

Влияние ультразвука на процесс замерзания криозащитных растворов для осетровых

Садикова Диана Габдельфартовна, кандидат физико-математических наук,
научный сотрудник

Андреев Алексей Алексеевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт Биофизики клетки РАН (г. Пущино)

Обычно применяемые методы замораживания криозащитных растворов приводят к образованию микрочастиц льда [1, 11]. Микрочастицы льда могут иметь разную форму. От формы частиц льда может зависеть степень повреждения живых клеток, подвергаемых замораживанию [11]. Условия, при которых замораживает водный раствор существенно влияют как на формирование частиц льда, так и на степень повреждения замораживаемых живых клеток.

Перспективным представляется использование в процессе криоконсервации ультразвука так как он способен влиять на проницаемость мембран клеток к криопротекторам [3], а также влиять на процессы

образования микрочастиц льда при замерзании раствора [7, 9, 12].

Цель настоящей работы было изучить влияние на процессы охлаждения и замерзания криозащитных растворов ультразвукового излучения терапевтической мощности 1 Вт/см^2 , частотой 0.88 МГц .

Криозащитные растворы

В качестве базового криозащитного раствора использовался физиологический раствор для осетровых [13], дополнительные компоненты - $12\% \text{ DMSO}$ и яичный желток - 100 мг/мл (10%). В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

Экспериментальная система

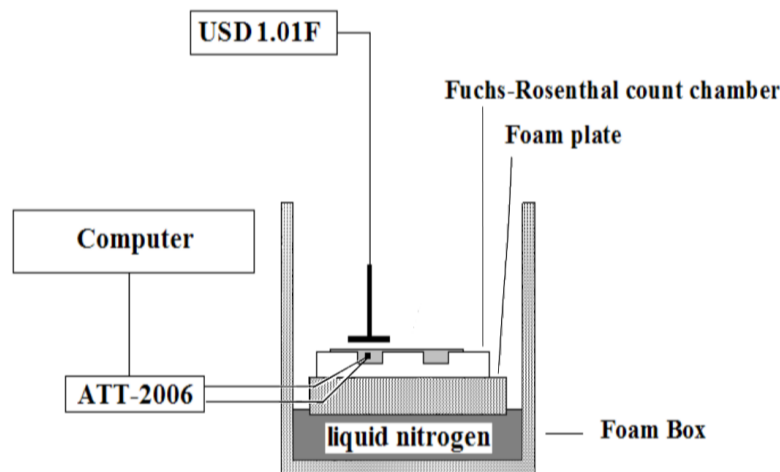


Рисунок 1. Экспериментальная система

Система состоит из пенопластового бокса (Foam Box) для замораживания (freezing) образца в парах жидкого азота (liquid nitrogen $\text{LN}_2\text{vapor/LN}_2$) при температуре -130°C . Микроскоп Orthoplan (Германия), объектив $\times 4/0.1$, Planchomat. Температуру измеряли непосредственно в замораживаемом образце термометром АТТ-2006 Aktakom, Taiwan, термопара медь-константан (Copper/Constantan microthermocouple), регистрация цифровая. Для замораживания образца использовали стеклянную камеру Фукс-Розенталя (Fuchs-Rosenthal count chamber), объем образца 10 мкл .

В работе использовали охлаждение криозащитных растворов в парах жидкого азота (-130°C). Замораживание проводилось в двух ячейках камеры Фукса Розенталя параллельно. Одна ячейка была контрольной (без УЗ воздействия), вторая с ультразвуковым воздействием во время замораживания. Экспериментальный раствор замораживали при направленном воздействии ультразвуковой волны частотой 0.88 МГц и интенсивностью 1 Вт/см^2 . В качестве источника излучения использовали аппарат

для ультразвуковой терапии УЗТ 1.01 Ф (Россия). Источник излучения находился на расстоянии 2 см от образца все время замораживания (рис. 1).

Математический анализ полученных данных проводился демонстрационной версией программы Sigma Plot 13 Demo.

Криозащитные растворы были использованы в сочетании: 1) дистиллированная вода (ДВ), 2) физиологический раствор для осетровых (ФРО), 3) ФРО + $12\% \text{ диметилсульфоксид}$ (ДМСО) 4) ФРО + $12\% \text{ ДМСО}$ + $10\% \text{ яичный желток}$ (ЯЖ).

Температурные кривые процесса охлаждения растворов показаны на рис. 2. Регистрацию температуры в контроле и при облучении УЗ проводили параллельно. При температуре ниже 0°C начинается процесс образования кристаллов льда (стадия I), далее при охлаждении происходит формирование сплошной массы льда (стадия II), лед растрескивается (стадия III) и формируются микрочастицы под действием термомеханических напряжений (стадии III и IV).

Общая последовательность событий при замерзании всех растворов была одинаковой. Различались только типичные температуры для первых трех стадий замерзания. Температура замерзания раствора зависела от концентрации растворенных веществ и с достаточной точностью соответствовала теоретическим расчетам по криоскопической константе [2].

На рисунке 2 видно, что ультразвуковое излучение существенно влияет на кинетику замерзания

используемых растворов. Температурная кривая быстрее выходит на плато при температуре около -100°C , тогда как в контроле температура зависит от состава криозащитного раствора. В контроле вода замерзает при температуре -120°C , ФРО – при -130°C , ФРО + 12% ДМСО – при -117°C , а ФРО + 12% ДМСО + 10% ЯЖ – при -142°C . Вероятно данный эффект происходит из-за теплового эффекта ультразвукового воздействия на раствор.

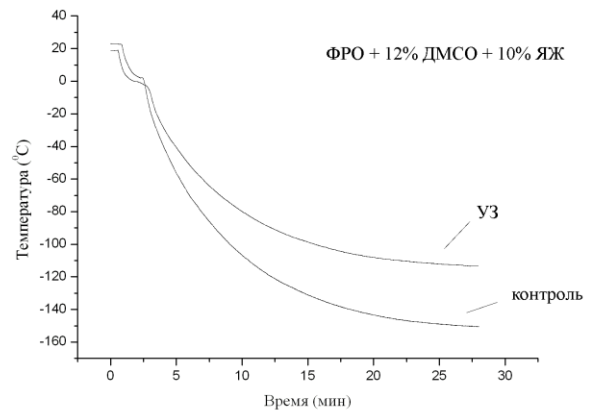
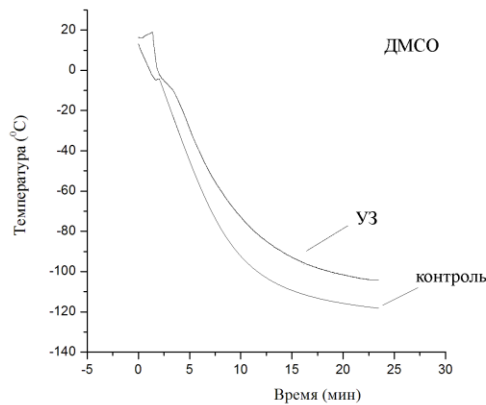
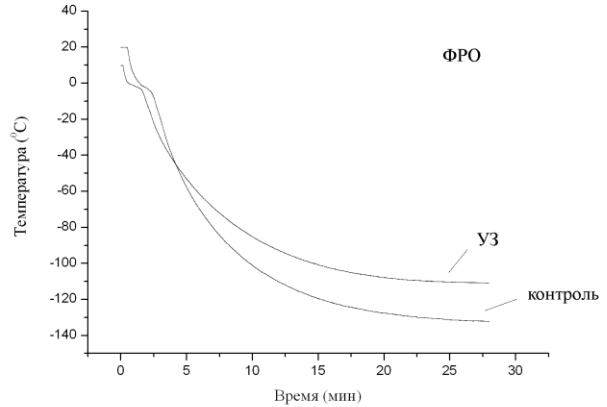
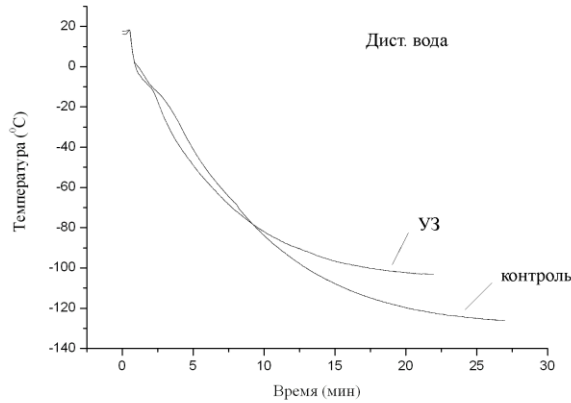


Рисунок 2. Термограмма охлаждения криозащитных растворов при медленном охлаждении. (контроль) – в парах жидкого азота. (УЗ) – в парах жидкого азота с облучением ультразвуком в процессе охлаждения частотой 0.88 МГц и интенсивностью 1 Вт/см². 1 – дистиллированная вода, 2 – физиологический раствор для осетровых, 3 – ФРО + 12% ДМСО и 4 – ФРО + 12% ДМСО + 10% ЯЖ.

Начиная от точки замерзания раствора, зависимость температуры от времени нахождения в парах азота являются экспоненциальными и описываются выражением:

$$f = y_0 + v_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$$

где y_0 – температура в стационарном состоянии, v_0 – скорость в начальный момент времени, k – константа скорости охлаждения (скорость образования связей при замерзании), t – время. Такое выражение справедливо для простой реакции первого порядка [8].

Вода может образовывать четыре водородные связи с другими молекулами. При образовании льда каждая молекула воды окружена четырьмя другими молекулами воды, в результате чего образуется гексагональная кристаллическая решетка (рис. 3). В такой структуре постоянное (фиксированное) положение занимают только атомы кислорода, в то время как атомы водорода принимают различное положение [5].

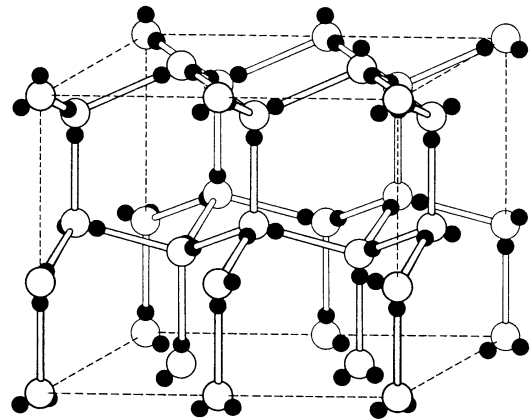


Рисунок 3. Гексагональная структура льда [14].

Скорость замерзания раствора зависит от скорости образования микрочастиц льда или связей между молекулами вещества в растворе. От сочетания таких связей зависит форма микрочастиц льда.

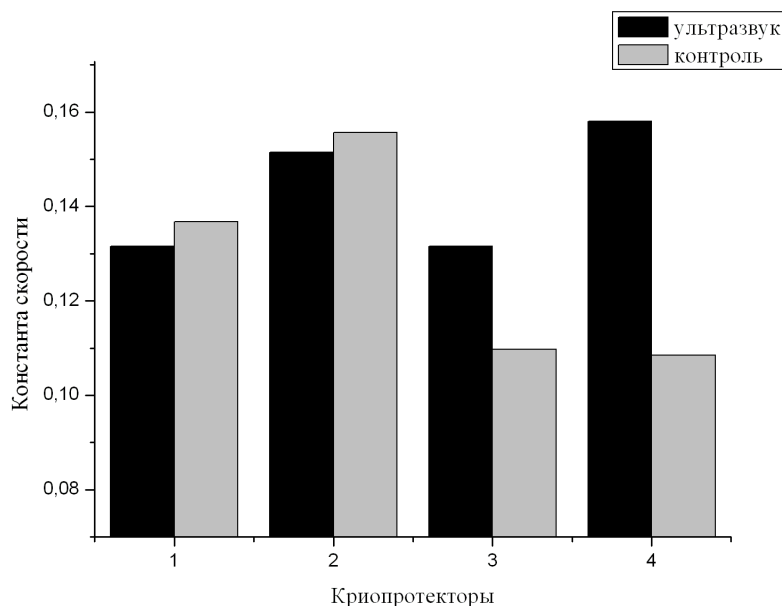


Рисунок 4. Константа скорости охлаждения для криозащитных растворов. ■ - охлаждение без ультразвука (контроль), ■ – охлаждение в сочетании с облучением ультразвуком. 1 – дистиллированная вода, 2– физиологический раствор для осетровых, 3 - ФРО + 12% ДМСО и 4 - ФРО + 12% ДМСО + 10% ЯЖ.

На рис. 4 показаны изменение константы скорости при облучении ультразвуком во время замерзания раствора, и в контроле (без ультразвука). Видно, что для воды и физиологического раствора, константа (k) практически не изменяется, тогда как для растворов включающие в себя ДМСО и яичный желток отличие значительное. Чем больше величина константы скорости, тем меньше скорость охлаждения твердой фазы.

Можно сказать, что ультразвук изменяет скорость охлаждения твердой фазы и температуру равновесного состояния замороженного раствора. Причем влияние ультразвука на скорость охлаждения твердой фазы криораствора в составе которого находится ДМСО и яичный желток значительно по сравнению с буферными растворами.

Известно, что воздействие ультразвука может привести к разрушению ковалентных связей в воде и водных растворах [6], в частности молекула воды может распасться на ионы H^+ и OH^- в дальнейшем образуя соединения H_2O [10].

Так как интенсивность используемого нами ультразвукового излучения не выходит за терапевтический диапазон, разрушение ковалентных связей в

нашем случае маловероятно. Однако, при распространении ультразвуковой волны, происходит колебательное движение молекул среды в результате, которого возможно и снижается скорость охлаждения твердой фазы (тв.ф.) растворов, используемых в нашей работе.

В работе [1] было показано, что уменьшение скорости охлаждения тв.ф. раствора влияют на форму и размер микрочастиц льда образующихся при их замерзании. Причем, при уменьшении скорости охлаждения увеличивались как периметр, так и площадь микрочастиц льда. Можно предположить, что использование ультразвука при охлаждении раствора приведет также к изменению площади, периметра и фактора формы микрочастиц льда.

В заключении можно сказать, что использование ультразвука может стать перспективным для изменения условий замерзания среды и дальнейшего изучения процесса образования микрочастиц льда при криоконсервации биологических ресурсов в разных условиях. Таким образом, использование ультразвука может дать новые способы и методы криоконсервации генетического материала.

Литература:

1. Андреев А.А., Садикова Д.Г. и др., Замерзание криозащитных растворов и выживание спермиев рыб при криоконсервации. Биофизика, 2009. Т. 54. № 5. с. 869-875.
2. Борода А.В. Дис. ... канд. биол. наук (ИБМ ДВО РАН, 2010).
3. Вишневецкий В.И., Стимулирующий ультразвук и криоконсервирование. Криобиология, №4. 1989. с 3-11.
4. Гончаров Б.Ф. Влияние состава среды культивирования на способность фолликулов осетровых рыб реагировать созреванием на действие гонадотропных гормонов. Сб. Вопросы раннего онтогенеза рыб. К.: Наукова Думка, 1978. с. 77-78.
5. Зацепина Г.Н. Физические свойства и структура воды. М.: Издательство МГУ, 1998. 184 с.
6. Кабачный В.И. и др. Физическая и коллоидная химия. Х.: изд-во НФАУ, 2001. 368 с.
7. Капустин А.П. Влияние ультразвука на кинетику кристаллизации. Изд. АН СССР, 1962. 108 с.
8. Э. Корниш-Боуден. Основы ферментативной кинетики. Изд. Мир, 1979. 282 с.
9. Новиков А.Н., Вишневецкий В.И., Душейко А.Г. Влияние ультразвуковых колебаний на первичное зародышеобразование льда в биологических растворах. Криобиология и криомедицина, 1982. вып. 10. с. 19-22.

10. Попова Н.В., Фатеева С.А. Изучение влияния ультразвукового воздействия на показатели качества воды. Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии», 2014. Т. 2. № 1. с. 30-33.

11. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. К.: Наук. думка, 1977. 285 с.

12. Садикова Д.Г., Андреев А.А. Влияние ультразвука на замерзание водных растворов. // Сб. Биология – наука XXI века, Пушино, 2010. с. 215-215.

13. Burzawa-Gerard E., Goncharov B.F., Dumas A., Fontaine Y.A. // Gen.Comp.Endocrinol, 1976. V. 29. № 4. P. 498-505.

14. <http://www.benbest.com/cryonics/icecryst.gif>