної частки розчинених у внутрішньоклітинному середовищі речовин, $\hat{c}_{in} = \frac{c_{in}}{c_{k0}}$ – приведена

концентрація розчинених речовин у внутрішньоклітинному розчині, $\tilde{c}(\hat{T})$ – концентрація позаклітинного розчину, при якій цей розчин знаходиться у термодинамічній рівновазі з льодом при температурі T , $\hat{T} = \frac{T}{T_{k0}}$ – приведена температура,

$$\hat{c} \equiv \frac{\tilde{c}}{c_{k0}}.$$

При значеннях величин $v_i = 3,228 \cdot 10^{-29} \text{ м}^3$, $\sigma = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ Н/м}$, $\kappa = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ Дж/К}$, $T_{k0} = 268,9 \text{ К}$, $c_{k0} = 0,0285$, які відповідають криозахисному розчину, що використовується в роботі, $B = 30$.

У відповідності з виразом (1) імовірність утворення внутрішньоклітинного кристалу льоду за одиницю часу в пересиченому внутрішньоклітинному розчині є

$$W_1 = \frac{1}{\langle t \rangle_i} = \frac{\left[\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in} \right]^2}{A} \exp \left\{ - \frac{B}{\hat{T}^3 \left[\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in} \right]^2} \right\} \quad (2)$$

Тому імовірність утворення внутрішньоклітинного кристалу льоду в пересиченому внутрішньоклітинному розчині за час кристалізації позаклітинного розчину визначається інтегралом за часом t від моменту часу t_{k0} , при якому починається кристалізація у позаклітинному розчині, до моменту t_E , при якому температура позаклітинного розчину стає рівною його евтектичній температурі:

$$W^* = \int_{t_{k0}}^{t_E} W_1 dt$$

Оптимальним з погляду запобігання пошкодженню клітин внутрішньоклітинними кристалами льоду є режим охолодження $T(t)$, при якому імовірність внутрішньоклітинної кристалізації мінімальна у порівнянні з іншими режимами охолодження, тобто режим, при якому

$$W^* = \int_{t_{k0}}^{t_E} \frac{\left[\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in} \right]^2}{A} \exp \left\{ - \frac{B}{(\hat{T})^3 \left[\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in} \right]^2} \right\} dt \rightarrow \min \quad (3)$$

Оскільки в рамках двохфакторної теорії кріопшкодження утворення кристалу льоду в клітині неминує призводить до її загибелі, імовірність W^* можна ототожнити з імовірністю загибелі клітини за рахунок внутрішньоклітинної кристалізації. Проте пошкодження клітин в процесі кристалізації клітинної суспензії обумовлено не тільки утворенням внутрішньоклітинних кристалів льоду, але і так званими ефектами розчину, внаслідок яких пошкодження клітин посилюється зі збільшенням концентрації розчину, що контактує з клітинними структурами, і часом експозиції клітин в ньому [6-8]. Одною з найпростіших залежностей, яка враховує внесок цих ефектів у кріопшкодження клітин на етапі кристалізації клітинної суспензії, є наступна залежність імовірності пошкодження клітини від концентрацій поза- та внутрішньоклітинного гіпертонічних розчинів та від тривалості контакту з ними:

$$W^{**} = \frac{1}{2D} \int_{t_{k0}}^{t_E} (\hat{c}_{in} \hat{c}_{out})^n dt \quad (4)$$

Біологічний сенс константи D у виразі (4) полягає в наступному: вона дорівнює тривалості експозиції клітин у кріозахисному розчині при температурі його плавлення, при якій життєздатність втрачають 50% клітин. Вибір підінтегрального виразу у вигляді добутку концентрацій поза- та внутрішньоклітинного розчинів враховує ту обставину, що пошкодження структурних та функціональних елементів клітини може відбуватись як в результаті безпосереднього контакту зовнішньої поверхні мембрани клітини з оточуючим її позаклітинним розчином, так і в результаті пошкодження субклітинних структур з внутрішньоклітинним гіпертонічним розчином. В загальному випадку, як відомо [9], при заморожуванні клітин $\hat{c}_{in} \neq \hat{c}_{out}$. Показник степеня n ($\infty > n \geq 0$) характеризує резистентність клітин до дії гіпертонічного розчину. В граничному випадку $n = 0$ клітини абсолютно не чутливі до дії ефектів розчину. Чим більше значення має показник n , тим більш чутливі клітини до цього кріопшкоджуючого чинника.

Відзначимо, що дріжджоподібні гриби *Saccharomyces cerevisiae*, які ми досліджуємо, при помірних осмотичних навантаженнях мають порівняно велику стійкість до них: при експозиції в розчині «диметилсульфоксид (10 об'ємних %)-0,135М NaCl- вода» при температурі -4°C впродовж 12 годин їх колонієутворююча здатність падає лише на 50%, що відповідає значенню $D = 720$ хв. В той же час, внаслідок того, що плазматична мембрана цих клітин частково прикріплена до ригідної клітинної стінки, при великих осмотичних навантаженнях мікроорганізми, що досліджуються, можуть пошкоджуватись за механізмом, описаним у роботах [5,10], в результаті надмірного натягу їх мембрани при обезводненні. З урахуванням цієї обставини вважаємо $n = 3$.

Ефекти розчину і внутрішньоклітинна кристалізація пошкоджують клітини незалежно одне від одного, тому імовірність W пошкодження клітин на етапі кристалізації при заморожуванні клітинної суспензії дорівнює сумі указаних вище імовірностей (3) та (4): $W = W^* + W^{**}$. При заданій постійній швидкості охолодження

$$\frac{dT}{dt} = -\beta \quad (\beta > 0) \text{ отримуємо}$$

$$W = -\frac{T_{k0}}{\beta A} \int_1^{\hat{T}_E} \left[\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in} \right]^2 \exp \left\{ -\frac{B}{\left[\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in} \right]^2 \hat{T}^3} \right\} d\hat{T} - \frac{T_{k0}}{2D\beta} \int_1^{\hat{T}_E} \hat{c}_{in}^3 \hat{c}^3 d\hat{T} = \min \quad (5)$$

Оскільки в клітинній суспензії, що заморожується, міститься багато клітин (в проведених нами експериментах – біля 10^6 клітин/мл), величина $W \cdot 100\%$, очевидно, визначає відсоток пошкоджених в процесі кристалізації клітинної суспензії клітин.

Для того, щоб на підставі одержаного виразу знайти залежність відсотку пошкоджених клітин від швидкості охолодження, спочатку необхідно визначити залежності $\hat{c}(\hat{T})$ та $\hat{c}_m(\hat{T})$, що фігурують у виразі (5). Біологічним об'єктом, що досліджується в роботі, є суспензія дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* в розчині «диметилсульфоксид (10 об'ємних %)–0,135М NaCl– вода». З урахуванням зв'язку між молярною (c) і ваговою (w) концентраціями розчину $c = \frac{w\rho}{m}$ [11], де ρ -

густина розчину, m – молярна маса розчиненої речовини, і даних про густину водних розчинів диметилсульфоксиду при 20°C , поданих в роботі [12], діаграму плавлення в координатах «сумарна масова частка розчинених речовин - температура плавлення» можна перетворити у вигляд «приведена мольна частка розчинених речовин - температура плавлення» (рис. 1). При переході до діаграми, показаної на рис. 1, враховувався той факт, що молекули хлориду натрію у розчині практично повністю дисоціюють на іони і що відношення кількості кріопротектора до кількості електроліту R у рідкій фазі при заморожуванні залишається незмінним, а також прийнято допущення про незалежність густини розчинів «диметилсульфоксид - хлорид натрію-вода» від температури. Формула, указана на полі рис. 1, отримана шляхом апроксимації методом найменших квадратів поліномом другого степеня поданої на цьому ж рисунку кривої плавлення від приведеної температури.

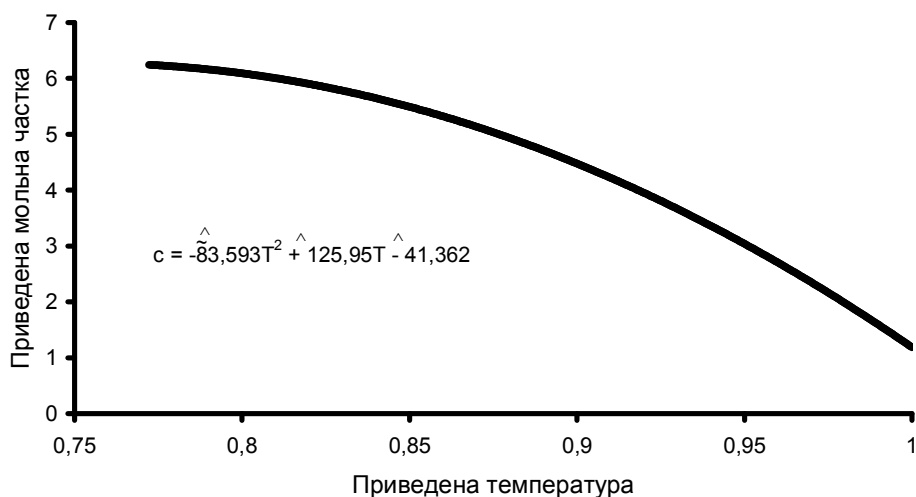


Рис. 1. Діаграма плавлення потрійного розчину «диметилсульфоксид - хлорид натрію - вода» ($R=14$) в координатах «приведена мольна частка - приведена температура» (R – відношення маси кріопротектора до маси електроліту, що містяться у розчині)

Таким чином, одна з необхідних для оцінки оптимальної постійної швидкості охолодження залежностей у випадку, який ми розглядаємо має вигляд

$$\hat{c}(\hat{T}) = -83,593\hat{T}^2 + 125,95\hat{T} - 41,362 \quad (6)$$

Друга з шуканих залежностей $\hat{c}_m = \hat{c}_m(\hat{T})$ описується отриманими в [13], які стосовно до випадку, що розглядається, набувають вигляду

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_w} \left[\frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \frac{\tilde{c}(T_{A1})}{c_{k0}} \right] \quad (7)$$

$$c_{in} = c_{k0} \frac{1-\alpha}{y-\alpha}, \quad (8)$$

де $y = \frac{V}{V_0}$ – відносний об'єм клітини, V – поточне значення клітинного об'єму, V_0 – початкове значення клітинного об'єму, t – час, α – об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин, c_{in} – концентрація (мольна частка) розчинених всередині клітини речовин, c_{k0} – вихідна (до початку кристалізації клітинної суспензії) концентрація внутрішньоклітинного розчину, $\tau_w = \frac{1}{\gamma L_p \pi_0}$ – характерний час проникання молекул води крізь клітинну мембрану, γ – відношення площі поверхні клітини до її об'єму в початковому стані, L_p – коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани, π_0 – початковий (при температурі плавлення) осмотичний тиск позаклітинного розчину.

Комбінуючи рівняння (7) і (8), отримуємо

$$\frac{d\hat{c}_{in}}{dt} = -\frac{\hat{c}_{in}^2}{(1-\alpha)\tau_w} \left[\hat{c}_{in} - \hat{c}(\hat{T}) \right] \quad (9)$$

Враховуючи закон Ареніуса

$$\tau_w(T) = \tau_w(T_{k0}) \exp \left[\frac{E}{R_0 T_{k0}} \left(\frac{1}{\hat{T}} - 1 \right) \right],$$

де E – енергія активації трансмембранного переносу молекул води, R_0 – універсальна газова константа,

і визначення $\frac{dT}{dt} = -\beta$, отримуємо замість (9)

$$\frac{d\hat{c}_{in}}{d\hat{T}} = -\frac{T_{k0} \hat{c}_{in}^2 \exp \left[\frac{E}{R_0 T_{k0}} \left(1 - \frac{1}{\hat{T}} \right) \right]}{(1-\alpha)\tau_w(T_{k0})\beta} \left[\hat{c}(\hat{T}) - \hat{c}_{in} \right] \quad (10)$$

Розв'язуючи це рівняння чисельно при різних швидкостях охолодження β і початкових умовах $\hat{c}_{in}(0) = 1, \hat{T}(0) = 1$ ($\hat{T}_E \leq \hat{T} \leq 1$) з урахуванням того, що для клітин *Saccharomyces cerevisiae* при указаних вище умовах заморожування $\frac{E}{R_0 T_{k0}} = 20,1$,

$$\tau_w(T_{k0}) = 6 \text{ хв}, \quad \alpha = 0,24, \quad T_{k0} = 268,9 \text{ К}, \quad \frac{T_{k0}}{(1-\alpha)\tau_w(T_{k0})} = 0,018371,$$

$\hat{c}(\hat{T}) = -83,593\hat{T}^2 + 125,95\hat{T} - 41,362$, $n = 3$, $D = 720$ хв, $A = 0,05$, та підставляючи отримане рішення в (5), знаходимо імовірність пошкодження клітин *Saccharomyces*

cerevisiae на етапі кристалізації при різних постійних швидкостях охолодження β (рис. 2).

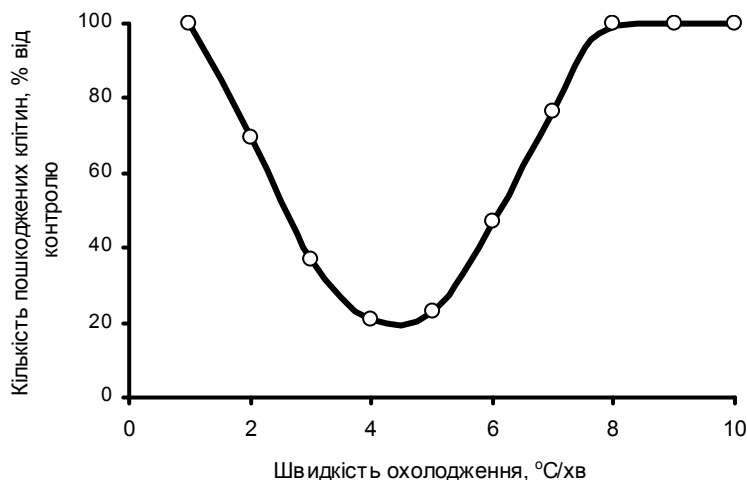


Рис. 2. Залежність кількості пошкоджених на етапі кристалізації клітин від швидкості охолодження при заморожуванні суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* в розчині «диметилсульфоксид (10 об'ємних %)-0,27М NaCl- вода».

Як витікає з результатів розрахунку, представлених в таблиці, в діапазоні швидкостей охолодження $\beta \leq 3$ кріопошкодження клітин відбувається тільки за рахунок ефектів розчину, які визначаються інтегралом (4), а при швидкостях охолодження $\beta \geq 4$ – переважно в результаті внутрішньоклітинної кристалізації, внесок якої в кріопошкодження клітинної суспензії, що заморожується, в основному, визначається інтегралом (3).

Внесок внутрішньоклітинної кристалізації і ефектів розчину в сумарне кріопошкодження дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* в розчині «диметилсульфоксид (10 об'ємних %)-0,27М NaCl- вода» на етапі кристалізації клітинної суспензії

Таблиця

Швидкість охолодження, °C	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Кількість пошкоджених клітин, %	100	100	89,9	28	15,6	17,6	21,7	25	27
Кількість клітин, пошкоджених за рахунок внутрішньоклітинної кристалізації, %	0	0	0	0,3	4,5	11,8	18,2	22,6	25,2
Кількість клітин, пошкоджених за рахунок ефектів розчину, %	100	100	89,9	27,7	11,1	5,8	3,5	2,4	1,8

Звернемо увагу на той факт, що зміна значення показника степені n , що фігурує в (4), з 3 до 2 або 1 зсуває розраховане значення оптимальної постійної швидкості охолодження з 5°C/хв до 4°C/хв і 3°C/хв відповідно, тобто слабо впливає на оцінку оптимальної швидкості охолодження мікроорганізмів, що заморожуються.

ВИСНОВКИ

Оптимальною постійною швидкістю охолодження на етапі кристалізації при заморожуванні суспензії мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* під захистом 10% -ого розчину диметилсульфоксиду є швидкість охолодження біля 5°C/хв. Ця теоретична оцінка узгоджується з відомими експериментальними результатами [14,15]. Запропонований нами алгоритм теоретичної оцінки оптимального значення швидкості охолодження при лінійному режимі заморожування конкретної клітинної суспензії, очевидно, може бути використаний при розробці способів криоконсервування інших біологічних об'єктів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Mazur P., Leibo S.P., Chee E.H.Y. A two factors hypothesis of freezing injury // Cell. Res.-1972.- Vol.71.- P.345-385.
2. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells at supraoptimal rates // Cryobiology.-1977.- Vol. 14, №2.-P.251-272.
3. Mazur P. Physical-chemical basis of injury from intracellular freezing in yeasts / Peter Mazur .- Sapporo: Hockaido Univ. Press, 1967.-P. 171-189.
4. Mazur P., Pinn I.L., Kleinhans F.W. Intracellular ice formation in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling // Cryobiology.- 2007.-V.55, №2.-P.158-166.
5. Гордієнко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. - К.: Наукова думка, 1994. -143 с.
6. Gao D., Critser J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells // ILAR J.- 2000.-Vol.41, №4.-P. 187-196.
7. Moussa M., Dumont F., Ferrier-Cornet J.M. Cell inactivation and membrane damage after long-term treatments at sub-zero temperature in the supercooled and frozen states // Biotechnol. Bioeng.- 2008.- V.101, №6.-P.1245-1255.
8. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // Am. J. Physiol. Cell Physiol. - 1984. - V.247, №3. - P.125-142.
9. Thirumala S., Devireddy R.V. A simplified procedure to determine the optimal rate of freezing biological systems // J. Biomech. Eng. - 2005. - Vol.127, №2.-P.295-300.
10. Levit J. A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants //J.Theor.Biol.-1962.- Vol.3,№2.-P.355-391.
11. де Гроот С., Мазур П. Неравновесная термодинамика: Пер. с англ.-М.:Мир, 1964.-456 с.
12. Laque W.E., Ronneberg C.E. A study of the decarboxylation of trichloroacetic acid in solution of water and dimethylsulfoxide // The Ohio journal of science.-1970.-Vol.70, №2.-P.97-106.
13. Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Марущенко В.В., Сакун О.В. Удосконалена модель пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини // Біофіз.вісник.-2008.-Вип. 21,№2.-С.75-80.
14. Lerock J.R., Keith A.D., Kruuv J. Permeability changes in years after freeze-thaw damage: comparison to reproductive survival // Cryo-Lett.-1984.-5,№4.-P.277-280.;
15. Frederic Dumont, Pierre-Andre Marechal, and Patrick Gervais. Cell Size and Water Permeability as Determining Factors for Cell Viability after Freezing at Different Cooling Rates // AEM.-2004.- V.70,№1.-P.268-272.