

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Сакун Олександр Валерійович

УДК 57.043:611.018

**АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ З
ПОСТІЙНОЮ ТА ЗМІННОЮ ШВИДКІСТЮ ОХОЛОДЖЕННЯ**

03.00.19 – кріобіологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2009

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник:

доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник **Гордієнко Ольга Іванівна**, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, провідний науковий співробітник відділу низькотемпературної консервації.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Бабійчук Любов Олександрівна**, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, завідувач відділу кріоцитології і кількісної морфології;

доктор біологічних наук, академік УААН, професор **Осташко Федір Іванович**, Інститут тваринництва УААН, головний науковий співробітник.

Захист відбудеться 17 листопада 2009 р. о 13.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий 15 жовтня 2009 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої
ради академік НАН
України

А.М. Гольцев

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Для тривалої підтримки життєздатності і стабільності властивостей мікроорганізмів широко використовується кріоконсервування за низьких та наднизьких температур. Успіх кріоконсервування багато в чому визначається режимами заморожування. Оптимальними режимами заморожування для дріжджових клітин вважають повільні швидкості заморожування: 7 – 10°C/хв (Mazur P.,1968); 3 – 4°C/хв (Lerock J.R., Keith A.D., Kruuv J.,1984) або двохетапні програми заморожування з повільним заморожуванням на першому етапі і наступним зануренням у скраплений азот (Kirsop B., Henry J.,1984). Критична швидкість охолодження, при якій формуються внутрішньоклітинні кристали льоду, визначається типом клітини, зокрема, поверхнево – об'ємним відношенням клітини і проникністю її мембрани для молекул води: більші, сферичні клітини і клітини, які менш проникні для води, мають нижчі критичні швидкості охолодження (Dumont F., Marechal P.A., Gervais P.,2004).

Більшість розроблених до теперішнього часу способів низькотемпературного консервування ґрунтуються на лінійних або кусочно – лінійних режимах охолодження. При цих режимах в різних діапазонах температур швидкість охолодження має постійне, хоча і не однакове, значення. Поряд з цими традиційними режимами охолодження все ширше застосовуються і нелінійні режими, при яких швидкість охолодження безперервно змінюється в процесі заморожування. Прикладом такого режиму охолодження є так зване швидке двохступінчасте заморожування, при якому для кріоконсервування мікроорганізмів використовують заморожування шляхом занурення у спиртову ванну, яка заздалегідь охолоджена до фіксованої температури, з подальшим зануренням у скраплений азот. Така технологія заморожування забезпечує експоненціальні режими охолодження, які мають таку ж саму ефективність кріоконсервування, що і охолодження з постійною швидкістю, але значно скорочують тривалість і трудомісткість процедури. Наразі ці режими охолодження не мають точного наукового обґрунтування і підбираються емпірично. Отже, виникає проблема теоретичного обґрунтування ефективності нелінійних режимів у порівнянні з лінійними режимами заморожування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах відомчих науково – дослідних тем Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України «Теоретичний аналіз та експериментальне дослідження специфічних механізмів кріопшкодження і кріозахисту клітин, обумовлених особливостями їх функціонування» (номер держреєстрації 0106U002164) та «Вивчення впливу умов кріоконсервування і зберігання

дріжджоподібних грибів, постнатальних фіброblastів і клітинних культур, що перевиваються» (номер держреєстрації 0104U003919).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є побудова та експериментальне підтвердження кількісної моделі кріопошкодження суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у розчині «диметилсульфоксид (10 об.%) – 0,135М хлориду натрію – вода» при лінійних та нелінійних режимах охолодження на етапі її кристалізації.

Для досягнення поставленої мети вирішені наступні завдання:

1) визначити транспортні та геометричні параметри мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* методами вольюмометрії, світлової мікроскопії і термодинаміки незворотних процесів;

2) створити теоретичну модель кріопошкодження суспензії клітин *Saccharomyces cerevisiae* на етапі її кристалізації та визначити оптимальні з погляду двохфакторної теорії кріопошкодження лінійний і нелінійний режими її охолодження;

3) визначити зв'язок між швидкістю охолодження на етапі кристалізації і колонієутворюючою здатністю дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* після заморожування – відтаювання суспензії цих клітин у розчині «диметилсульфоксид (10 об.%) – 0,135М хлориду натрію – вода» при лінійних режимах охолодження;

4) методом термографії експериментально визначити розкид швидкостей охолодження на етапі кристалізації в контейнері циліндричної форми при заморожуванні суспензії дріжджоподібних клітин *Saccharomyces cerevisiae* зі сталими швидкостями та вплив цього чинника на колонієутворюючу здатність мікроорганізмів після їх заморожування – відтаювання;

5) теоретично обґрунтувати та експериментально підтвердити ефективність нелінійного режиму охолодження при кріоконсервації мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae*.

Об'єкт дослідження. Кріоконсервування дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae*.

Предмет дослідження. Вплив лінійних і нелінійних режимів охолодження на етапі кристалізації суспензії мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* на життєздатність цих клітин після заморожування – відтаювання.

Методи дослідження: вольюмометричний метод для визначення коефіцієнтів проникності клітинних мембран мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* для молекул води та кріопротекторів, об'ємної частки розчинених в цитоплазмі клітин осмотично неактивних речовин і енергії активації процесів трансмембранного переносу речовин; світлова мікроскопія для визначення геометричних параметрів дріжджоподібних грибів;

термографія для визначення розподілу швидкостей охолодження в контейнері з суспензією клітин за різних умов охолодження; визначення збереженості дріжджових клітин чашковим методом Коха за кількістю макроколоній, що утворюються на твердому живильному середовищі, для визначення ефективності різних режимів охолодження; теоретичне моделювання кріопошкодження клітин внаслідок внутрішньоклітинного льодоутворення та перебування в гіпертонічному розчині.

Наукова новизна одержаних результатів. В роботі вперше сформульована кількісна модель кріопошкодження клітин, що кріоконсервуються, на етапі кристалізації, яка створює можливість визначити оптимальні умови їх охолодження, спираючись на невелику кількість даних про транспортні та геометричні параметри цих клітин. Вперше доведено, що механізм кріозахисної дії швидкого двохступінчастого охолодження принципово не відрізняється від оптимального з погляду двохфакторної теорії кріопошкодження режиму охолодження зі сталою швидкістю. Встановлено, що оптимальний нелінійний режим охолодження дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* може бути реалізований шляхом занурення контейнера діаметром 10 мм з цим біооб'єктом в охолоджену до -35°C рідину на 25 хвилин з подальшим швидким охолодженням у скрапленому азоті. Визначені величини енергії активації процесів проникання води та кріопротекторів крізь плазматичну мембрану *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, що 1,2 – пропандіол впливає на плазматичну мембрану *Saccharomyces cerevisiae*, знижуючи енергію активації проникання молекул води крізь неї.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані в роботі результати можуть бути використані при розробці способів кріоконсервування мікроорганізмів з використанням лінійних і нелінійних режимів заморожування. Визначені в роботі коефіцієнти проникності для кріопротекторів та значення енергії активації їх проникання можуть бути використані при розробці нових і для пошуку шляхів вдосконалення існуючих методів кріоконсервування.

Особистий внесок здобувача. Автором роботи самостійно проведено аналіз літератури за темою дисертації, створено теоретичну модель, яка дозволяє, спираючись на невелику кількість даних про їх транспортні та геометричні параметри, визначити оптимальні умови охолодження суспензії дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae*. Здобувачем особисто отримані експериментальні дані, подані в усіх розділах дослідження, проведена їх статистична обробка. Теоретична частина роботи виконувалась самостійно за консультативної участі наукового керівника доктора фізико – математичних наук Гордієнко О. І. Автором роботи самостійно проаналізовані отримані результати та зроблені висновки.

В опублікованих спільно зі співавторами наукових працях особистий внесок здобувача полягає в наступному:

– у роботі [1] – у вдосконаленні теоретичної моделі пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини, експериментальних дослідженнях транспортних і геометричних характеристик мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae*;

– у роботі [2] – у побудові фізико – математичної моделі та визначенні ймовірності пошкодження клітин при кристалізації ефектами розчину та за рахунок внутрішньоклітинної кристалізації;

– у роботі [3] – в експериментальному дослідженні транспортних і геометричних характеристик клітин *Saccharomyces cerevisiae*;

– у роботі [4] – в експериментальному дослідженні та теоретичному розрахунку транспортних і геометричних характеристик мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae*;

– у роботах [5, 7] – у проведенні експериментів, аналізі результатів;

– у роботі [6, 13] – в експериментальному дослідженні температурного поля в зразках, що заморожуються, та колонієутворюючої здатності мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* після циклу «заморожування – відтаювання»;

– у роботах [8 – 12,14] – у вдосконаленні теоретичної моделі пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини, в експериментальних дослідженнях транспортних і геометричних характеристик *Saccharomyces cerevisiae*.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на науковій конференції з міжнародною участю «Нові кріобіотехнології для розв'язання фундаментальних і прикладних задач медицини» (Харків, 2008), міжнародній конференції «Біофізичні механізми функціонування живих систем» (Львів, 2008), XXIII – й науковій конференції країн СНД «Дисперсні системи» (Одеса, 2008), конференції «Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия» (Пушино, 2008); щорічній науковій конференції молодих учених «Холод в біології і медицині» (Харків, 2009).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 5 статей у наукових фахових виданнях і 9 тез доповідей на вітчизняних і міжнародних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи дослідження», двох розділів з результатами власних досліджень, підсумку, висновків і списку використаної літератури, який складається зі 109 джерел на 11 сторінках. Робота містить 10 таблиць і 31 рисунок, з них 2 рисунки на одній окремії сторінці. Повний обсяг дисертації складає 120 сторінок друкованого тексту.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** розкрито сутність і сучасний стан наукової проблеми, пов'язаної із розробкою ефективних режимів кріоконсервування мікроорганізмів, обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету і завдання дослідження, вказано новизну і практичну цінність отриманих результатів, особистий внесок здобувача в опубліковані із співавторами роботи.

В **огляді літератури** розглянуто особливості будови дріжджових клітин та проведено аналіз існуючих експериментальних даних щодо кріоконсервування мікроорганізмів, впливу режимів заморожування та складу кріозахисних середовищ на виживання клітин після заморожування – відтаювання, висвітлений взаємозв'язок між біофізичними характеристиками мембран клітин та значенням оптимальної швидкості охолодження клітинної суспензії, порівняні переваги та недоліки лінійних і нелінійних режимів охолодження клітин, що кріоконсервуються.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведені на дріжджових клітинах *Saccharomyces cerevisiae* – промисловий штам (раса 608, СП ВО РНДІХП, Санкт – Петербург). Клітини дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* вирощували на скошеному сусло – агаровому середовищі при температурі 30°C на протязі 48 годин. Для заморожування використовували суспензію клітин з концентрацією 10^5 КОЕ/мл, у кріозахисному середовищі «диметилсульфоксид (10 об.%) – 0,135М хлориду натрію – вода». Проникність плазматичної мембрани клітин мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* визначали для 1 М концентрацій кріопротекторів (1,2 – пропандіол (1,2 – ПД), диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин).

Для заморожування зразків за нелінійними режимами використовували кріостат, який забезпечує охолодження біологічних об'єктів від кімнатної температури до заданої субнульової температури у межах від 0°C до –40°C і підтримання її з точністю 0,2°C. Дискретність установки температури складає 0,1°C. Заморожування зразків у лінійному режимі здійснювали з використанням програмного охолоджуючого пристрою УОП – 6, призначеного для програмного охолодження й відігрівання біологічного матеріалу в контейнерах. Заморожування та вивчення температурного поля зразків здійснювали в герметичних циліндричних контейнерах діаметром 30 мм, 20 мм і 10 мм, виготовлених з термостійкого пластика із товщиною стінок 1 мм. Контроль температури здійснювали

чотирма термопарами, розміщеними біля внутрішньої стінки контейнера (1), в центрі контейнера (3), посередині між термопарами (1) та (3) (термопара (2)), і біля зовнішньої стінки контейнера (4). Термограми реєструвались 12 – розрядним автоматичним самописцем – потенціометром з періодичністю опитування 16 секунд.

Заморожування зразків у нелінійному режимі здійснювали в два етапи:

1) охолодження контейнера у спиртовому кріостаті при температурі -25°C або -35°C протягом 5 або 25 хвилин; 2) занурення охолоджених зразків у скраплений азот. Заморожування зразків у лінійному режимі здійснювали зі швидкостями $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ та $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до досягнення температури -100°C на осьовій термопарі, після чого охолоджені зразки занурювали у скраплений азот. Відігрівання усіх зразків здійснювали у водяній ванні при температурі 30°C до кімнатної температури. Життєздатність клітин дріжджів оцінювали «чашковим методом Коха» (Лабинская В.С., 1978).

Коефіцієнт фільтрації та коефіцієнти проникності цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* для кріопротекторів визначали вольюмометричним методом. Досліджували кінетику зміни розмірів клітин у розчинах кріопротекторів (гліцерин, 1,2 – ПД, ДМСО) при температурі 25°C та 10°C під мікроскопом Axio Observer Z1 (масляно – імерсійний об'єктив х63) за допомогою програми Axio Vision Rel. 4.6. Експериментально визначені часові залежності об'єму клітин при їх контакті з гіпертонічними розчинами кріопротекторів апроксимували чисельними рішеннями системи удосконалених нелінійних рівнянь, що описують цю залежність у наближенні лінійної термодинаміки незворотних процесів (Гордієнко Е. А., Пушкарь Н. С., 1994; Гордієнко Є. О. та ін., 2008).

Статистичну обробку експериментальних результатів здійснювали стандартним методом з використанням t – критерію Стьюдента при ймовірності влучення у довірчий інтервал $p \geq 0,95$.

Матеріали і методи розглянуто і схвалено комісією з біоетики ІПКіК НАН України.

Результати власних досліджень та їх обговорення

Проникність мембран дріжджових клітин для молекул води і кріопротекторів. Визначали біофізичні характеристики мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* – величину осмотично неактивного об'єму клітин, проникність їх плазматичних мембран для молекул води і кріопротекторів та значення енергії активації процесів їх проникання. У теоретичній частині розділу розглянуті та удосконалені рівняння масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини. Удосконалена модель має більш широку область

застосування, ніж рівняння Кедем–Качальського. На відміну від них, в отриманій нами системі диференціальних рівнянь відсутня так звана середньологарифмічна концентрація, тобто величина, яка не має чіткого тлумачення й ускладнює інтерпретацію отриманих результатів, а коефіцієнт проникності мембрани щодо s – тої розчиненої речовини не залежить від складу позаклітинного та внутрішньоклітинного середовищ.

Для визначення осмотично неактивного об'єму клітини вміщували у серію розчинів непроникаючої речовини $NaCl$ з концентраціями від 0,15 до 1 моль/л. Лінійні розміри клітин визначали за допомогою програми AxioVision Rel. 4.6. Об'єм клітин апроксимували об'ємом розтягнутого еліпсоїда обертання. Експериментальні дані апроксимували методом найменших квадратів рішенням рівняння, що описує поведінку клітинного об'єму y у випадку двохкомпонентного розчину непроникаючої (k -тої) речовини набуває вигляду

$$\frac{dy}{dt} = \gamma L_p \pi_0 \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} - \frac{n_e^{out}}{n_{e0}^{in}},$$

де y – відносний об'єм клітини;

t – час;

γ – поверхнево – об'ємне відношення клітини;

L_p – коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани;

π_0 – початкове значення осмотичного тиску позаклітинного розчину;

α – об'ємна частка розчинених усередині клітини осмотично неактивних речовин;

n_e^{out} – концентрація (мольна частка) позаклітинного розчину;

n_{e0}^{in} – початкове значення концентрації внутрішньоклітинного розчину.

При $t \rightarrow \infty$ отримуємо

$$y_\infty = \alpha + \frac{\hat{\pi}_{e0}^{in} (1 - \alpha)}{\hat{\pi}_e^{out}} = \alpha + 1 - \alpha x,$$

де $\hat{\pi}_{e0}^{in}$ – початкове значення приведенного осмотичного тиску внутрішньоклітинного розчину;

$\hat{\pi}_e^{out}$ – приведений осмотичний тиск позаклітинного розчину;

$$x = \frac{\hat{\pi}_{e0}^{in}}{\hat{\pi}_e^{out}}$$

Отримана величина осмотично неактивного об'єму дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* становить $\alpha = 0,27$ і узгоджується з даними інших авторів (Mazur P., 1963; Wood T.H., Rosenberg A.M., 1957).

Для визначення коефіцієнтів фільтрації та коефіцієнтів проникності клітинних мембран для кріопротекторів експериментально визначали часові залежності об'єму клітин при їх контакті з гіпертонічними розчинами кріопротекторів, які апроксимували рішеннями створеної удосконаленої системи рівнянь трансмембранного масопереносу. Отримані значення шуканих параметрів подані в табл. 1 – 2.

Таблиця 1

Коефіцієнти фільтрації ($\text{м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}\times 10^{14}$) клітинної мембрани дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* і визначена в середовищах різного складу енергія активації (кДж/моль) процесу переносу води крізь неї.

Склад середовища	Коефіцієнт фільтрації		Енергія активації
	10°C	25°C	
Гліцерин– вода– NaCl	0,53±0,12	0,9±0,18	24,6
1,2 – ПД– вода – NaCl	0,79±0,1	1,03±0,14	12,4
ДМСО – вода – NaCl	0,54±0,08	0,92±0,2	24,5

Таблиця 2

Коефіцієнти проникності для кріопротекторів ($\text{м}/\text{с}\times 10^8$) і енергія активації процесу їх переносу крізь клітинну мембрану дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* (кДж/моль).

Речовина	Коефіцієнт проникності		Енергія активації
	10°C	25°C	
Гліцерин	0,42±0,1	0,74±0,12	26,23
1,2 – ПД	0,4±0,13	0,7±0,2	25,75
ДМСО	0,39±0,07	0,88±0,4	37,7

Результати свідчать про можливу негативну дію 1,2 – ПД на мембрани клітин, що призводить до збільшення коефіцієнта фільтрації та зменшення енергії активації проникання молекул води у середовищі цього кріопротектора. Коефіцієнти проникності для всіх досліджених кріопротекторів вірогідно не відрізняються. Гідрофобність молекул ДМСО є суттєво вищою порівняно як з молекулами гліцерину, так і 1,2 – ПД, що надає можливість молекулам ДМСО з більшою вірогідністю проникати крізь ліпідний бішар та призводить до збільшення енергії активації проникання молекул цієї речовини крізь мембрану.

Порівняльний аналіз ефективності лінійних і швидких двохступінчастих режимів охолодження суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae*. Побудована кількісна модель кріпошкодження суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у розчині «диметилсульфоксид (10 об.%) – 0,135М хлориду натрію – вода» при лінійних та нелінійних режимах охолодження на етапі її кристалізації. Імовірність утворення внутрішньоклітинного кристалу льоду в одиницю часу в пересиченому внутрішньоклітинному розчині дорівнює

$$W_1 = \frac{[\hat{c} \hat{T} - \hat{c}_m]^2}{A} \exp \left\{ -\frac{B}{\hat{T}^3 [\hat{c} \hat{T} - \hat{c}_m]^2} \right\},$$

де A і $B = \frac{\pi 10^4 v_i^2 \sigma^3}{81 k T_{e0}^3 c_{e0}^2}$ – константи;

v_i – об'єм молекули води в кристалічній фазі;

σ – коефіцієнт поверхневого натягу границі розділу твердої і рідкої фаз;

k – постійна Больцмана;

T_{e0} – абсолютна температура, при якій завершується плавлення позаклітинного розчину;

c_{e0} – сумарна мольна частка розчинених в позаклітинному середовищі речовин при температурі плавлення позаклітинного розчину T_{e0} ;

$$\hat{c} \equiv \frac{\tilde{c}}{c_{e0}};$$

$\tilde{c} \hat{T}$ – концентрація позаклітинного розчину, при якій цей розчин знаходиться у термодинамічній рівновазі з льодом при температурі T ;

$$\hat{T} = \frac{T}{T_{e0}} \text{ – приведена температура;}$$

T – поточне значення абсолютної температури;

$\hat{c}_{in} = \frac{c_{in}}{c_{e0}}$ – приведена концентрація розчинених речовин у внутрішньо –клітинному

розчині;

c_{in} – поточне значення сумарної мольної частки розчинених у внутрішньоклітинному середовищі речовин.

Тому ймовірність утворення внутрішньоклітинного кристалу льоду в пересиченому внутрішньоклітинному розчині за час кристалізації позаклітинного розчину визначається інтегралом за часом t від моменту часу t_{e0} , при якому починається кристалізація в позаклітинному розчині, до моменту t_E , при якому температура позаклітинного розчину стає рівною його евтектичній температурі: $W^* = \int_{t_{e0}}^{t_E} W_1 dt$.

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

$$W^* = \int_{t_{e0}}^{t_E} \frac{[\hat{c} \hat{T} - \hat{c}_{in}]^2}{A} \exp \left\{ -\frac{B}{\hat{T}^3 [\hat{c} \hat{T} - \hat{c}_{in}]^2} \right\} dt \rightarrow \min. \quad (1)$$

Оскільки в рамках двохфакторної теорії кріопошкодження утворення кристалу льоду в клітині неминуче призводить до її загибелі, ймовірність W^* в (1) можна ототожнити з ймовірністю загибелі клітини за рахунок внутрішньоклітинної кристалізації. Крім того, оскільки в клітинній суспензії, що заморожується, дуже велика кількість клітин (у випадку, який ми досліджуємо, біля 10^5 клітин у 1 мл), можна розглядати сукупність клітин як статистичний ансамбль і ототожнити ймовірність W^* з часткою клітин, які пошкоджуються на етапі кристалізації клітинної суспензії за рахунок утворення внутрішньоклітинного льоду.

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 з подовженням часу експозиції клітин в ньому. Одною з найпростіших залежностей для ймовірності кріопошкодження клітин на етапі кристалізації ефектами розчину, яка враховує дві вказані вище характерні особливості дії

цього чинника на біологічні об'єкти, що кріоконсервуються, є наступна залежність цієї імовірності від концентрації поза – і внутрішньоклітинного гіпертонічних розчинів та від тривалості контакту з ними:

$$W^{**} = \frac{1}{2D} \int_{t_{e0}}^{t_E} (\hat{c}_m \hat{c}) dt, \quad (2)$$

де $D = 3168$ хв.

Визначена таким чином імовірність пошкодження клітин ефектами розчину зростає зі збільшенням тривалості їх дії. Вибір підінтегрального виразу у вигляді добутку концентрацій поза – і внутрішньоклітинного розчинів враховує ту обставину, що пошкодження структурних і функціональних елементів клітини може відбуватись як у результаті безпосереднього контакту зовнішньої поверхні мембрани клітини з оточуючим її позаклітинним розчином, так і в результаті пошкодження мембрани та субклітинних структур оточуючим їх внутрішньоклітинним гіпертонічним розчином. У загальному випадку, як відомо, при заморожуванні клітин $\hat{c}_m \neq \hat{c}_{out}$.

Біологічний сенс константи D у виразі (2) полягає в наступному: вона дорівнює тривалості експозиції клітин у кріозахисному розчині при температурі його плавлення, після якої життєздатність втрачають 50% клітин. Як показали проведені нами експерименти, дріжджоподібні гриби *Saccharomyces cerevisiae* при помірних осмотичних навантаженнях мають порівняно велику стійкість до них: при експозиції у розчині «диметилсульфоксид (10 об'ємних %) – 0,135М NaCl – вода» за температури -4°C впродовж приблизно 2,2 діб їх колонієутворююча здатність падає лише на 50%, що відповідає значенню $D = 3168$ хв.

Оскільки ефекти розчину і внутрішньоклітинна кристалізація пошкоджують клітини незалежно одне від одного, ймовірність W пошкодження клітин на етапі кристалізації при заморожуванні клітинної суспензії дорівнює сумі указаних вище ймовірностей (1) та (2):

$W = W^* + W^{**}$. При заданій сталій швидкості охолодження $\frac{dT}{dt} = -\beta$ $\beta > 0$ отримуємо

$$W = -\frac{T_{e0}}{\beta A} \int_1^{\hat{T}_E} \left[\hat{c} \hat{T} - \hat{c}_m \right]^2 \exp \left\{ -\frac{B}{\hat{T}^3 \left[\hat{c} \hat{T} - \hat{c}_m \right]^2} \right\} d\hat{T} - \frac{T_{e0}}{2D\beta} \int_1^{\hat{T}_E} \hat{c}_m \hat{c} d\hat{T} = \min, \quad (3)$$

де $\hat{T}_E = \frac{T_E}{T_{e0}}$ – приведена евтектична температура позаклітинного розчину;

T_E – евтектична температура позаклітинного розчину.

Величина $W \cdot 100\%$, очевидно, дорівнює відсотку пошкоджених в процесі кристалізації суспензії клітин. Знаючи визначені раніше біофізичні параметри клітин, що заморожуються, і діаграму плавлення кріозахисного розчину, за рівнянням (3) за

допомогою стандартних комп'ютерних програм нескладно розрахувати, як кількість клітин, що пошкоджуються, залежить від швидкості охолодження (рис. 1).

Рис. 1. Кількість клітин, що пошкоджуються за рахунок сумарної дії ефектів розчину і внутрішньоклітинної кристалізації (суцільна лінія) в залежності від швидкості охолодження при заморожуванні суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* в розчині «диметилсульфоксид (10 об'ємних %) – 0,135М NaCl – вода».

Як видно, в діапазоні швидкостей охолодження $\beta \leq 3$ кріопошкодження клітин відбувається тільки за рахунок ефектів розчину, а при швидкостях охолодження $\beta \geq 6$ – переважно за рахунок внутрішньоклітинної кристалізації (таблиця 3). Залежність сумарного внеску цих чинників у кріопошкодження клітин має порівняно широкий мінімум в діапазоні швидкостей охолодження 4°C/хв...8°C/хв.

Таблиця 3

Внесок внутрішньоклітинної кристалізації і ефектів розчину в сумарне кріопошкодження дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* в розчині «диметилсульфоксид (10 об'ємних %) – 0,135М NaCl – вода» на етапі кристалізації клітинної суспензії.

Швидкість охолодження клітинної суспензії, °C/хв	Кількість пошкоджених клітин, % від загальної кількості клітин		
	сумарна	за рахунок внутрішньоклітинної кристалізації	за рахунок ефектів розчину
0,5	67,4	0	67,4
2	16,6	0	16,6
3	11,3	0,3	11,0
4	9,6	1,4	8,2
5	11,1	4,6	6,5
6	12,4	7,0	5,4
7	14,8	10,2	4,6
8	19,6	15,6	4,0
10	32,1	29,0	3,1

Отже, оптимальною постійною швидкістю охолодження на етапі кристалізації при заморожуванні суспензії мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* під захистом 10% – го розчину диметилсульфоксиду є швидкість охолодження біля 4°C/хв. Ця теоретична оцінка узгоджується з існуючими в літературі і отриманими нами експериментальними даними.

Запропонований нами алгоритм теоретичної оцінки оптимального значення швидкості охолодження при лінійному режимі заморожування конкретної клітинної суспензії, очевидно, може бути використаний при розробці способів кріоконсервування будь – яких клітинних суспензій на підставі невеликої кількості указаних вище даних про геометричні і транспортні характеристики клітин, що заморожуються, та про діаграму плавлення кріозахисного розчину.

Проведений нами теоретичний аналіз процесу заморожування суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* на стадії її кристалізації показує, що поряд з оптимальним з погляду двохфакторної теорії кріопошкодження лінійним режимом охолодження існує не менш ефективний нелінійний режим охолодження, який також забезпечує високу збереженість клітин. Швидкість охолодження цього режиму становить

$$\beta = \frac{\beta_0 \tilde{c} \left(\frac{T}{T_{e0}} \right)^2}{\gamma L_p T \pi_0 c_{e0}^2},$$

де β_0 – швидкість охолодження суспензії у момент початку позаклітинної кристалізації.

Як видно, при цьому режимі охолодження, на відміну від лінійного режиму, швидкість охолодження є змінною. Зрозуміло, що по мірі зниження температури суспензії, що кристалізується, необхідно зменшувати швидкість охолодження таким чином, щоб при кожному значенні температури клітина перебувала впродовж проміжку часу, за який пересичення внутрішньоклітинного розчину встигає знизитися до близьких до нуля значень. Розрахована залежність такого нелінійного режиму охолодження представлена графічно на рис. 2. За діаграмою плавлення позаклітинного розчину, температура –31°C

Рис. 2. Розрахований оптимальний нелінійний режим охолодження суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* (крива, позначена світлими кружками) і близький до нього експериментально підібраний режим двохступінчастого заморожування (крива з чорними кружками).

на цій кривій відповідає більш ніж чотирьохкратному збільшенню концентрації диметилсульфоксиду у клітинній суспензії, що заморожується, порівняно з її початковим значенням. При такій концентрації швидке охолодження розчину кріопротектора, наприклад, шляхом безпосереднього занурення контейнера з біооб'єктом у скраплений азот, приводить до його склування. Отже, етап охолодження в діапазоні температур $-31^{\circ}\text{C} \rightarrow -196^{\circ}\text{C}$ не викликає додаткового, у порівнянні з попередніми етапами, пошкодження клітин.

Таким чином, поряд із оптимальним з погляду двохфакторної теорії кріопошкодження лінійним режимом охолодження існує оптимальний нелінійний режим охолодження, який наближено може бути реалізований шляхом занурення контейнера з клітинною суспензією, що заморожується, в попередньо охолоджений до певної температури рідинний термостат. Цей висновок підтверджується експериментами, при яких, занурюючи контейнер із суспензією дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у спиртовий кріостат, попередньо охолоджений до різних температур, на різні проміжки часу, ми добивались збігу термограми охолодження реального об'єкта з показаним на рис. 2 розрахованим теоретично оптимальним режимом охолодження. Найкращого узгодження між теоретично розрахованою і реальною термограмами охолодження досягнуто при зануренні біооб'єкту, що заморожується, в контейнері діаметром 10 мм у спиртовий

Рис. 3. Розподіл середньої швидкості охолодження на етапі кристалізації суспензії мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae*, суспендованих у розчині «диметилсульфоксид (10 об'ємних %) – 0,135M NaCl – вода», у циліндричному контейнері з діаметром 30 мм при швидкості охолодження холодоносія біля зовнішньої стінки контейнера: верхня крива – $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, нижня крива – $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, середня крива – $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

c/R – відношення відстані визначеної точки у зразку від осевої лінії контейнера до його радіуса.

кріостат, охолоджений до -35°C на 25 хвилин. При цьому режимі охолодження з наступним зануренням у скраплений азот колонієутворююча здатність заморожених – відігрітих мікроорганізмів досягала максимального, у порівнянні з іншими використаними режимами охолодження, значення – $82 \pm 8,5$ % від контролю, що свідчить на користь створеної нами кількісної моделі кріопошкодження клітин на етапі кристалізації клітинної суспензії. Експериментально підтверджуються також висунуті нами модельні уявлення про кріопошкодження клітин в процесі кристалізації клітинної суспензії і для лінійних (за датчиком у кріокамері заморозувача) режимів охолодження, якщо врахувати

неоднорідний розподіл швидкості охолодження у зразку, що заморожується (рис. 3), про що свідчать подані в таблиці 4 експериментальні дані.

Таблиця 4

Колонієутворююча здатність дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae*, суспендованих в розчині «диметилсульфоксид (10 об'ємних %) – 0,135М NaCl – вода», після заморожування зі швидкостями 1, 5, 10°C/хв і відігрівання у водяній ванні при температурі 30°C у циліндричних контейнерах з діаметром 30 мм, 20 мм і 10 мм.

Діаметр контейнера, мм	Швидкість охолодження, °C/хв	Колонієутворююча здатність, % від контролю
30	1	79,2 ± 8,5
	5	55,0 ± 10,1
	10	16,2 ± 9,5
20	1	71,8 ± 12,4
	5	93,4 ± 10,1
	10	35,1 ± 13,8
10	1	59,4 ± 11,5
	5	60,2 ± 14,7
	10	22,5 ± 8,7

Таким чином, цілком задовільне узгодження між отриманими нами експериментальними і розрахованими на підставі теоретичної моделі даними свідчить про адекватність висунутих нами модельних уявлень щодо імовірності кріопшкодження клітин при різних режимах охолодження, а також про доцільність застосування висунутих модельних уявлень при розробці способів низькотемпературного консервування інших клітин.

Отримані в роботі результати показують, що ефективність належним чином підбраного нелінійного режиму охолодження базується на таких самих уявленнях щодо механізмів кріопшкодження клітин, як і класична двохфакторна теорія.

Здійснення оптимальних нелінійних режимів охолодження порівняно з режимами, за яких охолодження відбувається зі сталою швидкістю, потребує значно меншої затрати часу і технічно реалізується простішими пристроями.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено теоретичне й експериментальне дослідження, що стало підставою для нового розв'язання наукової проблеми – підвищення ефективності методів кріоконсервації мікроорганізмів та спрощення процедури їх реалізації шляхом теоретичного моделювання процесів, які відбуваються при кристалізації клітинної суспензії.

1. Створена кількісна модель кріопошкодження дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* на етапі кристалізації при заморожуванні суспензії цих мікроорганізмів, яка, виходячи з невеликої кількості даних про транспортні та геометричні клітинні параметри і криву плавлення позаклітинного розчину, дозволяє оцінити ефективність різних режимів охолодження;

2. Експериментально визначені параметри дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae*, які потрібні для кількісного моделювання кріопошкодження клітин цих мікроорганізмів: поверхнево – об'ємне відношення – $1 \cdot 10^6 \text{ м}^{-1}$; об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин – 0,27; коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани в середовищі «диметилсульфоксид (10 об'ємних %) – 0,135M NaCl – вода» – $0,92 \pm 0,2 \cdot 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н} \cdot \text{с}$ за температури 25°C; енергія активації трансмембранного переносу молекул води – 24,5 кДж/моль; коефіцієнт проникності клітинної мембрани щодо молекул диметилсульфоксиду – $0,88 \pm 0,4 \times 10^{-8} \text{ м/с}$ за температури 25°C; енергія активації трансмембранного переносу молекул ДМСО – 37,7 кДж/моль.

3. Визначений вигляд оптимального з погляду двохфакторної теорії кріопошкодження нелінійного режиму охолодження дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae*, пояснений механізм кризахисної ефективності і способу реалізації відповідного швидкого двохступінчастого режиму заморожування.

4. Методом багатоточкової термографії показано, що розподіл швидкості охолодження в контейнерах із суспензією мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae*, що заморожуються є неоднорідним і значно впливає на їх колонієутворюючу здатність після заморожування – відтаювання.

5. Експериментально підтверджена адекватність висунутих модельних уявлень щодо кріопошкодження клітин на етапі кристалізації клітинної суспензії стосовно до заморожування суспензії мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* у розчині «диметилсульфоксид – хлорид натрію – вода».

6. Чашковим методом Коха визначена колонієутворююча здатність мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* після їх заморожування – відтаювання в 10% – вому розчині

диметилсульфоксиду з використанням швидких двохступінчастих режимів охолодження і визначені оптимальні для досліджуваного біооб'єкта умови заморожування.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ПРАЦЬ

1. Гордієнко Є. О. Удосконалена модель пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини / Є. О. Гордієнко, О. І. Гордієнко, В. В. Марущенко, О. В. Сакун // Біофізичний Вісник. – 2008. – Вип. 21, № 2. – С. 75–80.
2. Сакун О. В. Теоретична оцінка значення оптимальної з погляду двохфакторної теорії кріпошкодження швидкості охолодження при лінійних режимах заморожування клітинної суспензії / О. В. Сакун, О. І. Гордієнко // Біофізичний вісник. – 2009. – Вип. 22, № 2. – С. 63–68.
3. Сакун О. В. Коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і кріопротекторів / О. В. Сакун, І. Ф. Коваленко, А. Ю. Сіренко [та ін.] // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія – 2008. – Вип. 7, № 814. – С. 140–147.
4. Сакун О. В. Вплив температури на коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і кріопротекторів / О. В. Сакун, В. В. Марущенко, І. Ф. Коваленко, [та ін.] // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 1. – С. 41–48.
5. Коваленко И. Ф. Проницаемость мембран клеток СПЭВ для молекул воды и ДМСО / И. Ф. Коваленко, С. В. Коций, Е. В. Тимофеева [та ін.] // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 1. – С. 25–31.
6. Сакун О. В. Вплив розмірів контейнера на результат кріоконсервування суспензії *Saccharomyces cerevisiae* / О. В. Сакун, І. П. Висеканцев, А. Ю. Сіренко, Є. О. Гордієнко // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 2. – С. 221.
7. Сакун О. В. Вплив температури на коефіцієнти проникності мембран дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* для води та кріопротекторів / О. В. Сакун, І. Ф. Коваленко, А. Ю. Сіренко [та ін.] // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 2. – С. 223.
8. Гордієнко О. І. Механізми проникності клітинних мембран для води і кріопротекторів / О. І. Гордієнко, О. В. Давидова, О. В. Сакун // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 2. – С. 170.
9. Гордиенко О. И. Коэффициенты проницаемости мембран *Saccharomyces cerevisiae* для криопротекторов / О. И. Гордиенко, И. Ф. Коваленко, А. В. Сакун [и др.] // Дисперсные системы: научная конференция стран СНГ, 22–26 сент. 2008 г.: тезисы

докл. – Одесса, – 2008. – С. 96–97.

10. Гордиенко Е. А. Количественная модель массообмена между клетками и окружающим их многокомпонентным раствором / Е. А. Гордиенко, А. В. Сакун, В. В. Марущенко [и др.] // Дисперсные системы: научная конференция стран СНГ, 22–26 сент. 2008 г.: тезисы докл. – Одесса, – 2008. – С. 98–99.

11. Сакун О. В., Коефіцієнти проникності мембран дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* для води та криопротекторів / О. В. Сакун, І. Ф. Коваленко, А. Ю. Сіренко // Біофізичні механізми функціонування живих систем: наукова конференція, 16–18 жовтня 2008 р.: тези допов. – Львів, – С. 64–65.

12. Сакун А. В. Влияние температуры на проницаемость мембран клеток *Saccharomyces cerevisiae* для воды и криопротекторов / А. В. Сакун, И. Ф. Коваленко, Е. В. Давыдова, О. И. Гордиенко // Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия: международная научная конференция, 28–30 октября 2008 г.: тезисы докл. – Пущино, – Биофизика живой клетки. – 2008. – Т. 9. – С. 113–114.

13. Сакун А. В. Влияние разброса скоростей охлаждения в цилиндрическом контейнере на выживаемость клеток при быстром двухступенчатом замораживании / А. В. Сакун, А. Ю. Сиренко, Е. А. Гордиенко // Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия: международная научная конференция, 28–30 октября 2008 г. – Пущино, – Биофизика живой клетки. – 2008. – Т. 9. – С. 115–116.

14. Давыдова Е. В. Влияние температуры на проницаемость мембран клеток для криопротекторов / Е. В. Давыдова, А. В. Сакун // Холод в біології і медицині: щорічна наукова конференція молодих учених, 28–29 травня 2009 р.: тези допов. – Х., – 2009. – С. 12.

АНОТАЦІЯ

Сакун О.В. Аналіз ефективності криоконсервування клітинних суспензій з постійною та змінною швидкістю охолодження – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, 2009.

Дисертаційна робота присвячена побудові та експериментальному підтвердженню кількісної моделі кріопошкодження суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у розчині „диметилсульфоксид (10 об.%) – 0,135М хлориду натрію – вода” при лінійних та нелінійних режимах охолодження на етапі її кристалізації.

Методами вольюмометрії, світлової мікроскопії і термодинаміки необоротних процесів визначені величина осмотично неактивного об'єму дріжджових клітин, значення коефіцієнтів проникності для води та кріопротекторів крізь плазматичну мембрану *Saccharomyces cerevisiae* та енергії активації процесів їх проникання. Показано, що 1,2 – пропандіол впливає на плазматичну мембрану *Saccharomyces cerevisiae*, знижуючи енергію активації проникання молекул води крізь неї.

Сформульована кількісна модель кріпошкодження клітин на етапі кристалізації, яка створює можливість визначити оптимальні умови їх охолодження, спираючись на невелику кількість даних про транспортні та геометричні параметри цих клітин. У побудованій моделі враховано внесок у кріпошкодження двох основних чинників, які протилежно залежать від швидкості охолодження – ефектів розчину та внутрішньоклітинної кристалізації. На підставі створеної моделі визначені оптимальні з погляду двохфакторної теорії кріпошкодження лінійний і нелінійний режими охолодження суспензії мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae*. Доведено, що механізм кріозахисної дії швидкого двохступінчастого охолодження принципово не відрізняється від оптимального з погляду двохфакторної теорії кріпошкодження режиму охолодження зі сталою швидкістю. Визначено зв'язок між швидкістю охолодження на етапі кристалізації і колонієутворюючою здатністю дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* після заморожування – відтаювання суспензії цих клітин у розчині „диметилсульфоксид (10 об.%) – 0,135М хлориду натрію – вода” при лінійних режимах охолодження.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, геометричні та транспортні характеристики клітин, двохфакторна теорія кріпошкодження, лінійні та нелінійні режими охолодження, колонієутворююча здатність.

АННОТАЦІЯ

Сакун А.В. Анализ эффективности криоконсервирования клеточных суспензий с постоянной и переменной скоростью охлаждения – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, 2009.

Диссертационная работа посвящена созданию и экспериментальному подтверждению количественной модели криповреждения суспензии дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae* в растворе „диметилсульфоксид (10 об.%) – 0,135М хлорида

натрия – вода” при линейных и нелинейных режимах охлаждения на этапе ее кристаллизации.

На основании усовершенствованной модели массопереноса через плазматическую мембрану клеток методами вольюмометрии, световой микроскопии определены величина осмотически неактивного объема дрожжевых клеток, значения коэффициентов проницаемости для воды и криопротекторов через плазматические мембраны *Saccharomyces cerevisiae* и энергии активации процессов их проникновения. Усовершенствованная модель трансмембранного переноса веществ является аналогом известных уравнений Кедем–Качальского, но имеет более широкую область применимости и не содержит так называемой среднелогарифмической концентрации, которая не имеет ясного толкования и затрудняет интерпретацию полученных результатов. Показано, что 1,2–пропандиол влияет на плазматическую мембрану *Saccharomyces cerevisiae*, понижая энергию активации трансмембранного переноса молекул воды.

Сформулирована количественная модель криповреждения клеток на этапе кристаллизации, которая дает возможность определить оптимальные условия их охлаждения, опираясь на небольшое количество данных о транспортных и геометрических параметрах этих клеток. В построенной модели учтен вклад в криповреждение двух основных факторов, которые противоположно зависят от скорости охлаждения – эффектов раствора и внутриклеточной кристаллизации. Поскольку в рамках двухфакторной теории криповреждения образование внутриклеточного кристалла льда неизбежно приводит к ее гибели, вероятность образования внутриклеточного кристалла льда в пересыщенном внутриклеточном растворе за время кристаллизации внеклеточного раствора отождествлена с вероятностью гибели клетки за счет внутриклеточной кристаллизации. Вероятность повреждения клеток, обусловленная эффектами раствора, представлена в виде, учитывающем, что повреждение клеток усиливается с увеличением концентрации раствора, который контактирует с клеточными структурами, и временем экспозиции клеток в нем. Учитывая большую плотность клеток в замораживаемой суспензии, совокупность клеток рассматривали как статистический ансамбль и суммарную вероятность повреждения клеток за счет обоих факторов отождествляли с долей клеток, которые повреждаются на этапе кристаллизации клеточной суспензии. На основании созданной модели определены оптимальные с точки зрения двухфакторной теории криповреждения линейный и нелинейный режимы охлаждения суспензии микроорганизмов *Saccharomyces cerevisiae*. Доказано, что механизм криозащитного действия быстрого двухступенчатого охлаждения принципиально не отличается от

оптимального с точки зрения двухфакторной теории криповреждения режима охлаждения с постоянной скоростью. Определена связь между скоростью охлаждения на этапе кристаллизации и колониеобразующей способностью дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* после замораживания – оттаивания суспензии этих клеток в растворе „диметилсульфоксид (10 об.%) – 0,135М хлорида натрия – вода” при линейных режимах охлаждения;

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, геометрические и транспортные характеристики клеток, двухфакторная теория криповреждения, линейные и нелинейные режимы охлаждения, колониеобразующая способность.

ANNOTATION

Sakun O.V. Analysis of efficiency of cell suspension cryopreservation with constant and variable cooling rates – A manuscript.

Dissertation for the candidate of biological sciences degree in specialty 03.00.19 – cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, 2009.

The thesis deals with developing and experimental approval of the quantitative model of cryodamage of *Saccharomyces cerevisiae* yeast – like fungi suspension in the solution «dimethyl sulfoxide (10% v/v) – 0.135 M sodium chloride – water» under linear and non – linear cooling regimens at its crystallisation stage.

By means of volumetry, light microscopy and thermodynamics of non – reversible processes the values of osmotically inactive volume of yeast cells, permeability coefficients for water and cryoprotectants through *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane as well as activation energy of its permeation were found. 1,2 – propane diol was shown to affect the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membranes with decreasing the activation energy of water molecules permeation through them.

A quantitative model of cryodamage of cells at the crystallization stage is specified; this model allows to establish the optimal conditions of cell suspension cooling, basing on non – numerous data on transport and geometrical parameters of the cells. In the developed model a contribution of inversely depending on cooling rate two main agents into cryodamage is considered: solution effects and intracellular crystallization. Basing on the developed model the linear and non – linear regimens of *Saccharomyces cerevisiae* suspension cooling being optimal from the point of view of two – factor theory of cryodamage are found. Cryoprotective action of rapid two – step cooling was shown to have no principal differences from cooling regimen with

constant rate being optimal from the point of view of two factor theory of cryodamage. A relation between cooling rate on the stage of crystallization and colony forming ability of *Saccharomyces cerevisiae* yeast – like cells was found after freeze – thawing of the cell suspension in the solution “dimethyl sulfoxide (10% v/v) – 0.135 M sodium chloride – water” under linear cooling regimens.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, geometrical and transport characteristics of cells, two factor theory of cryodamage, linear and non – linear cooling regimens, colony – forming ability.

Відповідальний за випуск доктор біологічних наук, професор Бабійчук Г.О.

Підписано до друку 14.10.09. Формат 60x90/16

Обсяг 0,8 ум.-друк. арк. Папір офсетний. Друк різнограф.

Наклад 100 прим. Зам. № 236/6

Надруковано ЗАТ «Харківський центр
науково-технічної та економічної інформації»
м. Харків, 61010, проспект Гагаріна, 4.