

Экспериментальное определение пороговых концентраций криопротекторных веществ, обеспечивающих ингибирование механических повреждений криоконсервируемых биообъектов

А.И.ОСЕЦКИЙ, А.Л. КИРИЛЮК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Одной из наиболее основных причин повреждения биологических систем при замораживании является механическое разрушение клеток растущими кристаллами льда. При обсуждении этой проблемы была высказана точка зрения о том, что особенно активно такие повреждения должны наблюдаться в случае существования в замороженном образце замкнутых локальных жидких фракций (включений). Тогда эти повреждения могут реализоваться за счет пластической деформации льда при релаксации давлений, возникающих в замкнутых жидких включениях [1, 2]. Исключить действие такого механизма повреждения можно только путем увеличения концентрации криопротекторных веществ $C_{кр}$. Однако в этом случае следует учитывать токсическое действие, которое оказывает криопротектор на биологические объекты при достаточно высоких значениях $C_{кр}$. В связи с этим при разработке технологий низкотемпературного консервирования особую актуальность приобретает проблема точного определения тех концентраций криопротекторных веществ, при которых большая часть локальных жидких включений переходит в жидкие прослойки, как это схематически показано на рис. 1. Такой переход приводит к инаktivации данного механизма повреждений, так как в сквозных жидких фракциях избыточные давления в процессе замораживания биологических систем не возникают.

Очевидно, что относительно точное определение пороговых концентраций криопротекторного вещества $C_{кр}^*$ является сложной экспериментальной задачей, требующей разработки новой методики. Апробация такой методики – основная цель настоящей работы.

Материалы и методы

Предлагаемый экспериментальный метод основан на том, что сопротивление внешней нагрузке и пластическая деформация замороженных образцов, содержащих замкнутые жидкие включения, определяются в основном механическими свойствами кристаллов льда. В этом случае деформационные кривые исследуемых образцов

Адрес для корреспонденции: Кириллук А.Л., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-38-71, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

имеют классический вид, характеризующийся наличием стадии упругой деформации, ярко выраженного предела текучести и стадии деформационного упрочнения [3, 4]. При этом по мере роста числа и размеров замкнутых включений будет изменяться только значение предела текучести, в то время как общий вид деформационных кривых, а также значения модулей упругости и сдвига, характеризующие стадию упругой деформации, полностью сохраняются. Уменьшение пределов текучести здесь связано с уменьшением эффективной площади сдвига твердофазной матрицы по мере перехода ее отдельных фрагментов в жидкое состояние.

Однако, при переходе замкнутых жидких включений в сквозные жидкофазные прослойки, как это показано на рис. 1, характер пластического течения замороженных образцов резко изменяется. Это связано с тем, что их деформация теперь определяется не пластическими сдвигами внутри поликристаллических зерен льда, а скольжением относительно друг друга по разделяющим их жидкофазным прослойкам. Как следствие, меняется вид деформационных кривых: исчезает их стадийность и фактически теряют смысл понятия модулей упругости или сдвига, так как деформация образцов ϵ теперь увеличивается со временем t по закону даже при напряжениях $\sigma < \sigma_{тек}$.

$$\epsilon = \frac{\sigma}{\eta} \cdot t,$$

здесь σ – приложенное внешнее напряжение, $\sigma_{тек}$ – предел текучести замороженного образца, η – динамическая вязкость жидких фракций.

В настоящей работе исследовалась пластическая деформация замороженных водных растворов ДМСО с различной концентрацией криопротекторного вещества при одинаковой для всех экспериментов температуре -90°C , которая подбиралась из условия $T > T_g$. Образцы деформировались с помощью описанной в работе [5] деформационной приставки.

Для построения деформационных кривых $\sigma = \sigma(\epsilon)$ была использована специально разработанная методика периодических догрузок. Необходимость ее применения обусловлена очень высокими значениями вязкости жидких фракций в наиболее

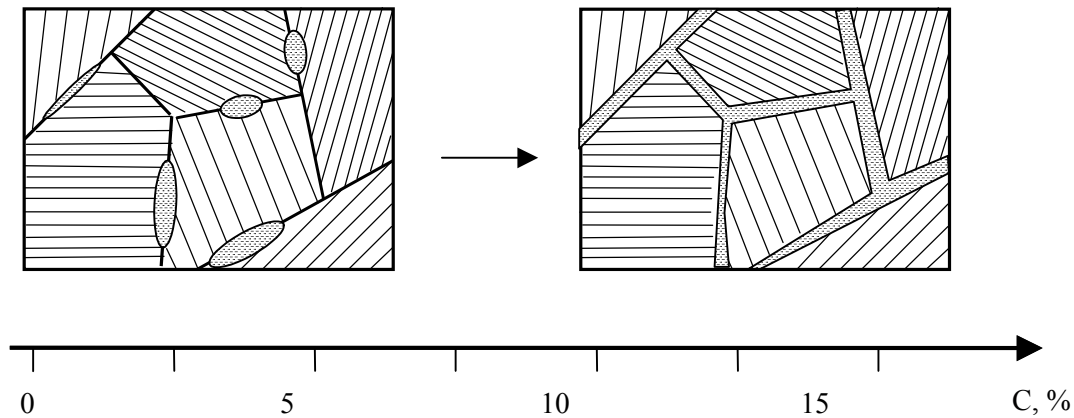


Рис. 1. Изменение структуры замороженных водных растворов с ростом концентрации криопротекторного вещества

удобных для экспериментального анализа температурных интервалах, а также тем обстоятельством, что величина скачка модуля сдвига σ при переходе от локальных жидких включений к сквозным уменьшается по мере увеличения значений η и скорости деформации образца $\dot{\epsilon}$. Методика периодических догрузок позволила запрограммировано уменьшить среднюю скорость деформации образца до значений, при которых скачок модуля сдвига на зависимости $G=G(C_{кр})$ фиксируется достаточно точно. Принцип ее реализации схематически показан на рис.2. Согласно представленной схеме скорость деформации замороженных образцов $\dot{\epsilon}$ можно варьировать в широких пределах, изменяя как величину прикладываемых нагрузок, так и время между приложением двух догрузок. Кроме того, данный подход позволяет определять переход от локальных к сквозным жидким включениям не только по изменению параметров деформационной кривой, но и по величине пластической деформации образца $\Delta\epsilon_n$ в промежутке между отдельными последовательными догрузками n и $n+1$. Очевидно, что при напряжениях $\sigma < \sigma_{тек}$ в случае классической деформационной кривой, соответствующей локальным жидким включениям, величина $\Delta\epsilon_n$ практически равна нулю. Резкое возрастание такой деформации при увеличении концентрации криопротекторного вещества свидетельствует о возникновении в замороженном образце при температурах $T > T_g$ сквозных жидких прослоек.

Результаты и обсуждение

В работе анализировали наблюдаемые при увеличении концентрации криопротекторных веществ изменение модуля сдвига G замороженных образцов и суммарное приращение пластической деформации между последовательными догрузками $\Delta\epsilon_\Sigma$ при внешних напряжениях $\sigma < \sigma_{тек}$.

Характерные кривые пластического течения замороженных водных растворов ДМСО с различными концентрациями криопротекторного вещества показаны на рис.3. Изменения, связанные с переходом от состояния замкнутых жидких включений к состоянию сквозных жидких прослоек, при прочих равных условиях инициируются только увеличением концентрации криопротекторных веществ $C_{кр}$. Поэтому их удобно исполь-

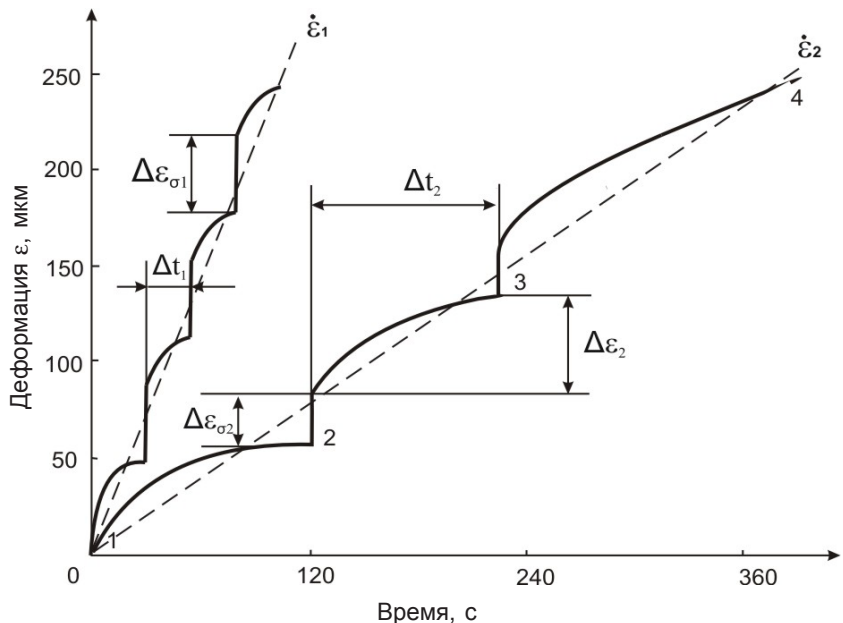


Рис. 2. Схематическое изображение кривых деформации замороженных растворов ДМСО, полученных методом периодических догрузок величинами $\Delta\epsilon_{\sigma_1}$ и $\Delta\epsilon_{\sigma_2}$ через промежутки времени Δt_1 и Δt_2 соответственно.

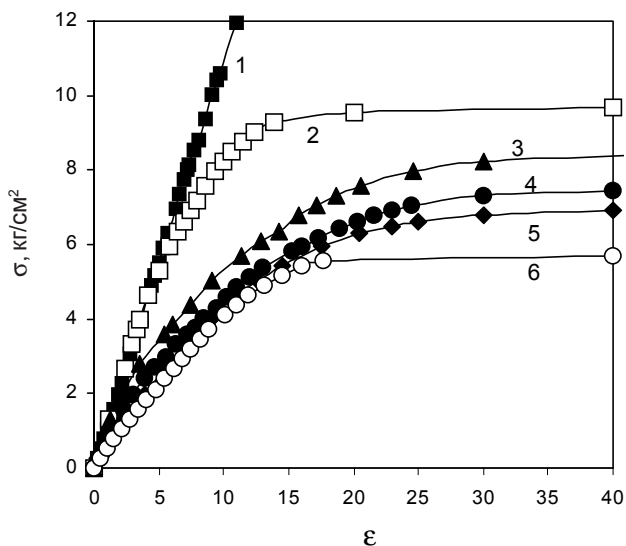


Рис. 3. Кривые пластического течения замороженных водных растворов ДМСО различной концентрации: 1 – дистиллированная вода; 2 – 3%-й водный раствор ДМСО; 3 – 5%-й водный раствор ДМСО; 4 – 7%-й водный раствор ДМСО; 5 – 10%-й водный раствор ДМСО; 6 – 15%-й водный раствор ДМСО.

зовать для определения пороговых значений $C_{кр}^*$, при которых такой переход реализуется.

На рис. 4, 5 показаны концентрационные зависимости величин G и $\Delta\epsilon_2$ для замороженных водных растворов ДМСО, полученные на основании кривых, представленных на рис. 3 и 2 соответственно. Здесь наблюдаются скачкообразное уменьшение модуля сдвига и увеличение величины $\Delta\epsilon_2$ при концентрации 5% и выше. Эти данные дают возможность утверждать, что при достижении некоторого порогового значения концентрации $C_{кр}^*$ происходит переход от замкнутых включений к жидким прослойкам и соответственно

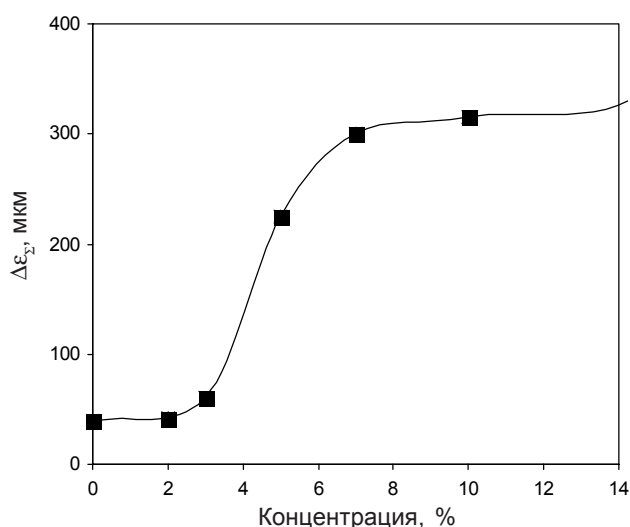


Рис. 5. Зависимость суммарного приращения пластической деформации $\Delta\epsilon_2$ между последовательными догрузками от концентрации замороженных водных растворов ДМСО.

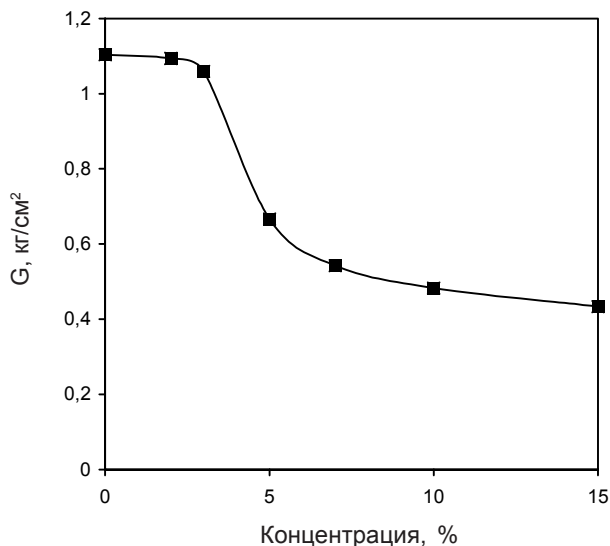


Рис. 4. Зависимость модуля сдвига G от концентрации замороженных водных растворов ДМСО.

меняется характер течения замороженных образцов.

Выводы

Полученные результаты имеют большое значение для экспериментальной криобиологии. Впервые исследовалась пластическая деформация замороженных растворов ДМСО вблизи температуры стеклования. Более того, эти результаты хорошо согласуются с представлениями о структуре замороженных криопротекторных растворов. Однако для однозначного утверждения о природе данного механизма необходимо провести эксперименты с рядом криопротекторных растворов в различных деформационных режимах. Поэтому можно считать, что данная работа открывает определенное направление в современной экспериментальной криобиологии.

Литература

1. Осецкий А.И. Повреждение охлаждаемых биообъектов в результате дислокационной микропластичности кристаллов льда // 2-я Всесоюз. конф. по криобиологии криомед: Тез. докл. – Харьков, 1984. – С. 65.
2. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 140 с.
3. Бернер Р., Кронмюллер Г. Пластическая деформация монокристаллов. – М.: Мир, 1969. – 272 с.
4. Мазно Н. Наука о льде. – М.: Мир, 1988. – 229 с.
5. Осецкий А.И., Гурина Т.М. Исследование фазовых состояний замороженных растворов и биосистем методом термопластической деформации // Пробл. криобиологии. – 1992. – №2. – С. 24–28.