

УДК 57.084.1: 616-71: 636.09-614.3

**Я. П. ЛИСА**, аспірант,

**В. С. ТИНДИК**

**А. М. ГОЛОВКО**, доктор ветеринарних наук, академік НААН

**В. О. УШКАЛОВ**, доктор ветеринарних наук, лен-корр. НААН,

**О. І. ГОРДІЄНКО**

*Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м.Київ*

## **ВИЗНАЧЕННЯ ОСНОВНИХ ПАРАМЕТРІВ ПРОЦЕСУ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ ЕРИТРОЦИТІВ**

*Проаналізовано процес ліофілізації еритроцитів, визначено основні параметри, які впливають на якість ліофільно висушених біологічних об'єктів. Проведено аналіз методів контролю етапів ліофілізації. Результати будуть використані для моделювання процесу ліофілізації еритроцитів та його оптимізації.*

*Ключові слова: ліофілізація, сублімація, попереднє заморожування, первинна сушка, вторинна сушка, мікроорганізми.*

Кров в цілісному вигляді при позитивних температурах (+2...+6°C) може зберігатись протягом обмеженого періоду часу. Розроблений ряд методів для зберігання крові. Один із методів є додавання в розчин крові стабілізуючих речовин, таких як розчин глюцициру, метаболітів вуглеводно-фосфорного обміну, що продовжує збереження повноцінних еритроцитів до 30-35 днів. Проте даний метод не задовольняє потреби трансфузіології, зважаючи на недовготривалий період зберігання. При цьому в міру збільшення терміну зберігання погіршуються морфо-функціональні властивості еритроцитів. Тому був розроблений метод зберігання еритроцитів при ультранизких температурах, що дозволяє зберігати клітини крові в біологічно повноцінному стані протягом багатьох років. Для запобігання загибелі або пошкодження клітин при заморожуванні до них у певних співвідношеннях додаються спеціальні хімічні агенти, так звані кріопротектори, або кріофілактики, а сам метод отримав назву кріоконсервування. Проте для забезпечення нормальних умов зберігання кріоконсервованих еритроцитів необхідні великі площі на регульований температурний режим. Саме тому існує метод ліофілізації еритроцитів. Проте, він потребує оптимізації, що і є метою розробки.

У XIX столітті почали велику увагу приділяти дослідженню мікроорганізмів та інших біологічних об'єктів, проте тривалість зберігання одного біологічного об'єкту була досить короткою, що робило неможливим його детальне вивчення. Розпочались дослідження стосовно довготривалого зберігання біологічного матеріалу. Були спроби зробити повітряну сушку, проте вони були невдалими – зразок втрачав або свої властивості, або ознаки життєдіяльності.

Вважалося, що екстримально низькі температури негативно впливають на процеси життєдіяльності досліджуваного зразка, проте пізніше виявилось, що більше впливають не низькі температури, а процеси рекристалізації.

1890 року німецький гістолог Альтман першим здійснив висушування тканин при низьких температурах та пониженому тиску. 1905 р. Бенедикт і Менінг заявили, що можуть висушити біологічні об'єкти при низьких температурах за допомогою хімічного насосу на основі етилового ефіру. Необхідність етилового ефіру в камері для витіснення повітря було замінено Шакелем шляхом використання механічних вакуумних насосів. Цікавим є той факт, що ліофільна сушка Шакеля має ті ж самі основні компоненти, що і ліофільні сушки сучасних світових виробників: сушильну камеру, конденсаторну камеру та вакуумну систему [8].

Ліофілізація – це стабілізуючий процес, при якому речовину спочатку заморожують, а потім кількість води поступово знижується за рахунок сублімації (первинна сушка), а потім за рахунок десорбції (вторинна сушка) до значення, коли біологічний об'єкт не буде підтримувати біологічний ріст та хімічні реакції [7].

Фізичні основи процесу можна проілюструвати за допомогою діаграми рівноваги фаз для води, яка є системою з одним компонентом  $H_2O$ , тому найбільше число фаз, які одночасно можуть перебувати у рівновазі, дорівнює трьом. Ці три фази - рідина, лід і пара. Число ступенів свободи в даній точці дорівнює нулю, тобто не можна змінити ні тиск, ні температуру, щоб не зникла жодна з фаз. Звичайний лід, вода і водяна пара можуть існувати в рівновазі одночасно тільки при тиску 0,61 кПа і температурі 0,0075°C (рис. 1). Точка співіснування трьох фаз називається потрійною точкою, або точкою рівноваги. Якщо підводити тепло до замороженого матеріалу при тиску нижче тиску потрійної точки води, буде мати місце процес сублімації [1].

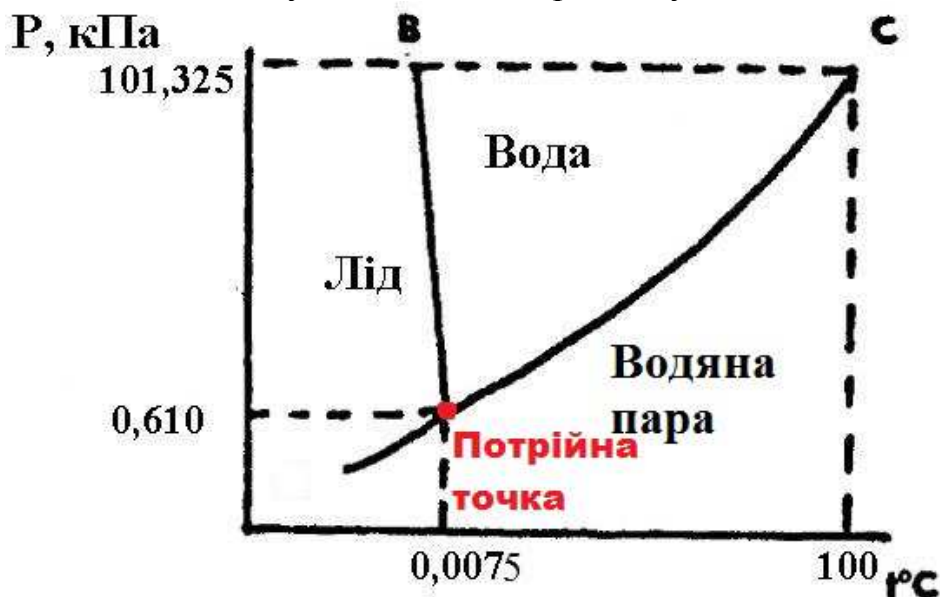


Рис. 1. Діаграма рівноваги фаз

Ліофілізація застосовується при необхідності тривалого зберігання та консервування різних продуктів біологічного походження, для одержання сухої

плазми донорської крові, сухих сироваток і вакцин, у фармацевтичній і харчовій промисловості. У ряді випадків, наприклад, при виробництві сухих легкокорозивних антибіотиків, бактерійних і вірусних препаратів, заквасок і ферментів, БАДів і т.п., сублімаційна сушка поки не має альтернативи.

Однак даний процес не є досконалим та потребує оптимізації для кожного біологічного об'єкту. Саме тому **метою** роботи є вдосконалення методики процесу ліофілізації еритроцитів в умовах сектору ліофільної сушки ДНКІБШМ на основі аналізу основних параметрів, які впливають на результат процесу.

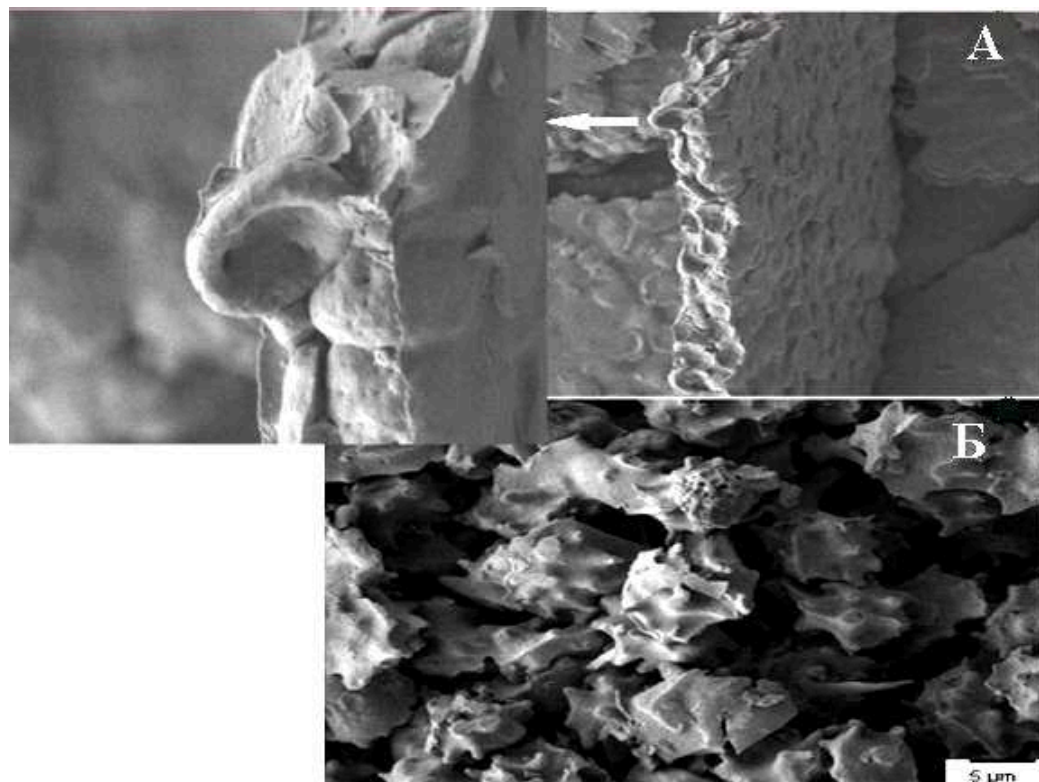
**Матеріали і методи.** В умовах лабораторії ДНКІБШМ проводили ліофільну сушку біологічних об'єктів за допомогою приладу LyoQuest-50 (Telstar). На основі порівняльної характеристики основних параметрів, які впливають на якість вихідного зразка, здійснено аналіз шляхів оптимізації процесу. Технічні характеристики приладу дають можливість слідкувати за стадіями ліофілізації за допомогою графіка, що дозволяє здійснювати оптимізацію процесу.

**Результати дослідження.** Питання забезпечення потреб трансфузіології залишається актуальним як в медицині, так і в ветеринарії. Кріоконсервація – дорогий метод, який потребує затрат енергії на зберігання та окремого місця. Натомість ліофільно висушені еритроцити не потребують спеціальних умов для довготривалого зберігання. Їх маса зменшується вдвічі, що полегшує не тільки зберігання, а й транспортування. Вони легко розчинні. Проте, ліофілізація – це дуже складний, трудомісткий процес, який потребує контролю на кожній стадії.

Кожен етап повинен контролюватись, до того ж необхідно враховувати усі параметри, які впливають на процес ліофілізації та подальший процент біологічних об'єктів, що вижили.

Заморожування є основою для подальшого висушування біологічних об'єктів, оскільки дуже важливим є формування кристалів. По завершенню етапу заморожування основна частина вологи в матеріалі переходить в лід, але при цьому частина зв'язаної води - зазвичай на рівні кількох відсотків, залишається в переохолодженому рідкому стані. На етапі заморожування відбувається фіксація найважливіших властивостей продукту, а подальша сублімація льоду створює пористу структуру. У підсумку якість ліофілізованих продуктів дуже висока, вони легко регідратують перед подальшим застосуванням [10]. Проте необхідно враховувати індивідуально для кожного біологічного зразка швидкість та температуру та тривалість заморожування, наявність та склад поживних середовищ [12] для підвищення якості вихідного матеріалу. Зокрема, для червоних кров'яних тілець (еритроцитів) слід враховувати швидкість та глибину заморожування.

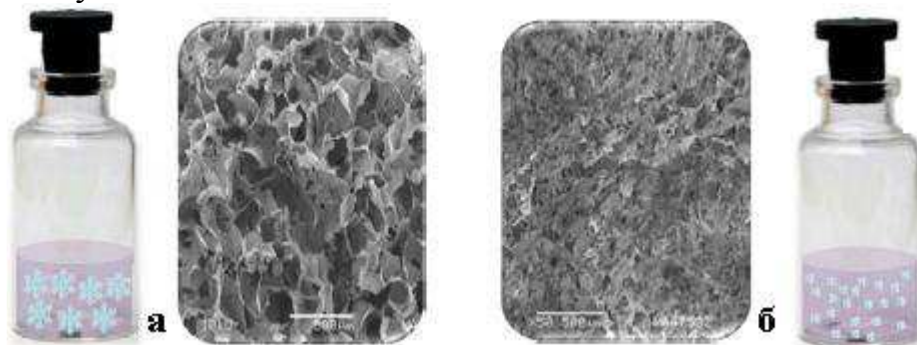
Швидкість заморожування є одним з основних параметрів, які впливають на кінцевий результат. При повільному заморожуванні живі біологічні об'єкти поступово адаптуються до умов холоду, при чому це запобігає їх склеюванню та руйнуванню (рис. 2). В результаті швидкого заморожування утворюються малі кристали льоду, що допомагає при мікроскопічному дослідженні ліофілізованих біологічних об'єктів, проте ускладнює ліофільне висушування [10].



**Рис. 2. Різниця між повільним (А) та швидким (Б) заморожуванням еритроцитів [13]**

В умовах лабораторії ДНКІБШМ застосовується процес попереднього заморожування біологічного матеріалу протягом 12, 24, 48 годин. Планується провести попереднє заморожування протягом 12, 24, 48 та 72 годин та порівняти результати.

Температура, при якій заморожуються біологічні об'єкти, впливає на розміри кристалів льоду та пористість. Чим глибше охолодження, тим менші кристали льоду утворюються, проте зменшується і пористість біологічного об'єкту (рис. 3). Збільшення рівня охолодження збільшує і нуклеативну температуру ( $R_p$ ), підвищення якої на кожен градус зменшує час ліофільної сушки на 3%. В даному випадку потрібно знайти «золоту середину» для забезпечення контрольованого розміру кристалів льоду та достатньої пористості біологічного об'єкту на виході.



**Рис. 3. Порівняння результатів попереднього заморожування: вища температура (а), нижча температура (б) [15]**

У зв'язку з тим, що потрібно переносити біологічний матеріал з холодильної камери в ліофільну сушку, частина продукту розморожується. Тому пропонується два способи вирішення протиріччя: або застосовувати спеціальний пристрій для перенесення біологічного матеріалу в ліофільну сушку, або проводити попередню заморозку відразу в ліофільній сушці, використовуючи аналітичні можливості нового агрегату.

Заморожування проводиться в скляному посуді. Суспензія поступово стає все більше і більше в'язкою зі зменшенням температури. Врешті решт об'єкт перетворюється на тверду речовину в певний момент часу [12].

Після заморозки продукту відбувається фаза первинної сушки, в якій умови повинні бути такими, щоб можна було видалити лід за допомогою сублімації, оминаючи рідку фазу (рис. 4). Це вимагає дуже обережного контролю двох параметрів – температури і тиску.

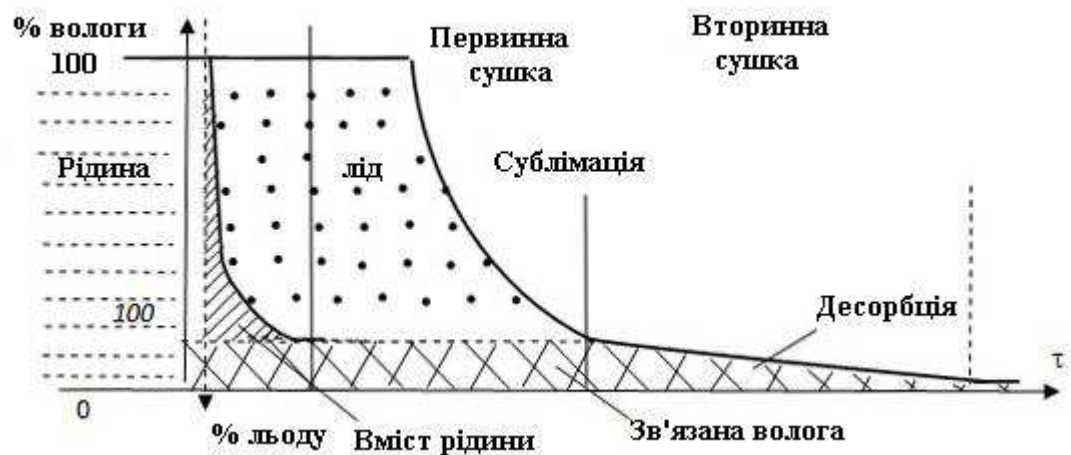


Рис. 4. Фізична модель процесу ліофілізації, де  $\tau$  – час

Надзвичайно важливо, щоб температура, при якій проходить ліофільна сушка, була збалансована між температурою повного замерзання об'єкту та температурою точки максимальної сублімації. Цей баланс є ключовим для оптимального висушування. Спочатку об'єкт охолоджують до певної температури, а потім поступово піднімають температуру до критичної точки, яка називається потрійною точкою, або точкою рівноваги. Якщо і далі підвищувати температуру, то лід перетвориться на рідину [11]. Саме тому в даній точці починають знижувати тиск, щоб оминати фазу рідини і перейти у газоподібний стан. Ось чому вакуумний насос є невід'ємним компонентом системи ліофільної сушки, він використовується для зниження тиску оточуючого середовища навколо об'єкту. Іншим незамінним компонентом системи є конденсор, який використовується для збирання вологи, яка виходить із замороженого продукту. На ньому конденсується вода [2].

Молекули водяної пари мають природну здатність рухатись до конденсора, оскільки він має нижчий тиск насиченої пари, ніж у об'єкта [8]. До того ж температура колектора повинна бути значно нижчою від температури об'єкта. Підвищення температури об'єкта має більший вплив на різницю тиску насиченої пари, ніж зниження температури конденсора.

Третім компонентом, незамінним у системі ліофільної сушки, є теплова енергія. Майже в десять разів більше енергії потрібно, щоб сублімувати 1 г води із замороженого продукту порівняно з заморожуванням 1 г води [4]. Ось чому необхідно підвищувати температуру об'єкта для підтримки сублімації водяної пари із замороженого продукту. Підігрів повинен ретельно контролюватись, оскільки підвищення температури вище, ніж температура зовнішнього середовища при сублімації води із замороженого продукту, може підвищити температуру продукту вище температури потрійної точки. Існує два способи підвищення температури. Перший метод – це підігрів полиць, на яких знаходиться об'єкт. Іншим методом – це підігрів усієї камери. За допомогою обладнання ДНКІБШМ можливо підвищувати температуру обома методами. Планується провести дослід з використанням обох способів та перевірити, який найбільш придатний для умов лабораторії.

Перший спосіб: на етапі вторинної сушки, коли необхідно підвищувати температуру навколо біологічного матеріалу (рис. 4), за допомогою технічних можливостей приладу підвищити температуру полиць, на яких знаходяться флакони. Перевага даного методу полягає в менших затратах енергії на підігрів.

Другий спосіб: замість підвищення температури полиць збільшити температуру камери, переключивши прилад у відповідний режим. Недоліками даного методу є більші затрати енергії на підігрів та можливість втрати тепла.

Завдяки великій тривалості етапу первинної сушки, енергоємності та можливості пошкодження біологічного об'єкта дуже важливим є моніторинг, контроль та оптимізація трьох основних параметрів: температури, тиску та енергії у вигляді підвищення температури [5].

Дуже часто використовується термоелемент, який поміщається в декілька флаконів для вимірювання температури продукту під час процесу.

Основні недоліки:

- інвазивність (елемент вводиться прямо у флакон з біологічним об'єктом);
- вплив утворення льоду та сублімації на результат;
- проблеми, пов'язані зі стерильністю продукту.
- можливість вимірювання температури лише в одній точці.

Новітні розробки дозволяють використовувати «Розумні флакони» (рис. 5), які за допомогою вбудованих датчиків здатні вимірювати три види температури та мають ряд переваг:

- вимірювання внутрішньої ( $T_{\text{внутр}}$ ), зовнішньої температур ( $T_{\text{зовн}}$ ) та температури полиці ( $T_{\text{пол}}$ );
- неінвазивне вимірювання.



Рис. 5. Принцип вимірювання температури «Розумними флаконами»

Існує метод вимірювання температури за допомогою ближнього інфрачервоного світла [6].

Основним недоліком цього методу є те, що вимірювання температури можливо тільки через 50-100 хв після початку роботи, щоб лід сублімується.

Після первинної сушки увесь лід сублімується, проте залишається зв'язана волога у дослідному зразку. Здається, що продукт уже висушений, але вміст залишкової вологи може бути в межах 7-8%. На етапі вторинної сушки важливо продовжувати висушування при підвищеній температурі, щоб зменшити вміст залишкової вологи до оптимальних об'ємів [14]. Цей процес називається ізотермальною десорбцією, оскільки зв'язана волога десорбується з продукту.

Вторинна сушка зазвичай проходить, коли температура дослідного зразка, вища, ніж температура камери, але знаходиться нижче потрібної точки [3]. Всі інші умови, такі як тиск та температура конденсора, залишаються без змін. Оскільки відбувається десорбція, вакуум повинен бути настільки низьким, на скільки можливо, та температура конденсора на скільки низькою, на скільки можливо. Етап вторинної сушки зазвичай займає від 1/3 до 1/2 часу порівняно з часом, який займає первинна сушка.

Отже, в процесі вторинної сушки обов'язково необхідно контролювати:

- сталість залишкової вологи після майже 6-годинної роботи за підвищеної температури;
- температуру об'єкта, яка повинна бути вище температури навколишнього середовища.

За високої температури та низької залишкової вологи неможливо нашкодити біологічному об'єкту, який піддається ліофілізації.

У результаті дослідження зроблено наступні висновки. Технологія ліофілізації має ряд переваг:

- Максимальний ступінь збереження (до 90%), дозволяє запобігти розкладанню та дегенерації біологічного матеріалу, мала питома вага (близько 1/5 - 1/10 ваги неліофілізованих речовин);
- Низький вміст вологи, тому ліофілізація оптимально підходить для еритроцитів, призначених для тривалого зберігання;
- Формування пористої та комірчастої структури еритроцитів, які матимуть неперевершені властивості швидкого розчинення та регідратації, а також відновлення властивостей при додаванні води;

- Завдяки герметичності приладу виключається можливість забруднення об'єкту чужорідною мікрофлорою;
- Можливість зберігання ліофілізованого продукту в нерегульованих температурних умовах.

Проте, для досягнення основних цілей ліофілізації еритроцитів необхідно чітко контролювати усі етапи процесу: попереднє заморожування, первинну сушку та вторинну сушку. До основних параметрів на етапі заморожування належать глибина і швидкість заморожування, на етапах первинної та вторинної сушки – температура продукту, температура конденсора, вакуум, тиск та енергія.

**Висновки.** Отже, теоретично можливо проводити ліофілізацію еритроцитів. Проте, в процесі необхідно ретельно контролювати температуру, тиск та вологу в камері ліофільної сушки.

### Список використаної літератури

1. Камовников Б. П. Вакуум-сублимационная сушка пищевых продуктов (Основы теории, расчет и оптимизация) /Б. П. Камовников, Л. С. Малков, В. А. Воскобойников. — М.: Агропромиздат, 1985 — 288 с.
2. Лебедев Д.П. Теплометрические основы оптимизации основы оптимизации параметров сублимационной сушки в вакууме/ Лебедев Д.П., Геращенко О.А., Андреев Е.Ф. – ИФЖ. – 1973. - Т.24, № 6. С. 1059-1064.
3. Пушкарь Н.С. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования/ Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Цветков У.Д.. – К: Наукова думка.– 1984. – 264 с.
4. Barbaree, J.M. and A. Sanchez. Cross-contamination during lyophilization// Cryobiology. – 1982. – Vol. 19. – P. 443-447.
5. Barresi A. Monitoring of the primary drying of a lyophilization process in vials// Barresi A, Pisano R, Fissore D, et al. – Chem Eng Process. – 2009. – Vol. 48. – P. 408–423.
6. Hafeez Y.M. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on biomechanical properties of bovine pericardium// Cell and Tissue Banking. – 2005. – Vol. 6. – P. 85–89.
7. Harris, R.J.C., Ed. Biological Applications of Freezing and Drying// Academic Press, New York. – 1954.
8. Jennings T. A. Lyophilization: introduction and basic principles// Englewood. CO : Interpharm Press. – 1999. – P. 624.
9. Nail, S.L. The effect of chamber pressure on heat transfer in the freeze-drying of parental solutions// Journal of the Parental Drug Association. – 1980. – Vol. 34. – P. 358-368.
10. Ozkavukcu S. Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects// Journal of Ankara medical school. – 2002. – Vol. 24. – No. 4. – P. 187-196.
11. Rindler V, Luneberger S, Schwindke P, et al. Freeze-drying of red blood cells at ultra-low temperatures// Cryobiology. – 1999. – Vol.38. – P. 2–15.
12. Rowe, T.W.G. Freeze-drying of biological materials: some physical and engineering aspects// Current Trends in Cryobiology. – 1970. – P. 61-138.



13. *Tattini Virgilio Jr., Vilhena Mariana M., Moroz Ludmila, Fantoni Denise T., Ronaldo N.M. Pitombo.* New attempt to freeze-drying red blood cells using stevioside as an alternative of lyoprotectant. Presented at the International Society of Lyophilisation – Freeze Drying (ISLFD) Mid-West Chapter Meeting. Chicago, USA. – 2012.

14. *Willemer H.* Measurement of temperature, ice evaporation rates and residual moisture contents in freeze-drying. // *Dev. Biol. Stand.* – 1991. – Vol. 74. – P. 123–136.

15. *Alexeenko A.* Fluid Dynamic Modeling of Lyo technology: Qualifying and Reshaping the Design Space. Presented at the International Society of Lyophilisation – Freeze Drying (ISLFD) Mid-West Chapter Meeting. Chicago, USA. – 2012.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА  
ЛИОФИЛИЗАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ/ Я.П. Лыса, В.С. Тындык, А.Н. Головки,  
В.А. Ушкалов, О.И. Гордиенко**

*Проведен анализ процесса лиофилизации эритроцитов, определено основные параметры, которые влияют на качество лиофильно высушенных биологических объектов. Проведен анализ методов контроля этапов лиофильной сушки. Результаты будут использованы для моделирования процесса и его оптимизации.*

*Ключевые слова: лиофилизация, сублимация, предварительная заморозка, первичная сушка, вторичная сушка.*

**DETERMINATION OF BASIC PARAMETERS OF PROCESS OF  
FREEZE-DRYING OF RED CORPUSCLES/ Y. Lysa, V. Tyndyk, A. Golovko,  
V. Ushkalov, O. Gordienko**

*Freeze-drying process and its main parameters that affect the quality of the freeze-drying of red blood cells have been analyzed. The analysis methods of freeze-drying stages control have been studied. The results will be used for modeling and optimization of process.*

*Key words: freeze-drying, sublimation, lyophilization, prefreezing, primary drying, secondary drying.*

**Рецензент – кандидат ветеринарных наук, Л. М. Виговська**