

УДК 57.043

ВЛИЯНИЕ РАЗБРОСА СКОРОСТЕЙ ОХЛАЖДЕНИЯ В ЗАМОРАЖИВАЕМОМ ОБРАЗЦЕ НА КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© 2009 г. В. В. Марущенко, Е. А. Гордиенко

Институт проблем криобиологии и криомедицины

Национальной академии наук Украины

(Харьков, Украина)

Изучено влияние режима охлаждения и размера образца на разброс скоростей охлаждения в нем и колониеобразующую способность замороженных-оттаянных дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae*. Методом термографии установлено, что клетки, находящиеся в разных точках замораживаемого образца, охлаждаются с существенно различающимися скоростями. Неоднородность температурного поля и разброс скоростей охлаждения в образце растут с увеличением размера образца и скорости охлаждения контактирующего с ним хладагента. С увеличением разброса скорости охлаждения в замораживаемом образце сохранность деконсервированных клеток падает, поскольку при этом часть клеток замораживается со скоростью, которая отличается от оптимального значения. Колониеобразующая способность суспензии *S. cerevisiae*, рассчитанная по полученным в работе зависимостям, удовлетворительно согласуются с экспериментальными результатами.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, скорость охлаждения, размер образца, колониеобразующая способность

Согласно двухфакторной теории, сохранность клеточных суспензий при их низкотемпературном консервировании куполообразно зависит от скорости охлаждения на этапе кристаллизации (Gao, Critser, 2000; Mazur, 1984; Mazur et al., 2007). При этом максимальную сохранность обеспечивает только вполне определенная для данного типа клеток скорость охлаждения. Отклонение от нее в сторону возрастающих (по абсолютной величине) значений приводит к губительной для клеток внутриклеточной кристаллизации. При отклонении скорости охлаждения в сторону скоростей меньших, чем оптимальная, увеличивается время действия на клетки неблагоприятных факторов, которые возникают вследствие кристаллизации клеточной суспензии (гипертония, повышенная ионная сила, сдвиг pH и т.д.). Клетки при этом также повреждаются. Реально в течение замораживания клеточной суспензии в контейнере,

который имеет конечный размер, поле скоростей охлаждения является неоднородным, вследствие чего разные клетки охлаждаются с разными скоростями, неодинаково повреждаясь в зависимости от их положения в контейнере, в котором замораживается клеточная суспензия. Влияние этого фактора на эффективность криоконсервирования биологических объектов отмечается только в отдельных работах (Бабенко и др., 2005; Грищенко, Дунаевская, 2002; Hayes et al., 1988), а целенаправленное исследование этой проблемы применительно к задачам криобиологии до сих пор не проводилось.

Без учета влияния указанного эффекта на результат низкотемпературного консервирования прикладные задачи часто решаются недостаточно эффективно. Например, возникает вопрос, можно ли по сохранности клеток в небольших контейнерах – сателлитах – судить об уровне их сохранности в основном контейнере, где, как правило, содержится значительно больший объем замороженного биоматериала. Таким образом, изучение влияния разброса режимных параметров криоконсервирования в контейнере с клеточной суспензией на эффек-

Адрес для корреспонденции: Гордиенко Евгений Александрович, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская 23, Харьков, 61015, Украина;
e-mail: gordienko@gala.net

ВЛИЯНИЕ РАЗБРОСА СКОРОСТЕЙ ОХЛАЖДЕНИЯ

тивность этой процедуры является актуальным направлением криобиологии, способствующим повышению эффективности разрабатываемых способов низкотемпературного консервирования биообъектов.

Целью данной работы явилось изучение влияния режима охлаждения и размера замораживаемого образца на разброс скоростей охлаждения в нем и колониобразующую способность декриоконсервированных дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae*.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовались хлебопекарские дрожжеподобные грибы *Saccharomyces cerevisiae* (раса 608, СП ПО РНИИХП, Санкт-Петербург). Дрожжеподобные грибы выращивали на скошенном сусле – агаре при 30°C в течение 48 часов. Затем клетки дважды смывали физиологическим раствором, осаждали центрифугированием (300 об/мин в течение 15 мин) и осадок ресуспендировали в 0,15 М водном растворе хлорида натрия. Осуществляя серию разведений, доводили плотность клеток в суспензии до значения порядка 10^6 кл/мл, оптимального для определения их колониобразующей способности. Контроль высевали на твердую питательную среду Сабуро (по 6 чашек Петри на каждое разведение). Чашки Петри с контрольными образцами термостатировали при 30°C в течение 48 ч, а затем определяли жизнеспособность клеток в контрольных образцах «чашечным методом» Коха (Лабинская, 1978) по количеству образовавшихся макроколоний. Параллельно суспензию *S. cerevisiae* из разведения, аналогичного контролю, замораживали в криокамере программного охлаждающего устройства УОП-06, разработанного и изготовленного в СКТБиОП ИПКиК НАН Украины в контейнерах цилиндрической формы из термостойкого пластика с диаметрами 10, 20 или 30 мм. Для замораживания микроорганизмов в контейнерах каждого размера использовали три программы замораживания, при которых скорость охлаждения по датчику температуры на внешней поверхности контейнера (4 на рис. 1) составляла 1, 5 или 10°C/мин. Датчиками, измеряющими температуру внутри замораживаемого образца, служили предварительно откалиброванные медь – константановые термопары, рабочие спаи которых располагались в замораживаемом образце так, как показано на рис. 1. Рабочий спай первой термопары располагался на внутренней стенке контейнера, а спай третьей термопары –

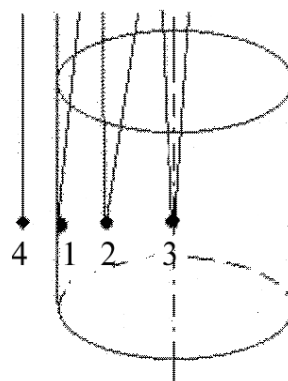


Рис. 1. Схема размещения датчиков температуры при замораживании суспензии дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae* в физиологическом растворе.

на оси контейнера. Рабочий спай второй термопары находился на расстоянии полурадиуса от оси контейнера.

Информацию о температурном поле в замораживаемом образце получали, регистрируя термограммы в одном (контрольном) из четырех контейнеров самопишущим потенциометром. Остальные три контейнера после замораживания и извлечения из укладки помещались в сосуд Дьюара с жидким азотом, где хранились в течение трех суток до отогрева.

Оттаивание замороженных образцов проводили на водяной бане при 30°C. Содержимое контейнеров с одинаковыми условиями замораживания объединяли, высевали на чашки с твердой агаризованой средой Сабуро и затем, как и в контроле, определяли жизнеспособность клеток в размороженных образцах чашечным методом. Каждый эксперимент повторялся не менее трех раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 и 3 показано как изменяется средняя скорость охлаждения $\bar{\beta}$ на этапе кристаллизации криоконсервируемой суспензии дрожжеподобных грибов *S. cerevisiae* в физиологическом растворе в зависимости от расстояния ρ между клеткой и осью цилиндрического контейнера (R – радиус контейнера) при различных условиях замораживания. Как видно, скорость охлаждения клеток на этапе кристаллизации суспензии увеличивается в несколько раз по мере удаления от стенки контейнера вглубь замораживаемого образца. Этот эффект

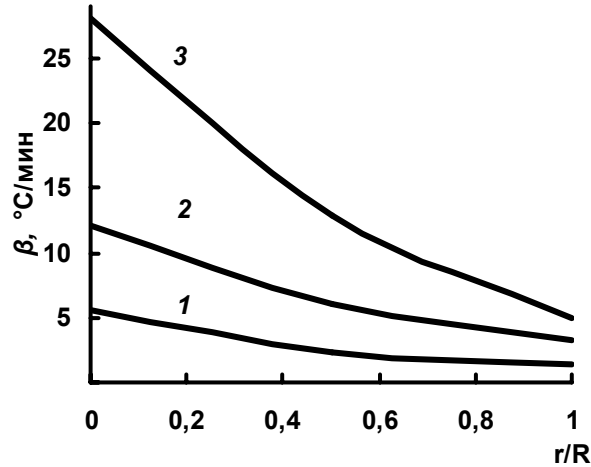


Рис. 2. Зависимость усредненной скорости охлаждения на этапе кристаллизации от расположения клетки в замораживаемом контейнере с диаметром 10 мм при разных скоростях изменения температуры в окружающем контейнер хладагенте.

1) $R=10$ мм, $\beta=1^\circ\text{C}/\text{мин}$; 2) $R=10$ мм, $\beta=5^\circ\text{C}/\text{мин}$; 3) $R=10$ мм, $\beta=10^\circ\text{C}/\text{мин}$.

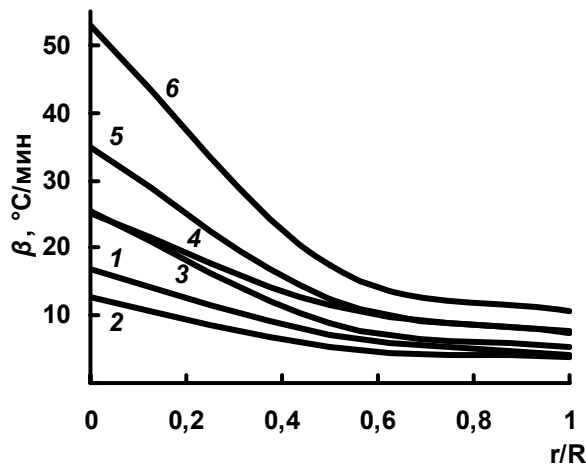


Рис. 3. Зависимость усредненной скорости охлаждения на этапе кристаллизации в зависимости от расположения клетки в замораживаемом образце при разных размерах контейнера и скоростях изменения температуры в окружающем контейнер хладагенте.

1) $R=30$ мм, $\beta=1^\circ\text{C}/\text{мин}$; 2) $R=20$ мм, $\beta=1^\circ\text{C}/\text{мин}$; 3) $R=30$ мм, $\beta=5^\circ\text{C}/\text{мин}$; 4) $R=20$ мм, $\beta=5^\circ\text{C}/\text{мин}$; 5) $R=30$ мм, $\beta=10^\circ\text{C}/\text{мин}$; 6) $R=20$ мм, $\beta=10^\circ\text{C}/\text{мин}$.

объясняется тем, что на этапе кристаллизации клеточной суспензии клетки, расположенные ближе к стенке контейнера, охлаждаются под действием более низкого перепада температуры между местом расположения клетки и внешней стенкой контейнера, чем клетки, расположенные ближе к оси цилиндрического контейнера.

Для того, чтобы провести анализ влияния разброса скоростей охлаждения в замораживаемом образце на жизнеспособность криоконсервируемых клеток, допустим, что вследствие разброса клеточных параметров в популяции микроорганизмов жизнеспособность отдельных

клеток S зависит от локальной скорости охлаждения $\bar{\beta}$ в месте их расположения следующим образом:

$$S(\bar{\beta}) = \text{const} \times y^n \exp\left(\frac{y}{m}\right) \quad (1),$$

где $S(\bar{\beta})$ – вероятность того, что дрожжеподобный гриб *S. cerevisiae*, охлажденный со средней скоростью $\bar{\beta}$ на этапе кристаллизации, после размораживания – оттаивания и помещения в питательную среду образует макро-

ВЛИЯНИЕ РАЗБРОСА СКОРОСТЕЙ ОХЛАЖДЕНИЯ

колонию дочерних клеток; $const$ – подгоночный параметр, который наряду с постоянными n и m определен нами из условия наилучшего согласия с экспериментальными данными, полученными при девяти режимах замораживания и приведенными ниже в таблице; y – отрицательное число, равное средней скорости изменения температуры суспензии на этапе кристаллизации, выраженной в единицах $\frac{K}{мин}$ или $^{\circ}C/мин$;

n – константа, характеризующая устойчивость замораживаемых микроорганизмов к контакту с гипертонической средой; m – константа, характеризующая резистентность популяции микроорганизмов к внутриклеточной кристаллизации (Mazur, 1984).

График зависимости (1) при $n=4$, $m=1$ приведен на рис. 4.

Поскольку клетки в суспензии распределены однородно с плотностью ρ , то общее количество клеток в суспензии, очевидно, равно $\rho\pi R^2 L$, где R – радиус цилиндрического контейнера и L – высота контейнера. Доля клеток, которая на этапе кристаллизации образца охлаждается со скоростями охлаждения в диапазоне $\bar{\beta} \dots \bar{\beta} + d\bar{\beta}$, равна $2\frac{\rho}{R}d\frac{\rho}{R}$, где $\frac{\rho}{R}$ как

функция скорости охлаждения $\bar{\beta}$ определяется зависимостями, представленными на рис. 4. Аппроксимируя эти зависимости функциями

вида $\bar{\beta} = A + B\frac{\rho}{R} + C\left(\frac{\rho}{R}\right)^2$ или

$$\frac{\rho}{R} = \frac{-\frac{B}{C} \pm \sqrt{\left(\frac{B}{C}\right)^2 - 4\left(\frac{A-\bar{\beta}}{C}\right)}}{2},$$

получаем

$$2\frac{\rho}{R}d\frac{\rho}{R} = \frac{-\frac{B}{C} \pm \sqrt{\left(\frac{B}{C}\right)^2 - 4\left(\frac{A-\bar{\beta}}{C}\right)}}{\sqrt{B^2 - 4C(A-\bar{\beta})}}$$

С учетом последнего равенства жизнеспособность замораживаемого образца в целом с учетом разброса скоростей охлаждения вдоль радиуса контейнера определяется равенством:

$$\bar{S} = -2 \int S(\bar{\beta}) \frac{[B + \sqrt{B^2 - 4C(A-\bar{\beta})}]}{C\sqrt{B^2 - 4C(A-\bar{\beta})}} d\bar{\beta} \quad (2),$$

где $S(\bar{\beta})$ определяется выражением (1).

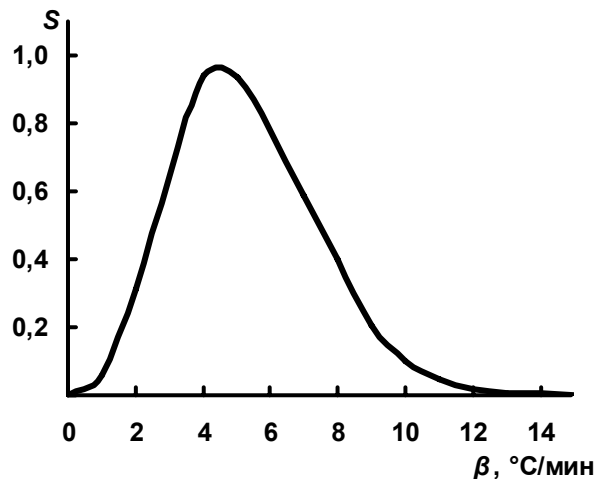


Рис. 4. Зависимость жизнеспособности отдельных клеток от локальной скорости охлаждения \dot{T} в месте их расположения

Расчетные (Р) и экспериментально определенные (Э) значения колониобразующей способности микроорганизмов *Saccharomyces cerevisiae* (в процентах от контроля) после замораживания с различными скоростями до -196°C и последующего оттаивания на водяной бане при $+30^{\circ}\text{C}$

Скорость охлаждения, $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	Диаметр цилиндрического контейнера, мм					
	30		20		10	
	Р	Э	Р	Э	Р	Э
1	24,4	25,3 \pm 4,7	26,0	29,8 \pm 5,4	35,7	39,0 \pm 6,1
5	48,3	49,7 \pm 6,9	42,0	34,5 \pm 7,5	74,6	72,7 \pm 6,5
10	33,8	34,3 \pm 5,2	31,6	29,7 \pm 4,2	36,5	36,7 \pm 5,7

Полагая, что зависимость колониобразующей способности деконсервированных микроорганизмов от скорости охлаждения $S = S(\bar{\beta})$ определяется формулой (1), с помощью (2) можно вычислить этот показатель жизнеспособности для всего образца в целом. Значения колониобразующей способности суспензии *S. cerevisiae*, рассчитанные по (2) при выбранных из условия наилучшего согласия с экспериментальными данными значениях констант $const=0,0225$, $n=4$, $m=1$, и экспериментально определенными значениями колониобразующей способности этих микроорганизмов после замораживания-оттаивания при девяти режимах охлаждения приведены в таблице.

Как видно из представленных данных, расчетные и экспериментально определенные значения колониобразующей способности микроорганизмов *S. cerevisiae* вполне удовлетворительно согласуются друг с другом. Это свидетельствует о том, что решающее влияние на сохранность криоконсервируемых клеток оказывает режим охлаждения на этапе кристаллизации клеточной суспензии. Значение оптимальной скорости охлаждения суспензии дрожжеподобных грибов *S. cerevisiae* составляет $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (таблица), что согласуется с результатами других исследователей (Сидякина, 1988; Gervais, de Maranon, 1995).

На основании результатов проведенного исследования можно утверждать, что клетки, расположенные в разных точках замораживаемого образца, охлаждаются с существенно различающимися скоростями. Неоднородность температурного поля и разброс скоростей охлаждения в образце растут с увеличением размера образца и скорости охлаждения контакти-

рующего с ним хладагента. С увеличением разброса скорости охлаждения в замораживаемом образце сохранность замороженных-оттаянных клеток падает, поскольку при этом большая часть клеток замораживается со скоростью, которая отличается от оптимального значения.

ЛИТЕРАТУРА

- Бабенко В.И., Грищенко В.И., Дунаевская А.В. О высоких скоростях замораживания и охлаждения биологических объектов в цилиндрических контейнерах при их погружении в жидкий азот // Проблемы криобиологии. – 2005. – № 2. – С. 129-136.
- Грищенко В.И., Дунаевская А.В. К определению скорости охлаждения биологических объектов в цилиндрических контейнерах // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 1. – С. 7-13.
- Лабинская В.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.
- Сидякина Т.М. Методы консервации микроорганизмов. – Пущино: ОНТИ НЦБИ СССР. 1988. – Серия Консервация генетических ресурсов. – 58 с.
- Gao D., Critser J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells // ILAR J. – 2000. – V. 41, № 4. – P. 187-196.
- Gervais P., de Maranon M. Effect of the kinetics of temperature variation on *Saccharomyces cerevisiae* viability and permeability // Biophys. Biochem. Acta. – 1995. – V. 1235. – P. 52-56.
- Hayes L.J., Diller K.R., Chang H.J. Prediction of local cooling rates and cell survival during the freezing of cylindrical specimen // Cryobiology. – 1988. – V. 25. – P. 67-82.

ВЛИЯНИЕ РАЗБРОСА СКОРОСТЕЙ ОХЛАЖДЕНИЯ

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // Am. J. Physiol. – 1984. – V. 247, № 3. – P. 125-142.

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.

Поступила в редакцию
29.04.2009 г.

EFFECT OF COOLING RATE DISPERSION IN SPECIMEN UNDERGOING FREEZING ON COLONY FORMING ACTIVITY OF SACHAROMYCES CEREVISIAE

V. V. Maruschenko, E. O. Gordiyenko

*Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kharkiv, Ukraine)*

The paper discusses the effect of cooling regimen and specimen dimensions on the dispersion of cooling rates inside the specimen as well as the colony forming activity of frozen-thawed yeast like *Sacharomyces cerevisiae* fungi. It was found by means of thermography that cells of diverse spots of the specimen undergoing freezing were being chilled with considerably different rates. Non-uniformity of temperature fields as well as cooling rate dispersion rise along with increase in both specimen dimensions and cooling rate of the surrounding medium. Increase in dispersion of cooling rate in specimen undergoing freezing leads to fall in integrity of frozen-thawed cells, because in this case the part of cells is being cooled with the non-optimal rate. The values of colony forming activity of *S. cerevisiae* cells calculated from the established dependencies are in fair concordance with the experimentally found ones.

Key words: *Sacharomyces cerevisiae*, cooling rate, specimen size, colony forming activity

ВПЛИВ РОЗМАХУ ШВИДКОСТЕЙ ОХОЛОДЖЕННЯ У ЗАМОРОЖУВАНОМУ ЗРАЗКУ НА КОЛОНІЄУТВОРЮЮЧУ ЗДАТНІСТЬ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

В. В. Марущенко, Є. О. Гордієнко

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національної академії наук України
(Харків, Україна)*

Досліджено вплив режиму охолодження і розміру зразка на розмах швидкостей охолодження в ньому та колонієутворюючу здатність заморожених-відтаяних дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae*. Методом термографії встановлено, що клітини, розміщені в різних точках заморожуваного зразка охолоджуються із суттєво відмінними швидкостями. Неоднорідність температурного поля і розмах швидкостей охолодження у зразку зростають зі збільшенням розміру зразка та швидкості охолодження холодоагента, що контактує з ним. Із збільшенням розмаху швидкостей охолодження у зразку, що заморожується, збереженість деконсервованих клітин знижується, оскільки при цьому частина клітин заморожується зі швидкістю, яка відрізняється від оптимального значення. Колонієутворююча здатність суспензії *S. cerevisiae*, розрахована за отриманими в роботі залежностями, задовільно узгоджується з експериментальними результатами.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, швидкість охолодження, розмір зразка, колонієутворююча здатність