

СПОСІБ ВИМІРУ НАДВИСОКИХ ШВИДКОСТЕЙ ЗАМОРОЖУВАННЯ-ВІДТАВАННЯ ООЦИТІВ І ЕМБРІОНІВ ССАВЦІВ

Л.В. Горбунов

Харківський біотехнологічний центр

Запропоновано кондуктометричний спосіб виміру надвисоких швидкостей теплообміну ($B \geq 6 \cdot 10^3 \text{ } ^\circ\text{C/хв.}$), що дає можливість визначати чисельні параметри кріоконсервації з похибкою не більш 3% для контейнерів, що містять середовище з гліцерином ($C \geq 30\%$). Вимір інтенсивності теплообміну дозволяє робити не тільки якісний аналіз досліджуваних параметрів у порівнянні з загальноприйнятим, але й кількісний - при різних умовах проведення експерименту. Це дає можливість використовувати запропонований спосіб у дослідженнях для встановлення взаємозв'язку збереженості біооб'єкта при різноманітних умовах проведення кріоконсервації.

ооцит, ембріон, кріоконсервація, кондуктометричний спосіб

Виражена технологічність способу кріоконсервації ооцитів і ембріонів ссавців за допомогою застосування надвисоких швидкостей заморожування-відтавання ($B > 5 \cdot 10^3 \text{ } ^\circ\text{C/хв.}$) має у теперішній час велике практичне і теоретичне значення [3]. Необхідність одержання і реєстрації надвисоких швидкостей теплообміну пов'язана з оптимізацією умов вітрифікації розчину. Традиційний спосіб вимірювання швидкості, заснований на застосуванні термопар, має ряд недоліків, особливо при проведенні досліджень з підвищеними швидкостями теплообміну. Причинами систематичних похибок термометричного вимірювання є термоінерційність вимірювальної головки термопари та тепловідвід її проводів [4]. Це, у свою чергу, обмежує діапазон реєстрації швидкостей теплообміну, що не дозволяє встановити кількісний взаємозв'язок між рівнем збереженості біооб'єкту та умовами проведення кріоконсервації.

Метою даного дослідження є розробка кондуктометричного способу виміру високих $B_1 \geq 30 \text{ } ^\circ\text{C/сек}$ ($2 \cdot 10^3 \text{ } ^\circ\text{C/хв.}$) і надвисоких $B_2 \geq 80 \text{ } ^\circ\text{C/сек}$ ($5 \cdot 10^3 \text{ } ^\circ\text{C/хв.}$) швидкостей теплообміну і встановлення умов його застосування.

Методика досліджень. Як контейнери для середовища використовували пластикові соломини різного діаметру ($d=0,3, 0,5, 0,7, 1$ і 2 мм). Температуру зразка вимірювали за допомогою мідь-константової термопари (МК - $d=0,1$ мм), відкаліброваною з точністю $0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$ термодатчиком, який входить у комплект заморожувача "Minicool". Заморожування здійснювали шляхом вміщення контейнерів у рідкий азот, а відтавання – у водяну баню, нагріту до температури $38 \text{ } ^\circ\text{C}$ з використанням магнітної мішалки для підвищення інтенсивності теплообміну. Режим зниження температури реєстрували за допомогою графобудівника Н-307, а також за допомогою підключення і реєстрації посиленого і перетвореного сигналу (аналогово-цифровим перетворювачем) від термодатчика на ЕОМ. Обчислення швидкості зниження температури при заморожуванні проводили у діапазоні зони евтектики використаного розчину, а при від-

таванні – у температурній зоні рекристалізації. Вимірювання температури здійснювали за допомогою загальноприйнятого термометричного способу і за розробленим у ході дослідження кондуктометричним методиками. Число досліджень у кожному з експериментів складало 5-7. Отримані результати статистично опрацьовували за загальноприйнятими способами. Відносну похибку вимірів оцінювали як відношення величини абсолютної похибки до величини температурного діапазону, в якому проводили калібрування термопари [2].

Результати досліджень. Зменшення систематичної похибки виміру надвисоких швидкостей теплообміну можливе за допомогою застосування кондуктометричного способу виміру, який заснований на реєстрації електролітичної провідності розчину в зоні евтектики. Електропровідність реєструється за допомогою тонких металевих електродів ($d=0,01$ мм). Таким чином, робочою зоною виміру швидкості стає весь об'єм розчину у капілярі, оскільки він є інтегральним критерієм зміни електропровідності при охолодженні. Так як лінійна залежність електропровідності розчину при зниженні температури спостерігається тільки за відсутності росту кристалів, використовували розчин гліцерину з концентрацією 50 % (V/V), що забезпечувало ефект вітрифікації у широкому діапазоні швидкостей.

Для визначення впливу інерційності механічної частини самописа проведений ряд вимірів швидкостей охолодження мідь-константановою термопарою ($d=0,1$ мм), приміщеною безпосередньо у рідкий азот, а також між двох мідних пластин, попередньо охолоджених до температури -196°C [1]. Реєстрація швидкостей теплообміну виконувалася самописом, і при безпосередньому підключенні до ЕОМ за допомогою аналого-цифрового перетворювача. Це дозволило встановити вплив систематичної похибки механічної частини самописа, яка виявляється при досягненні швидкостей охолодження порядку $500^{\circ}\text{C}/\text{сек}$ і вище.

Для тестування запропонованого кондуктометричного способу щодо термометричного, був проведений аналіз результатів охолодження пластикових капілярів у рідкому азоті (табл.1).

1. Залежність величини швидкості охолодження, заповненого 50% розчином гліцерину, пластикового капіляра від способу виміру

Діаметр пластиково- го капіляра, d , мм	Величина швидкості теплообміну в залежності від способу виміру $M \pm m$, $^{\circ}\text{C}/\text{сек}$		Похибка виміру термометричного способу	
	термометричний	кондуктометричний	абсолютна, $^{\circ}\text{C}/\text{сек}$	відносна, %
0,7	105 ± 5^a	159 ± 6^b	44	33
1,0	$83,1 \pm 3,9^c$	$104 \pm 4,5^a$	20,4	23
2,0	$28 \pm 2,1^d$	$32,7 \pm 2,4^d$	4,7	16,8

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що вимір високих $V \geq 30^{\circ}\text{C}/\text{сек}$ і надвисоких $V \geq 80^{\circ}\text{C}/\text{сек}$ швидкостей теплообміну необхідно проводити тільки за допомогою термокондуктометричного способу. При

використанні термометричного способу перевищується припустимий поріг відносної похибки виміру (5%).

Різними суперскриптами позначені величини, які мають вірогідність розходження з імовірністю, вищою 0,95.

Оскільки концентрації кріопротекторів, використаних у вітрифікаційному розчині, при виконанні робіт з кріоконсервації ооцитів і ембріонів, близькі до 50%, запропонований кондуктометричний спосіб має явну перевагу в порівнянні із загальноприйнятим термометричним. Проте, при необхідності виміру інтенсивності теплообміну при концентраціях кріопротектора нижче 50% існує можливість появи систематичної похибки виміру, яка пов'язана з утворенням кристалів у розчині.

З метою визначення умов застосування запропонованого способу розрахована відносна похибка виміру розчинів кріопротекторів з концентраціями 5, 10, 20, 30 і 40% як при заморожуванні, так і при відтаванні з різними швидкостями (табл. 2).

2. Залежність величини відносного відхилення швидкості теплообміну пластикових капілярів діаметром від 2 до 0,3 мм при охолодженні у рідкому азоті й відігріванні у водяній бані від концентрації розчину гліцерину

Концентрація гліцерину, % V/V	Відносне відхилення швидкості теплообміну при заморожуванні - $B_3, ^\circ\text{C}/\text{сек (відтаванні - } B_{\text{від}}, ^\circ\text{C}/\text{сек)}, \%$				
	$B_3 = 33$ ($B_{\text{від}} = 45$) $d = 2 \text{ мм}$	$B_3 = 104$ ($B_{\text{від}} = 138$) $d = 1 \text{ мм}$	$B_3 = 150$ ($B_{\text{від}} = 177$) $d = 0,7 \text{ мм}$	$B_3 = 194$ ($B_{\text{від}} = 230$) $d = 0,5 \text{ мм}$	$B_3 = 310$ ($B_{\text{від}} = 380$) $d = 0,3 \text{ мм}$
5	28 (57)	18 (25)	15 (20)	12 (15)	6,4 (7,8)
10	17 (22)	12 (16)	8,4 (13,1)	7,4 (9,2)	3,7 (4,2)
20	4,2 (9,2)	3,1 (2,8)	2,2 (3,9)	2,0 (4,1)	1,4 (2,6)
30	1,1 (4,9)	0,3 (2,1)	0,2 (0,8)	1,2 (3,3)	0,8 (1,4)
40	0,1 (1,9)	0,0 (1,0)	0,0 (0,1)	0,0 (0,1)	0,0 (0,0)
50	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)

Різні швидкості заморожування (відтавання) реалізовували за допомогою занурення пластикових капілярів з діаметром 2, 1, 0,7, 0,5, 0,3 мм у рідкий азот (водяну баню, нагріту до $40 ^\circ\text{C}$, з перемішуванням теплоносія). Базуючись на тому, що максимально припустима похибка виміру може складати не більше 3%, визначали мінімально припустимі концентрації кріопротектора, які відповідають мінімальним швидкостям заморожування й відтавання. Необхідною умовою застосування кондуктометричного способу виміру швидкості теплообміну з величиною відносної похибки не більше 3% є використання мінімально припустимої концентрації кріопротектора 40, 30, 20, 20 і 10% при швидкостях заморожування (відтавання) не менше 30 (45), 104 (138), 150 (177), 194 (230) і 310 (380) $^\circ\text{C}/\text{сек}$ відповідно.

Запропонований спосіб дозволяє визначати величину надвисоких швидкостей заморожування з мінімальною похибкою у порівнянні з традиційним способом. Вимір інтенсивності теплообміну дає можливість робити не тільки

якісний аналіз досліджуваних параметрів у порівнянні з загальноприйнятим, але й кількісний, а також використовувати його в дослідженнях для встановлення взаємозв'язку збереженості біооб'єкта при різних умовах проведення криоконсервації.

Висновок. Запропонований кондуктометричний спосіб виміру високих $B_1 \geq 30$ °C/сек ($2 \cdot 10^3$ °C/хв.) і надвисоких швидкостей теплообміну $B_2 \geq 100$ °C/сек ($6 \cdot 10^3$ °C/хв.) дає можливість визначати чисельні параметри криоконсервації з похибкою не більше 3% для контейнерів, що містять середовище з гліцерином концентрацією $C_1 \geq 40\%$ и $C_2 \geq 30\%$ відповідно.

Бібліографічний список

1. Горбунов Л.В., Безуглий М.Д., Морозова І.А. Пристрій для заморожування-відтавання біооб'єктів. Позитивне рішення від 16.04.99 по заявці №98041888/В від 14.04.98.

2. Зайдель А. Н. Погрешности измерений физических величин. - Л.: Наука, 1985. - 112 с.

3. Vajta et al., P. Holm and H. Callesen. Open Pulled Straw [OPS] Vittrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos // Molecular reproduction and development. - 1998. - V.51. - p.53-58.

4. Glover A.I., Garith L.S. The freezing rate of freeze-etch specimens for electron microscopy // Cryobiology. - 1974 - 11, N 3. - P. 248-254.

5. Schwabe K.G., Terracio Z. Ultrastructural and thermocouple evaluation of rapid freezing technique // Cryobiology. - 1980. - 17, N6. p571-584.

Предложен кондуктометрический способ измерения сверхвысоких скоростей теплообмена ($B \geq 6 \cdot 10^3$ °C/мин), дающий возможность определять численные значения условий криоконсервации с погрешностью не более 3% для контейнеров, содержащих среду с концентрацией глицерина ($C \geq 30\%$). Измерение интенсивности теплообмена позволяет производить не только качественный анализ исследуемых параметров по сравнению с общепринятым, но и количественный при разнообразных условиях проведения эксперимента. Это дает возможность использовать предложенный способ в исследованиях для установления взаимосвязи сохранности биообъекта при различных условиях проведения криоконсервации.

The conductometric way of the super-high heat exchange rates measurement ($B \geq 6 \cdot 10^3$ °C/min) giving an opportunity to determine numerical importance of cryopreservation conditions with error no more than 3 % for boxes containing the glycerol solution ($C \geq 30\%$) is submitted in this work. The measurement of heat exchange intensity allows to make not only qualitative analysis of researched parameters, in comparison with standard, but also quantitative analysis at various conditions of the experiments realisation. It enables to use the offered way in researches for establishment of interrelation bioobject safety at various conditions of cryopreservation realisation