

УДК 577.3

УЛЬТРАЗВУК ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДИАПАЗОНА ВЛИЯЕТ НА ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ЛЬДА

© 2021 г. Д.Г. Садикова, А.А. Андреев

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: sdg7@list.ru

Поступила в редакцию 26.11.2019 г.

После доработки 25.11.2020 г.

Принята к публикации 30.11.2020 г.

Изучено образование микрочастиц льда при замерзании водных криозащитных растворов. Форма и размер частиц зависела от состава замороженного раствора. В процессе замерзания растворов при облучении ультразвуком частотой 0.88 МГц и интенсивностью 1 Вт/см² изменяется форма микрочастиц льда. Происходит формирование более округлых микрочастиц. В многокомпонентных растворах эффективность воздействия ультразвука с данной частотой и интенсивностью на процессы замерзания растворов и формирование микрочастиц льда заметно снижается.

Ключевые слова: криозащитные растворы, криомикроскопия, микрочастицы льда, растрескивание льда, ультразвук.

DOI: 10.31857/S0006302921020010

При охлаждении водных растворов возникновение точки зарождения вызывает рост кристаллов льда по всему объему этого раствора и замерзание [1].

После замерзания всего объема жидкости дальнейшее ее охлаждение до сверхнизких температур приводит к формированию растрескиваний за счет термомеханических напряжений в массиве льда [2]. Наличие растворенных примесей изменяет как температуру начала образования кристаллов льда [3], так и температуру начала растрескивания и формирования микрочастиц льда [4]. От формы частиц льда может зависеть степень повреждения живых клеток, подвергаемых замораживанию [5].

Внешние условия существенно изменяют формирование частиц льда при замерзании, что позволяет улучшать эффективность криозащитных растворов, используя дополнительные физические воздействия.

Использование ультразвука при замораживании водных растворов приводит к возникновению дополнительных точек зарождения кристаллов льда, в результате чего появляется возможность изменять процесс криоконсервации

различных биологических материалов в зависимости от параметров ультразвука [6, 7].

Из физической и коллоидной химии нам известно, что воздействие ультразвука высокой мощности излучения может привести к разрушению ковалентных связей в воде и водных растворах, в частности, молекула воды может распадаться на ионы H^+ и OH^- , в дальнейшем образуя соединение H_2O [8–10]. Однако интенсивность используемого нами ультразвукового излучения не выходит за терапевтический диапазон, поэтому разрушение ковалентных связей в нашем случае маловероятно. В то же время при распространении ультразвуковой волны происходит колебательное движение молекул среды, в результате которого, возможно, происходит изменение параметров среды и снижается скорость охлаждения растворов.

Ранее нами было показано, что скорость охлаждения раствора влияет на форму и размер микрочастиц льда, образующихся при их замерзании [4]. При этом при уменьшении скорости охлаждения увеличивались как периметр, так и площадь микрочастиц льда. Мы предположили, что использование ультразвука при охлаждении раствора приведет также к изменению площади, периметра и фактора формы микрочастиц льда [11].

Сокращения: ФР – физиологический раствор, Me₂SO – диметилсульфоксид, ЯЖ – яичный желток, ДВ – дистиллированная вода.

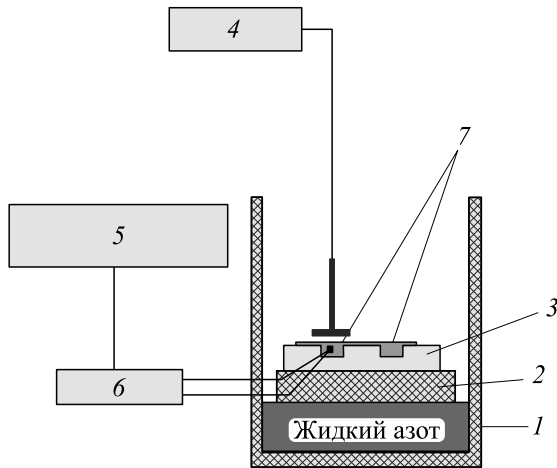


Рис. 1. Экспериментальная установка: 1 – пенопластовая коробка объемом $8 \cdot 10^3 \text{ см}^3$; 2 – пенопластовый плотик; 3 – кварцевая камера Фукса–Розенталя; 4 – ультразвуковой генератор УЗД 1.01Ф (Россия), частота 0.88 МГц; 5 – компьютер; 6 – АТТ-2006 – электронный термометр с термопарой (медь/константан, диаметр 0.1 мм), термопара в опытном образце, на периферии; 7 – опытный и контрольный образцы.

МЕТОДЫ

Используемые растворы. Все рабочие растворы готовили на дистиллированной воде. Использовали следующие образцы: физиологический раствор для осетровых рыб [12] (ФР), 10% диметилсульфоксида на физиологическом растворе (ФР + Me_2SO), 10% диметилсульфоксида и 10% яичного желтка (ЯЖ) на физиологическом растворе (ФР + Me_2SO + ЯЖ). Состав физиологического раствора (в мМ): NaCl – 84, KCl – 3, CaCl_2 – 3, NaHCO_3 – 23, pH 7.6.

Для сравнения брали дистиллированную воду (ДВ).

Экспериментальная установка. Для замораживания с использованием ультразвука использовали установку (рис. 1), которая состоит из пенопластового бокса для замораживания образцов в парах жидкого азота до -150°C . После того как температура среды достигала -150°C , образец помещали в жидкий азот (-196°C). Для регистрации использовали микроскоп Orthoplan (Carl Zeiss, Германия) с видеоокуляром ВР–32 (Россия).

Раствор замораживали при направленном воздействии ультразвуковой волны частотой 0.88 МГц и интенсивностью 1 Вт/см^2 . В качестве источника излучения использовали аппарат для ультразвуковой терапии УЗТ 1.01Ф (Россия).

Источник излучения находился на расстоянии 2 см от образца все время замораживания в тонком слое (0.2 мм). Объем образца – 10 мкл. В качестве контроля брали образцы, которые замора-

живали синхронно с опытными, но без ультразвуковой обработки.

Для замораживания растворов использовали кварцевые камеры Фукса–Розенталя. Контролем являлись пробы, замораживаемые без ультразвукового излучения.

С помощью видеоокуляра криомикроскопа регистрировали сформированные микрочастицы льда при температуре -196°C . Размер частиц льда определяли при обработке изображения программой Trace 1.24b. Для характеристического описания частиц в плоскости использовали изопериметрический фактор.

Изопериметрический фактор определяли по полученным данным площади и периметра, характеризующим форму микрочастиц льда (фактор формы, параметр F_f). Значение данного фактора можно вывести из изопериметрического равенства:

$$4\pi S \leq P^2, \quad (1)$$

где S – площадь, P – периметр.

Равенство достигается, когда кривая является идеальной окружностью. Доказательство этого неравенства было приведено в работе [13]. Если мы имеем замкнутую кривую, то фактор формы будет выражен как

$$F_f = 4\pi S/P^2, \quad (2)$$

где P – длина периметра замкнутой кривой, S – площадь круга с тем же периметром.

Обычно $F_f \leq 1$, но в случае, если кривая является идеальным кругом, $F_f = 1$. Таким образом, фактор F_f выражает степень отклонения формы данной фигуры от окружности. Данный фактор мы использовали для описания микрочастиц льда, которые образуются при глубоком охлаждении льда, полученного из криозащитных растворов. Площадь и периметр частиц льда измеряли по полученным экспериментальным микрофотографиям. Используя эти данные, мы рассчитывали безразмерный коэффициент, характеризующий степень округлости.

Статистическую обработку проводили с помощью программы SigmaPlot 13 (Demo). Результаты были представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка ($M \pm m$) для $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 можно увидеть изображения микрочастиц льда. Видно, что при облучении замораживаемого раствора ультразвуком размер микрочастиц льда уменьшается. Также заметно, что микрочастицы для раствора «ФР + Me_2SO » становятся более округлыми с размытыми граница-

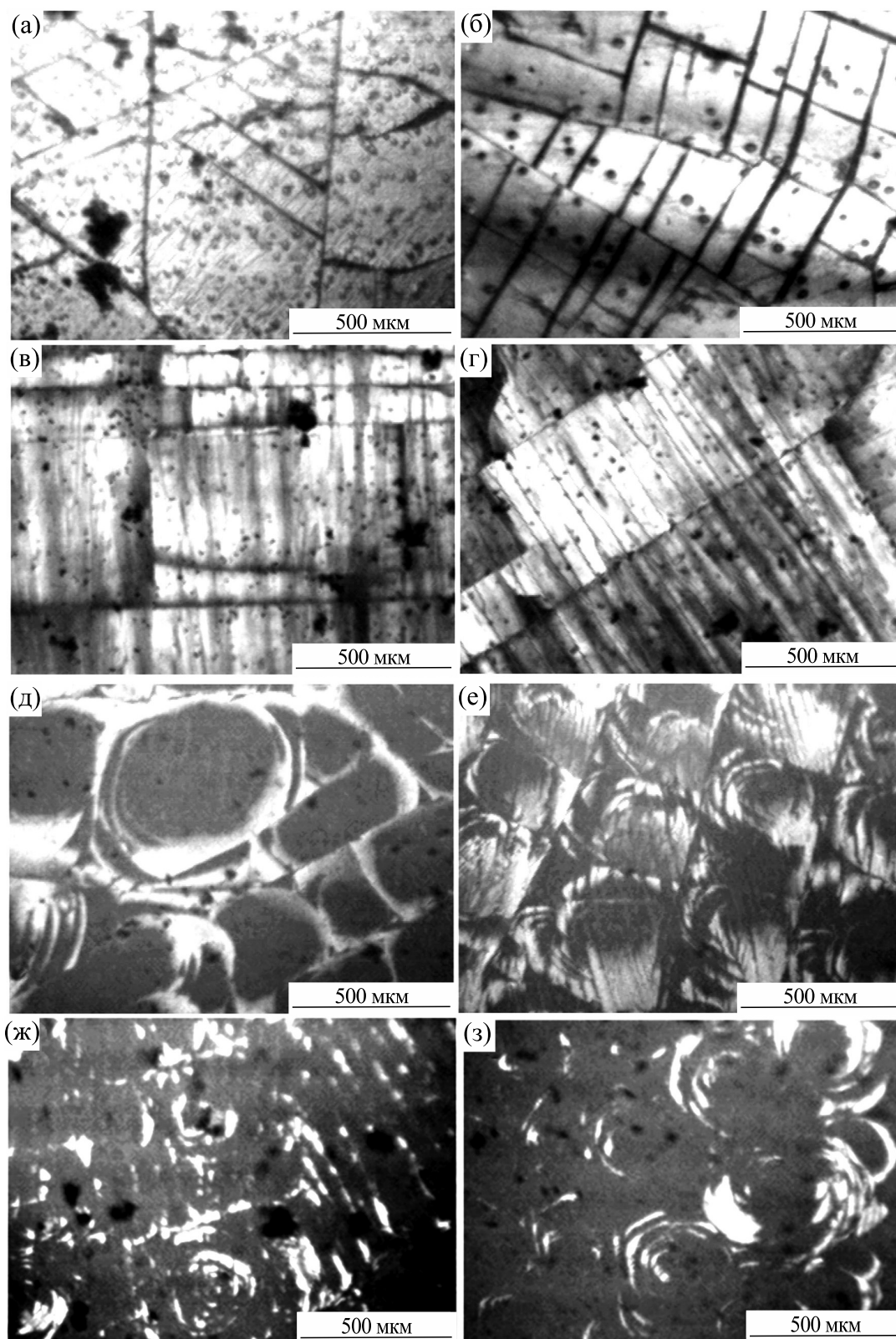


Рис. 2. Микрочастицы льда (температура -196°C): (а) – дистиллированная вода; б – ДВ + ультразвук, (в) – физ. раствор для осетровых рыб, (г) – ФР + ультразвук; (д) – Me_2SO (10%) + ФР; (е) – Me_2SO (10%) + ФР + ультразвук; (ж) – Me_2SO (10%) + ФР + яичный желток, (з) – Me_2SO (10%) + ФР + ЯЖ + УЗ.

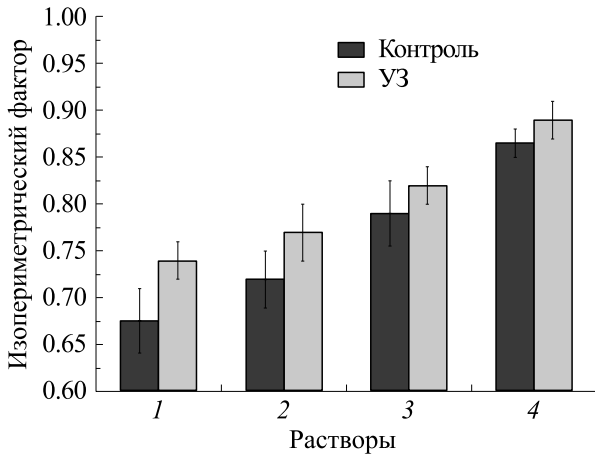


Рис. 3. Изопериметрический фактор для микрокристаллов льда растворов в контроле и с использованием ультразвука (температура -196°C): 1 – ДВ, 2 – ФР, 3 – Me_2SO + ФР, 4 – Me_2SO + ФР + 10% ЯЖ.

ми. При облучении криозащитного раствора с добавлением яичного желтка границы микрокристаллов стираются.

В результате обработки данных был определен основной параметр для анализа изменения характера образования льда – фактор формы (рис. 3, таблица).

Показано, что ультразвук оказывает влияние на формирование микрокристаллов льда. Из рис. 3 видно, что при облучении ультразвуком фактор формы микрокристаллов увеличивался. Это говорит о том, что под воздействием ультразвуковой волны формируются микрокристаллы льда более округлой формы. Это согласуется с экспериментами, описанными в работе [14], которые показали, что в среднем округлость микрокристаллов льда 10%-го раствора маннита увеличивается под воздействием ультразвука и при увеличении акустической мощности.

Образование льда, в котором при прочих равных условиях формируются более округлые частицы, способствует повышению выживаемости клеток в процессе криоконсервации–оттаивания [15].

Видно, что по мере усложнения состава раствора за счет антифризных компонентов (Me_2SO) и липидно-белкового комплекса (яичный желток) увеличивается форм-фактор и одновременно снижается эффект ультразвука.

Процесс замерзания растворов при воздействии ультразвукового облучения сложен и зависит от многих факторов. Нами было показано [16], что воздействие ультразвука на раствор в начале охлаждения убирает низкотемпературный скачок, который происходит из-за эффекта переохлаждения. Вероятно, это происходит из-за постоянного акустического давления ультразвуковой волны на замораживаемый раствор, влияя на температуру и вязкости раствора, что приводит к образованию дополнительных точек зарождения. После достижения замораживаемого раствора низких температур, физические свойства раствора изменяются таким образом, что нужно учитывать влияние ультразвука на упругость и механическое напряжение образующихся волн и, как следствие, изменение общей скорости деформации среды под действием ультразвука.

Авторы работы [17] показали зависимость образования микротрещин при замерзании криопротекторов в тонких слоях от общей скорости деформации среды, которая является суммой скорости упругой деформации, скорости вязкой деформации и скорости термической деформации:

$$\varepsilon = \frac{1}{E} \frac{d\sigma}{dt} + \frac{\sigma}{3\eta} + \beta \frac{dT}{dt}, \quad (3)$$

где σ – механическое напряжение, E – модуль упругости, η – вязкость, β – коэффициент теплового расширения, T – температура, t – время.

Так как в нашей работе замерзание растворов происходит в тонком слое, можно сказать, что мы имеем только продольное распространение ультразвуковой волны. Поэтому исходя из того, что скорость распространения продольных волн имеет зависимость от модуля упругости и плотности среды, модуль упругости можно выразить через плотность (ρ) и скорость продольной волны (c) как $E = c^2\rho$.

Величина изопериметрического фактора для микрокристаллов льда исследованных растворов

ДВ		ФР		ФР + Me_2SO		ФР + Me_2SO + ЯЖ	
F_k	F_{us}	F_k	F_{us}	F_k	F_{us}	F_k	F_{us}
0.67 ± 0.03	0.74 ± 0.02	0.72 ± 0.03	0.77 ± 0.03	0.79 ± 0.03	0.82 ± 0.02	0.86 ± 0.02	0.89 ± 0.02

В нашем случае при замерзании водных растворов образование микротрещин приблизительно начинается после -50°C (для воды) и ниже [4]. Авторы работы [17] указывают, что при низких температурах вклад вязкости в скорость упругой деформации невелика. Также можно сказать, что при использовании ультразвука с параметрами 1 Вт/см^2 при низких температурах вклад ультразвука в термическую деформацию будет невелик. В результате в выражении (3) значимым останется только первый компонент.

Известно, что механическое напряжение можно выразить через силу, действующую на единицу площади $\sigma = F/S$. В нашем случае F — это сила радиационного давления, которую можно записать как $F = 2IS/c$, где I — интенсивность ультразвука, S — площадь сечения, c — скорость звука в среде.

В результате преобразования получаем:

$$\varepsilon = \frac{2I}{c^3\rho}$$

Видно, что в нашем случае основной вклад в образование микротрещин вносит скорость и интенсивность звука, и плотность среды.

При изменении состава замораживаемой среды скорость звука и плотность существенно изменяются в зависимости от солевых или органических включений. Из выражения (4) мы видим, что скорость деформации среды значительно уменьшается с ростом скорости звука и плотности среды.

Как было сказано ранее, с увеличением концентрации солей и органических добавок при облучении ультразвуком фактор формы продолжает увеличиваться. В это же время вклад ультразвука при формировании микрочастиц льда снижается. На рис. 3 показано, что чем более сложный раствор используется, тем меньший вклад ультразвука при формировании микрочастиц. В то же время увеличивающаяся размытость границ микрочастиц при ультразвуковом воздействии, вероятно, связана с уменьшением скорости деформации среды во время ее замерзания.

Предполагается что стеклование криозащитного раствора также увеличивает шансы получить качественный материал после криоконсервации—оттаивания [18]. В нашем случае (рис. 2ж,з) наблюдается тенденция к стиранию границ микрочастиц льда. Возможно, используя ультразвуковое воздействие на замерзание растворов при других режимах (например, используя другие частоты), мы сможем приблизиться к эффекту полного стирания границ микрочастиц или к стеклованию в будущем, что является следующим этапом нашей работы.

Можно предположить, что воздействие ультразвука в ходе замораживания криозащитных растворов будет способствовать лучшей сохран-

ности замораживаемых клеток. Одним из повреждающих факторов при криоконсервации живых организмов является разрушение клеток микрочастицами льда. Как видно из нашего исследования, использование ультразвука может быть перспективным для модификации образующихся микрочастиц в сторону формирования более округлых и менее травмирующих биоматериал форм при криоконсервации. Мы предполагаем, что использование ультразвука может быть эффективным инструментом при создании новых способов и методов криоконсервации генетического материала.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. I. Zhmakin, *Fundamentals of Cryobiology: Physical Phenomena and Mathematical Models* (Springer, Berlin, 2008).
2. Y. Rabin and P. S. Steif, in *Advances in Biopreservation*, Ed. by J. G. Baust and J. M. Baust (Taylor & Francis Group, 2007), pp. 359–379.
3. А. Г. Стромберг и Д. П. Семченко, *Физическая химия* (Высш. шк., М., 1999).
4. А. А. Андреев, Д. Г. Садикова, Н. А. Ивличева и А. В. Борода, *Биофизика* **62** (2), 213 (2017).
5. F. W. Kleinhans, J. F. Guenther, D. M. Roberts and P. Mazur, *Cryobiology* **52** (1), 128 (2006).
6. R. Chow, R. Blindt, R. Chivers, and M. Povey, *Ultrasonics* **43**, 227 (2005).
7. R. Chow, R. Blindt, A. Kamp, and P. Grocutt, *Ultrason. Sonochem.* **11**, 245 (2004).
8. A. Hottot, K. Nakagawa, and J. Andrieu, *Chem. Eng. Res. Des.* **86**, 193 (2008).
9. В. И. Кабачный и др., *Физическая и коллоидная химия* (Изд-во НФАУ, Харьков, 2001).
10. Н. В. Попова и С. А. Фатеева, *Вестн. ЮУрГУ. Сер. «Пищевые и биотехнологии»* **2** (1), 30 (2014).
11. Д. Г. Садикова и А. А. Андреев, *Евразийское научное объединение*, № 6-3 (52), 162 (2019).
12. E. Burzawa-Gerard, B. F. Goncharov, A. Dumas, and Y. A. Fontaine, *Gen. Comp. Endocrinol.* **29** (4), 498 (1976).
13. E. Schmidt, *Die Brunn-Minkowskische I. Math. Nachr.* **1**, 81 (1948).
14. M. Saclier, R. Peczkalski, and J. Andrieu, *Chem. Enginer. Sci.* **65**, 3064 (2010).
15. A. A. Andreev, D. G. Sadikova, E. N. Gakhova, et al., *Biophysics* **54** (5), 612 (2009).

16. А. А. Андреев, Д. Г. Садикова, Е. Н. Пономарева и др., Патент на изобретение RU 2540598 С2, 10.02.2015. Заявка № 2013125414/13 от 31.05.2013.
17. Y. Rabin, P. S. Steif, K. C. Hess, et al., *Cryobiology* **53**, 75 (2006).
18. Дж. Фаррант, *Криобиология*, № 2, 12 (1988).

The Effect of Therapeutic Ultrasound on the Formation of Ice Microparticles

D.G. Sadikova and A.A. Andreev

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

In this work, the formation of ice microparticles during freeze-drying of aqueous cryoprotective solutions has been studied. The shape and size of particles depended on the composition of the frozen solution. As aqueous cryoprotective solution freezes under the action of ultrasound at a frequency of 0.88 MHz and intensity of 1 W/cm², the shapes of ice microparticles tend to change and become more rounded. In multicomponent solutions, the application of ultrasound during freeze-drying of cryoprotective solutions and the formation of ice microparticles displayed a remarkable decrease in the efficiency of exposure at the said frequency and intensity.

Keywords: cryoprotective solutions, cryomicroscopy, ice microparticles, ice fracture, ultrasound