

КРІОКОНСЕРВАЦІЯ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ НА ОСНОВІ ПРИСКОРЕНИХ РЕЖИМІВ ЗАМОРОЖУВАННЯ

А.Г.Міщенко, Л.В. Горбунов
Інститут тваринництва УААН

Розглянуто підходи до створення безальтернативного способу кріоконсервації біологічного матеріалу, заснованого на застосуванні прискорених режимів заморожування. Показано, що при традиційних способах кріоконсервації спермій тварин, з урахуванням виділення схованої теплоти кристалізації, величина середньозваженого прискорення може змінюватися від $+927$ до -1200 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}^2$. За допомогою математичного моделювання визначена можливість створення пристрою, що дає змогу реалізовувати різні режими заморожування, які мають відмінність не тільки по швидкості, але й по прискоренню. Оптимальна швидкість заморожування для спермій бугаїв $30^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. реалізується при зануренні термоблока на глибину $L=30$ см у горловину посудини Дьюара Х-34. При охолодженні термоблока висотою $5\div 10$ см на глибині $L=16$ см у горловині посудини Дьюара Х-34 реалізуються швидкості заморожування $0,46\div 0,17^{\circ}\text{C}/\text{хв}$., необхідні для кріоконсервації меристемальних клітин винограду та черешні. Запропоновано телескопічну конструкцію термоблока, що дає змогу створювати задані швидкості і прискорення заморожування біооб'єкта.

режими заморожування, прискорення, математична модель, пристрій для заморожування

Заморожування і тривале збереження статевих клітин та ембріонів тварин є невід'ємним етапом біотехнології відтворення високопродуктивних об'єктів біологічного походження. В даний час статеві клітини тварин заморожують за допомогою двох альтернативних технологій із застосуванням повільних швидкостей заморожування ($V \leq 100$ $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.) і високих ($V \geq 2000$ $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.) [1].

Низькотемпературна консервація біоматеріалу методом вітрифікації заснована на використанні високих швидкостей заморожування ($V \geq 2000$ $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.) та високих концентрацій кріопротекторів ($C=50-90\%$). Цей метод дозволяє в багато разів скоротити час, необхідний для заморожування біооб'єктів, а також спростити режим охолодження, але вплив токсичності висококонцентрованих розчинів кріопротекторів на біологічний матеріал знижує рівень збереженості біооб'єкта [2]. На основі пасивного остигання термоблока в горловині посудини Дьюара реалізуються режими заморожування з негативним прискоренням. При цьому, існуючі пристрої дозволяють задавати швидкості заморожування від $0,1$ $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. до 50 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. з градієнтом температури в термоблока близько 1 $^{\circ}\text{C}/\text{см}$. [3]. Великий розкид температури в термоблоці не дає можливості його застосовувати для суспензій клітин, що мають обсяг контейнера більш $0,2$ мл. Реалізація експонентних режимів заморожування з позитивним прискоренням на практиці здійснюється за допомогою заморожувача типу "ЛІД" у напівавтоматичному режимі по ламаній кривій, максимально вписаній в шукану експоненту [4]. Але

через високу вартість пристрою і незастосування у польових умовах існує обмеженість у його використанні.

Можливість об'єднання цих альтернатив з метою створення безальтернативної технології низькотемпературного консервування заснована на застосуванні прискорених режимів охолодження. Передбачається, що нова технологія кріоконсервації включитиме переваги існуючих альтернативних методів за допомогою реалізації як негативного, так і позитивного прискорення в процесі заморожування.

Матеріали та методи дослідження. При розрахунку характерного часу теплообміну термоблока використовувалася математична модель [5]. На основі обраної моделі побудовані алгоритм і програми для розрахунку теплообміну. За допомогою програм проведені розрахунки параметрів циліндра, з використанням мікрокалькулятора "Електроніка БЗ-34" і електронних таблиць із програми "Exel 97".

Об'єктом дослідження була нативна сперма бугаїв-плідників червоно-рябої української молочної породи, що належить племпідприємству Інституту тваринництва УААН. Для дослідів брали сперму з рівнем збереження $80 \pm 5\%$. Контейнерами для заморожування біоматеріалу слугували конверти із поліетилену та алюмінієвої фольги пробірки Уленгута ($V \leq 0,75$ мл.). Температура зразка вимірювалася мідь-константановою термопарою (МК – $d = 0,1$ мм.), відкаліброваною з точністю $0,1$ °C термодатчиком, що входить у комплект заморожувача "Minicool". Режим зниження температури реєстрували за допомогою графобудівника Н-307. Вимір температури здійснювали термометричним методом. Відтавання контейнерів зі спермою проводилося у водяній бані з температурою 40 °C. У розморожених зразках визначали кількість рухливих спермій. Число досліджень у кожному з експериментів становило 5-7. Отримані результати статистично обробляли за допомогою загальноприйнятих методів.

Результати та обговорення дослідження. При повільному охолодженні ($V \leq 100$ °C/хв.) різниця хімічних потенціалів поза- і всередині клітини зменшується за рахунок транспорту внутрішньоклітинної води внаслідок створення осмотичного тиску зростаючими позаклітинними кристалами льоду. При охолодженні клітини з більш високою швидкістю ($V \geq 2000$ °C/хв.) не достатньо часу для того, щоб вона зберігала рівновагу шляхом виходу води. У цьому випадку внутрішньоклітинний вміст почне переохолоджуватися доки не зрівноважаться хімічні потенціали за рахунок внутрішньоклітинного утворення кристалів льоду [6]. Виходячи з цього, ступінь зміни швидкості заморожування в діапазоні активного кристалоутворення (від -5 до -25 °C) може мати своє оптимальне значення для визначеного виду біоб'єкта, при однаковій середньозваженій швидкості заморожування в діапазоні температур до -30 °C. Однак швидкість заморожування не завжди можна витримати постійною величиною, а, імовірно, у цьому і немає такої необхідності. Наприклад, при виділенні схованої теплоти кристалоутворення відбувається зміна

режиму кріовпливу на біооб'єкт, а це, у свою чергу, впливає на рівень його збереженості (рис. 1).

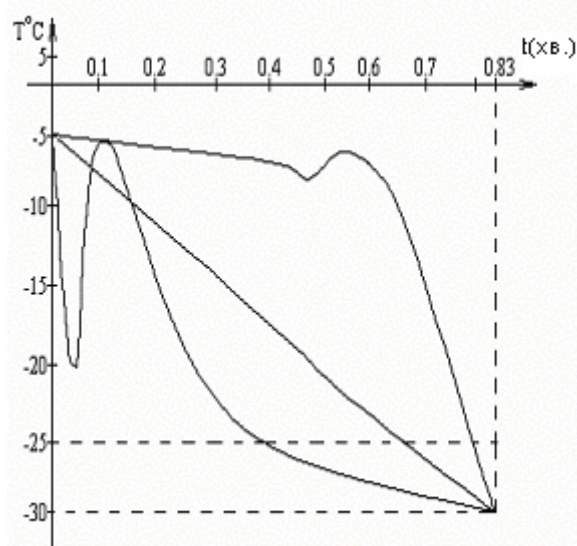


Рис. 1. Зміна швидкості заморожування спермійв бугая в залежності від величини схованої теплоти кристалотворення

В інтервалі температур $-5 \div -30$ $^{\circ}\text{C}$ величина середньозваженої швидкості теплообміну з негативним прискоренням більша в 1,8 рази, ніж при режимі з позитивним прискоренням. Середньозважене прискорення при цьому змінює свою величину від $+927$ $^{\circ}\text{C}/\text{хв}^2$ до -1200 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}^2$.

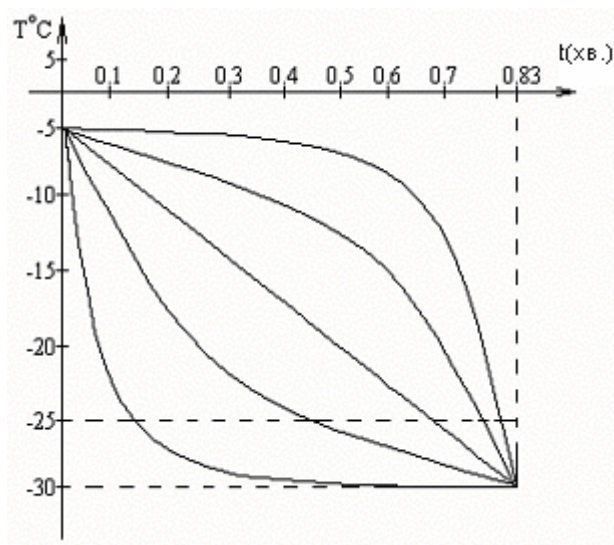


Рис. 2. Режими заморожування спермійв тварин, що мають позитивне і негативне прискорення

Для вивчення впливу величини і знаку прискорення на збереженість біооб'єкта при його заморожуванні необхідне створення спеціалізованого пристрою, для реалізації якого слід визначити його характерні параметри. На рисунку 2 показані різні характери зміни швидкостей теплообміну. У температурному інтервалі від -5 до -30 $^{\circ}\text{C}$ величина середньозваженої швидкості теплообміну становить 30 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, а середньозваженого прискорення - 330 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}^2$. Доцільно ж вимірювати величини середньозважених швидкостей і прискорень у температурному інтервалі $-5 \div -25$ $^{\circ}\text{C}$, тому що саме в цьому діапазоні йде ріст позаклітинних кристалів льоду, і відбувається активна дегідратація біооб'єкта. В інтервалі температур $-5 \div -25$ $^{\circ}\text{C}$ максимальне значення середньозваженої швидкості становить 200 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, середньозважене прискорення при цьому варіює від -2000 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}^2$ до 393 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}^2$.

Для того щоб дослідити вплив зміни характеру швидкості теплообміну на збереженість біооб'єкта за допомогою реалізації прискорених режимів заморожування, необхідно створити пристрій з наступними характеристиками:

- 1) Застосовність як у польових, так і в лабораторних умовах.
- 2) Можливість реалізації як негативного, так і позитивного прискорення в процесі заморожування (від $+1000\text{ }^{\circ}\text{C/хв}^2$ до $-2000\text{ }^{\circ}\text{C/хв}^2$).
- 3) Градієнт температури всередині термоблока повинний становити не більше $0,1\text{ }^{\circ}\text{C/см}$.
- 4) Реалізація швидкостей теплообміну від $0,01\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$ до $30\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$.
- 5) Можливість заморожування спермій тварин і меристемальних клітин рослин.
- 6) Застосовність термоблока для різних типів судини Дьюара (Х-34А, Х-34Б, Х-35, Х-5).
- 7) Зручність використання і низька вартість пристрою (30 у.о.).

Для спрощення розробки даного пристрою застосована математична модель з метою оптимізації параметричних характеристик пристрою, що забезпечать реалізацію необхідних умов кріоконсервації клітин тваринного і рослинного походження. Нами апробована математична модель, за допомогою якої розраховано характерний час теплообміну термоблока, що має різні параметри.

При глибині занурення термоблока в горловину посудини Дьюара на 30 см середня швидкість його охолодження в діапазоні від -5 до $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ становить $25\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$., що є оптимальною швидкістю для заморожування спермій бугаїв. Однак зміна температури для самих спермій у реальних умовах заморожування, при виділенні схованої теплоти кристалоутворення, може значимо відрізнитися (рис. 1). Як впливає прискорення на рівень збереженості біооб'єкта в даний час є відкритим питанням.

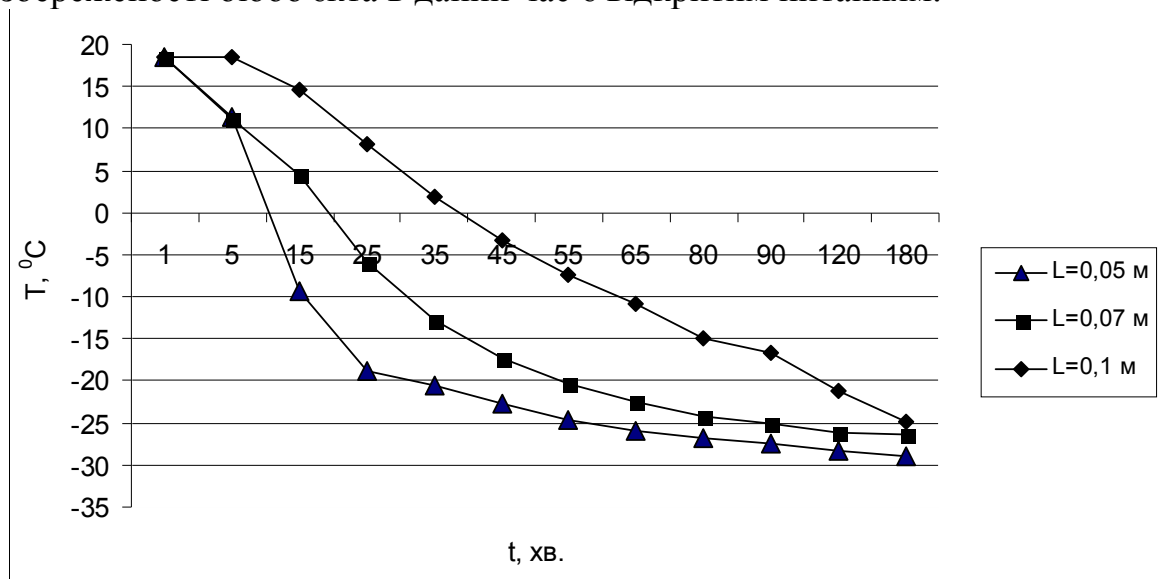


Рис. 3. Зміна температури контейнера від часу його охолодження при різних висотах циліндра, виготовленого з нержавіючої сталі, у діапазоні від $+20$ до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

Нами встановлено, що не тільки рівень занурення термоблока, але і довжина циліндра істотно впливає на характер швидкості теплообміну. На рисунку 3 зображені режими охолодження термоблока, виготовленого з нержавіючої сталі, у температурному діапазоні від +20 до -30⁰С. Так, при висоті циліндра 5 см у діапазоні від -5 до -25⁰С середньозважена швидкість охолодження дорівнює 0,46 ⁰С/хв., при висоті циліндра 7 см – -0,28 ⁰С/хв. і при висоті 10 см. – -0,17 ⁰С/хв. Середньозважене прискорення при цьому змінює свою величину від -9·10⁻² до -1,65·10⁻² ⁰С/хв². відповідно. Отримані режими є оптимальними для кріоконсервації меристемальних клітин винограду і черешні [7,8].

Експериментальна перевірка охолодження термоблока показала, що рівняння теплообміну циліндра досить точно описує процес його остигання протягом усього циклу заморожування. На підставі отриманих даних нами запропоновано варіант пристрою, що має телескопічну конструкцію термоблока, яка дасть змогу створювати задані діапазони швидкостей і прискорень для забезпечення оптимального процесу заморожування спермій тварин і клітин рослинного походження.

Висновки:

1. При традиційних способах заморожування спермій тварин, з урахуванням виділення схованої теплоти кристалізації, величина середньозваженого прискорення може змінюватися від +927 до -1200⁰С/хв²., що є причиною зниження збереженості деконсервованого біооб'єкта внаслідок осмотичного шоку.

2. За допомогою математичної моделі визначені параметри пристрою для заморожування меристемальних клітин рослин та спермій тварин. Оптимальна швидкість заморожування для спермій бугаїв 30⁰С/хв. реалізується при занурюванні сталюого термоблока на глибину L=30 см у горловину посудини Дюара Х-34. При охолодженні термоблока висотою 5÷10 см реалізуються необхідні швидкості заморожування 0,46÷0,17 ⁰С/хв. для меристемальних клітин винограду та черешні на глибині L=16 см у горловині посудини Дюара Х-34.

Бібліографічний список

1. Горбунов Л.В., Антоненко Т.С., Безуглый Н.Д. Изучение влияния изменения скорости замораживания на сохранность эмбрионов млекопитающих // Проблемы криобиологии. – Х.. -2001.- №4.- С. 36-42.
2. Fahy G.M. The relevance of cryoprotectant "Toxicity" to cryobiology// Cryobiology. – 1986. - V.23. - №1. - p.1-14.
3. Методические рекомендации по способам реализации медленных скоростей замораживания половых клеток и эмбрионов животных /Горбунов Л.В., Гринжевский Н.В., Антоненко Т.С., Медведовский А.В.- Харьков, 2002. – 28 с.
4. Стрибуль Т.Ф. Применение экспоненциальных режимов охлаждения при кріоконсервировании биобъектов //Криобиология. – 1986. - №3. - С. 48-49.
5. Лыков А.В. Теплообмен. Справочник. –М.: Энергия, 1978.
6. Mazur P. The freezing of biological systems //Cryobiology. – Science, 1970. - V168, №5135. - P. 939-949.

7. Towill L.E., Forsline P.F. Cryopreservation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) using a dormant vegetative bud method //Cryo-Letters.–1999.- P.215-222.
8. Zhao Y., Wu Y., Engelmann F. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) in vitro plantlets// Cryo-Letters. - 2001. - P. 321-328.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИОЛОГИЧНОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ УСКОРЕННЫХ РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

*А.Г. Мищенко, Л.В. Горбунов
Институт тваринництва УААН*

Рассмотрены подходы к созданию безальтернативного способа криоконсервации биологического материала, основанного на применении ускоренных режимов замораживания. Показано, что при традиционных способах криоконсервации спермиев животных, с учетом выделения скрытой теплоты кристаллизации, величина средневзвешенного ускорения может изменяться от +927 до -1200 °C/мин². При помощи математического моделирования определена возможность создания устройства, позволяющего создавать различные режимы замораживания, имеющие отличие не только по скорости, но и по ускорению. Оптимальная скорость замораживания для спермиев быков 30 °C/мин реализуется при погружении термоблока на глубину L=30 см в горловину сосуда Дюара X-34. При охлаждении термоблока высотой 5÷10 см. реализуются необходимые скорости замораживания 0,46÷0,17 °C/мин. для меристемальных клеток винограда и черешни на глубине L=16 см. в горловине сосуда Дюара X-34. Предложена телескопическая конструкция термоблока, позволяющего создавать заданные скорости и ускорения замораживания биообъекта.

BIOLOGICAL STUFF CRYOPRESERVATION ON THE BASIS OF ACCELERATED FREEZING REGIMES

*A.G.Mishchenko, L.V.Gorbunov
The institute of animal science UAAS*

This article highlights the unique biological stuff cryoconservation method based on the accelerated freezing regimes application. It was proved that by the conventional animals embryos cryopreservation methods the average acceleration value may be altered within the range of temperatures (+927--1200°C/min²). Latent crystallization heat exchange must be taken into account. The jack creation possibility was stipulated by the mathematical models application. This virtual device will allow to accomplish various freezing regimes which differ not only by the velocities but also by acceleration. The optimal bulls embryos freezing speed constitutes 30 °C/min. The freezing operation is accomplished by the thermal block immersion on the depth of L=30sm in a mouth of Dyuar X-34 vessel. At the thermal unit cooling freezing velocities reach 0,46÷0,17°C/min. These speeds are helpful for meristematic grape and cherry cells cryoconservation. This operation is performed at thermal unit cooling. The dimensions of the unit are as follows: the height is 5÷10 sm. and the block lowers on the depth of L=16sm. in the mouth of Dyuar X-34 vessel. Telescopic thermal unit construction is developed that will allow to reach the programmed biological subject freezing velocities and accelerations.