

МЕТОД АДИАБАТИЧЕСКОЙ КАЛОРИМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КРИОПРОТЕКТОРОВ

© 2019 г. Е.Ю. Симоненко, В.В. Прядун, А.А. Иванова, Е.В. Бурмистрова,
А.Н. Васильев, С.А. Яковенко

*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1/2*

E-mail: ksimonenko@inbox.ru

Поступила в редакцию 02.10.18 г.

После доработки 29.11.18 г.

Принята к публикации 03.12.18 г.

Эффективность криопротекторов, используемых для защиты клеток от повреждения, обычно оценивается по изменениям жизненно важных показателей клеток после заморозки. Для отдельных компонентов криопротекторов известны такие физические параметры, как температура стеклования, вязкость, токсичность и минимальная концентрация, необходимая для витрификации. Однако невозможно найти какие-либо физико-химические характеристики сред для криоконсервации, состоящих из комбинаций проникающих и непроникающих в клетку компонент. В работе с использованием метода адиабатической калориметрии, адаптированного для исследования жидких сред, измерена зависимость теплоемкости от температуры, определены температуры фазового перехода и изменений агрегатных состояний для глицеринсодержащего раствора, активно используемого как базового компонента криопротекторов и для коммерческого криопротектора. Зарегистрировано увеличение изменений энтропии и энтальпии в полтора раза в коммерческом криопротекторе по сравнению с водным раствором глицерина.

Ключевые слова: криопротектор, глицерин, адиабатическая калориметрия, теплоемкость.

DOI: 10.1134/S0006302919010010

В современной медицине и биологии все более широкое применение находят методы работы с клетками, связанные с низкими температурами, такие как криохирургия, криофиксация, криоконсервация. Метод криоконсервации активно используется для сохранения плазмы крови, пуповинной крови, стволовых клеток, гамет и эмбрионов [1,2]. При заморозке клетки повреждаются вследствие различных факторов – образования кристаллов льда и их механического воздействия на мембрану [3]; увеличения размеров кристаллов из-за рекристаллизации при оттаивании [4,5]; осмотического шока [6]; апоптоза, вызванного охлаждением [7]. Для защиты клеток при криоконсервации используют специальные вещества-криопротекторы: проникающие в клетку (глицерин, этиленгликоль, диметилсульфоксид, пропиленгликоль) и не проникающие в клетку (сахароза, трегалоза, высокомолекулярные соединения, белки, поливиниловый спирт и др.). Добавление криопротекторов позволяет регулировать процессы кристаллизации, достичь состояния перохлаждения, снизив температуру начала кри-

сталлизации в биологических системах. Определяющую роль при выборе того или иного компонента играет набор таких параметров, как температура стеклования, вязкость, минимальная концентрация необходимая для витрификации, а также токсическое действие на биологический материал [8]. Известно, что глицерин, в сравнении с другими соединениями, наносит наименьшее повреждение клеткам, поэтому многие коммерческие криопротекторные среды разработаны на основе глицерина [9]. При наличии в среде глицерина при физиологических температурах он проникает внутрь клетки, где, благодаря способности связывать воду, предотвращает дегидратацию цитоплазмы, а также способствует образованию стеклообразной аморфной фазы [10]. В настоящее время поиск криопротектанта с хорошей способностью к образованию стеклоподобного состояния, низкой токсичностью и низкой вязкостью является одним из приоритетных направлений исследований [11]. Об эффективности сред для криоконсервации биологического материала обычно судят по изменениям жизненно

важных свойств клеток (морфология, целостность мембран, целостность ДНК, подвижность или пролиферативная активность). Однако даже в присутствии современных коммерческих сред клетки значительно повреждаются после процесса заморозки–разморозки. Так, подвижность и морфологические показатели сперматозоидов могут ухудшаться на 30–70% после криоконсервации [12,13]. В связи с этим важно понимать физико-химические процессы, проходящие в многокомпонентных криопротекторах, используемых, например, для криохранения гамет человека, а также исследовать изменения фазовых и агрегатных состояний этих сред. В настоящее время невозможно найти в литературных источниках физико-химические характеристики таких сред, нет описаний изменений их агрегатных состояний при добавлении того или иного компонента.

Знание абсолютных значений теплоемкости необходимо для сравнения физико-химических свойств криопротекторов при добавлении отдельных компонент во время его модификации. В адиабатических калориметрах теплообмен образца с окружающей средой сведен к минимуму и потери теплового потока учитываются. Для измерения теплоемкости каждая температурная точка длительно (до нескольких часов) стабилизируется по температуре до установления равновесного состояния в исследуемой среде. Метод квазиадиабатической калориметрии дает абсолютные значения теплоемкости образца.

В настоящей работе предложена адаптация метода адиабатической калориметрии для исследования жидких сред и предложена методика обработки данных для базовых компонентов криопротекторов: водного раствора глицерина 12%. Усовершенствованная нами методика позволяет создать своего рода «паспортизацию» криопротекторов и оценить изменения агрегатных состояний на всех этапах их создания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения экспериментов мы использовали калориметр PPMS (Physical Property Measurement System, Quantum Design, Inc., USA), который изначально предназначен для исследования твердых тел. С целью проведения исследований по теплоемкости криопротекторов калориметр PPMS был адаптирован нами для выполнения поставленной задачи – проведения измерений в жидких средах. Аппаратура PPMS позволяет контролировать температуру с точностью до 0,01 К.

Погрешность измерения калориметром PPMS теплоемкости равна 0,4%, разброс тем-

пературной стабильности термометров «Cernox» (Lake Shore Cryotronics, Inc., США), используемых в калориметре PPMS, составляет не более 0,08% в течение шести лет эксплуатации [14]. Проводили исследование раствора глицерина (cat. No. 151339, 99%, Panreac Appli-Chem, Германия) в концентрации 12 об. % на 20 мМ буфере HEPES (Sigma, США). Буфер включал в себя различные компоненты в обычных для клеточных сред концентрациях (табл. 1) и воду (cat. No. W3500, Sigma, США). Молярная масса многокомпонентной среды Mr_{cp} составила 20,84 г/моль и была определена по следующей формуле:

$$Mr_{cp} = \sum_{i=1}^k \left(\frac{v_i}{\sum v_i} Mr_i \right), \quad (1)$$

где $v_i/\sum v_i$ – мольные доли компонентов, Mr – молярная масса.

Такой раствор по составу схож с базовой частью большинства коммерческих криопротекторов, таких как SpermFreeze (LifeGlobal, США), который также был исследован нами.

Для исследования жидкого образца был разработан контейнер из дюралюминия объемом ~20–30 мкл (рис. 1). Контейнер помещается в стандартную измерительную ячейку калориметра.

Первым этапом снимали зависимость теплоемкости от температуры для пустого контейнера. Данная зависимость является монотонно возрастающей функцией и, что важно, не содержит каких-либо особенностей. Эта зависимость приведена на графике (рис. 2). Так как теплоемкость является адитивной величиной, то для получения теплоемкости образца эту кривую вычитали из кривой измерения заполненного криопротектором контейнера.

Был разработан протокол заполнения контейнера исследуемой криопротекторной средой, запайки, создания вакуума и последующего из-

Таблица 1. Компоненты буфера на основе HEPES

Реагент	Концентрация, мМ
NaCl	112
KCl	2,8
Ca-лактат	1,8
KH ₂ PO ₄	0,4
NaHCO ₃	5,0
Глюкоза	5,56
Глицин	10,0
MgSO ₄	0,2

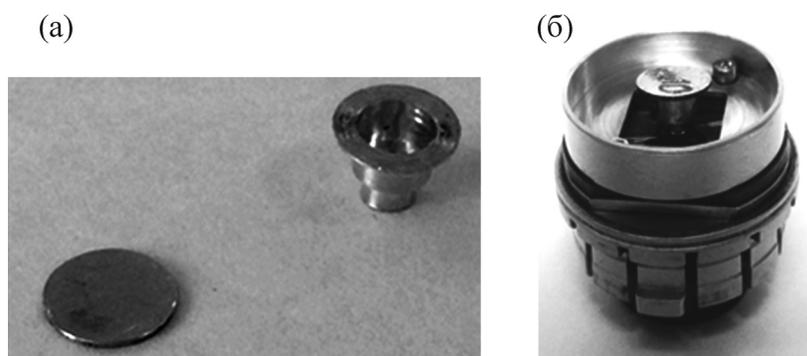


Рис. 1. Вид контейнера и закрепление его в калориметре PPMS.

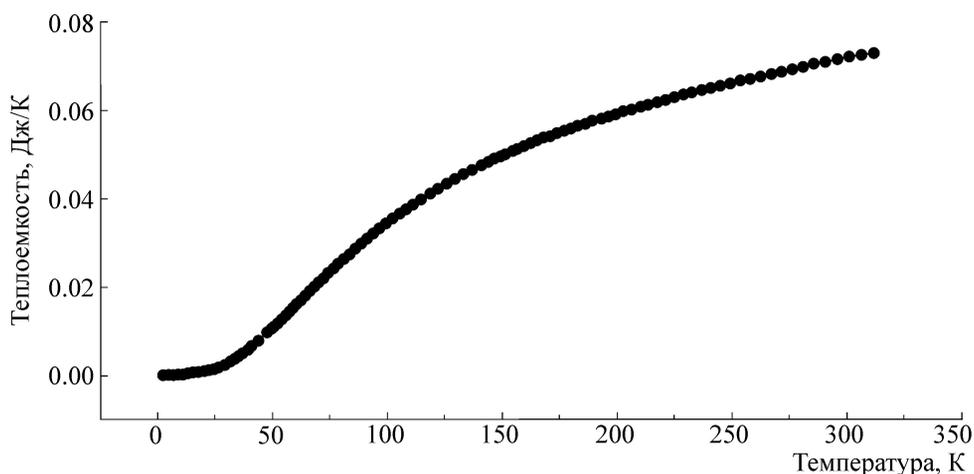


Рис. 2. График зависимости теплоемкости контейнера от температуры.

мерения. Этап снятия экспериментальной зависимости теплоемкости контейнера с криопротектором от температуры занимал последовательно от 7 до 10 суток и включал следующие стадии: образец криопротектора массой $m = 27,52$ мг был помещен в экспериментальный контейнер, запаян и охлажден в калориметре до 70 К со скоростью примерно 0,115 К/с, после чего методом адиабатической калориметрии была получена зависимость теплоемкости от температуры при нагревании образца до 295 К с шагом порядка 2,5 К и средней скоростью нагрева образца 0,002 К/с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выполнения работы был разработан следующий алгоритм эксперимента и обработки полученных данных:

- измерение зависимости теплоемкости от температуры для контейнера;
- измерение зависимости теплоемкости от температуры для исследуемого образца;

– построение производной теплоемкости по температуре;

– определение изменения основных термодинамических характеристик для исследуемого образца (энтропии ΔS и энтальпии ΔH).

В результате эксперимента была получена зависимость теплоемкости от температуры для глицеринсодержащей среды (рис. 3).

Определение точных значений температур фазовых переходов и изменений агрегатных состояний проводилось по максимуму производной теплоемкости от температуры (рис. 4).

В результате анализа графика зависимости теплоемкости от температуры можно выделить четыре характерные области температур, связанные с различными агрегатными состояниями криопротектора. Согласно литературным данным, можно предположить, что в области высоких температур исследуемая среда представляет собой жидкость или истинный раствор, в интервале от 264,7 до 204,3 К – дисперсную систему с процессами жидкостного фазового разделения (ликвацией) [19] или студнеобразный

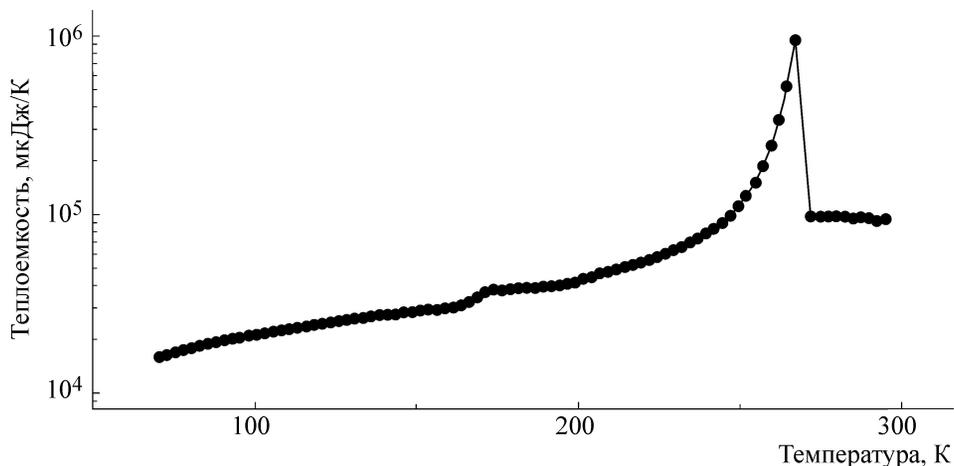


Рис. 3. График зависимости теплоемкости образца от температуры (значения теплоемкости контейнера вычтены).

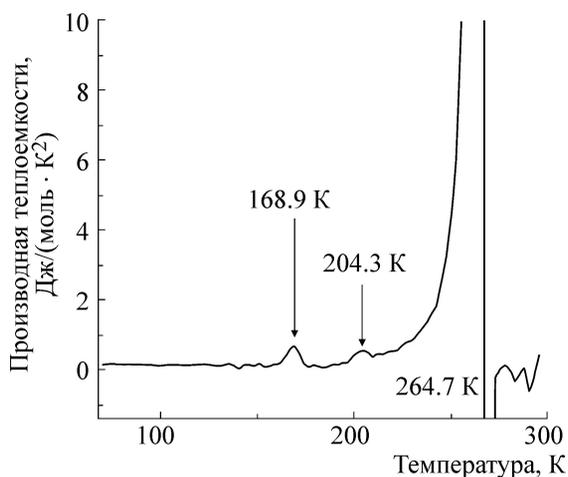


Рис. 4. Производная теплоемкости C_p по температуре для среды, содержащей 12% глицерина.

гель [15]; от 204,3 до 168,9 К – область стеклования, а в области температур ниже 168,9 К – кристаллическое тело [15]. Данные переходы наблюдались в работах [16,20]. Однако для более точного описания агрегатных состояний изучаемой системы необходимы дополнительные исследования с применением других физических методов (микроскопия, спектроскопия).

При температуре 264,7 К можно наблюдать фазовый переход первого рода. Температура перехода из жидкости в твердое тело для чистого глицерина была экспериментально определена много раз, ее наиболее точное значение составляет $T_k = 291,3$ К [17]. Таким образом, по сравнению с глицерином в водном растворе глицерина с солями происходит сдвиг фазового перехода первого рода в область более низких температур.

Для более точной характеристики агрегатного состояния образца при температуре 168,9 К было проведено сравнение экспериментальных данных с данными для глицерина, полученными в работе [18] (рис. 5). Так как профили температурной зависимости теплоемкости и температура перехода совпадают с описанными в работе [18], можно сделать вывод о том, что изменения агрегатного состояния при 168,9 К соответствует переходу из стеклообразного состояния в кристаллическое. Такие же выводы были сделаны в работе [20]: для водных растворов с низкой концентрацией глицерина при температурах ниже 150 К характерен переход в кристаллическое состояние.

Для определения термодинамических параметров использовали модель теплоемкости твердого тела Дебая. Для этого из низкотемпературной части температурной зависимости теплоемкости, в области кристаллического состояния исследуемого состава, определяли температуру Дебая θ_D ($\theta_D = 298$ К) и n – число атомов, приходящихся на одну элементарную ячейку ($n = 1$). По формуле Дебая (2), рассчитывали экстраполяцию значений теплоемкости в область высоких температур:

$$C = C_\infty \frac{12T^3}{\theta_D^3} \int_0^{\frac{\theta_D}{T}} \frac{\xi^3 d\xi}{e^\xi - 1} - \frac{3\theta_D}{T} \frac{1}{e^{\frac{\theta_D}{T}} - 1}, \quad (2)$$

где C – теплоемкость, C_∞ – теплоемкость при значениях температуры, выше θ_D .

Результат можно увидеть на рис. 6.

В работе также была получена зависимость теплоемкости от температуры для коммерче-

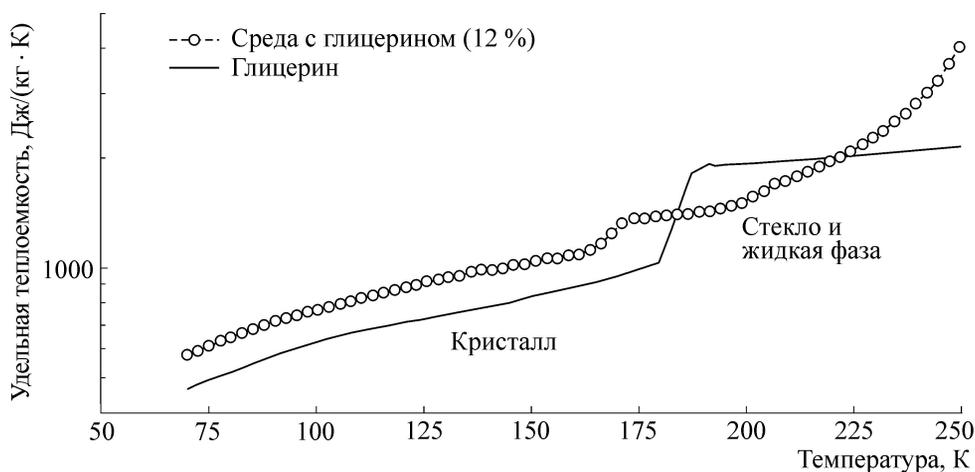


Рис. 5. Сравнение экспериментальных данных для исследуемой среды с данными, полученными для глицерина [18].

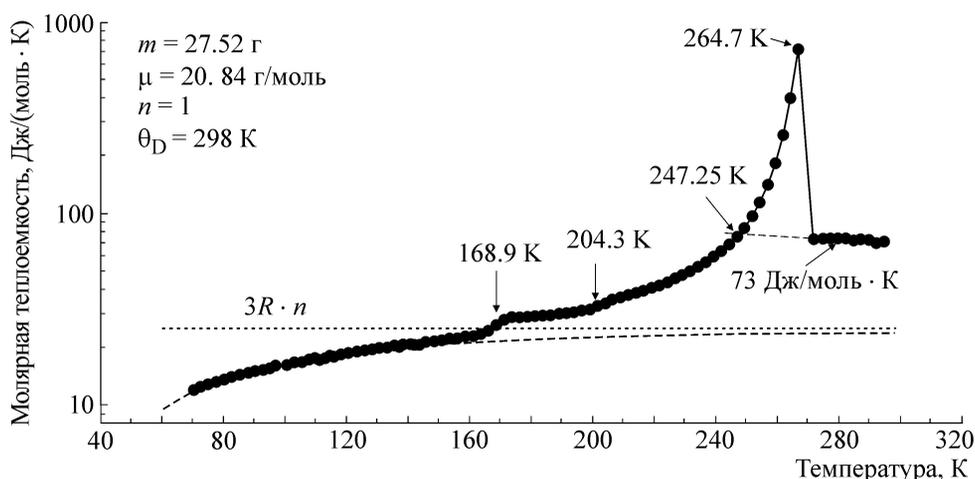


Рис. 6. Зависимость молярной теплоемкости 12%-го раствора глицерина от температуры.

ского глицеринсодержащего криопротектора SpermFreeze (рис. 7).

Из графика видно, что при температуре 263,8 К происходит фазовый переход первого рода из жидкого состояние в аморфное состояние. На основании вычисления производной теплоемкости по температуре можно выделить еще три характерные области температур, связанные с различными агрегатными состояниями криопротектора. Можно заметить, что основной вклад в температурную зависимость теплоемкости дает именно глицерин.

Состав коммерческого криопротектора отличается от исследуемой нами среды добавлением сахарозы как блокатора льда и человеческого альбумина (3,95 мг/мл). Данный криопротектор активно используется во вспомогательных репродуктивных технологиях для заморозки спермы. Как уже описывалось ранее,

современные криопротекторы представляют собой комбинацию из проникающих в клетку (глицерин, диметилсульфоксид) и непроникающих в клетку (сахароза, трегалоза) соединений. С одной стороны, применение таких комбинаций уменьшает токсические эффекты проникающих в клетку компонентов, уменьшают осмотический шок, а с другой стороны, добавление блокаторов льда препятствует образованию центров кристаллизации и способствует переходу в фазу стеклования [21]. Постоянно ведется поиск наиболее эффективного соединения или комбинации соединений для повышения выживаемости клеток при криоконсервации. На графиках видно, что при добавлении в водный раствор глицерина других соединений температура плавления увеличивается, а температура стеклования остается практически такой же. SpermFreeze хорошо зарекомендовал себя в практическом применении и показывает высо-

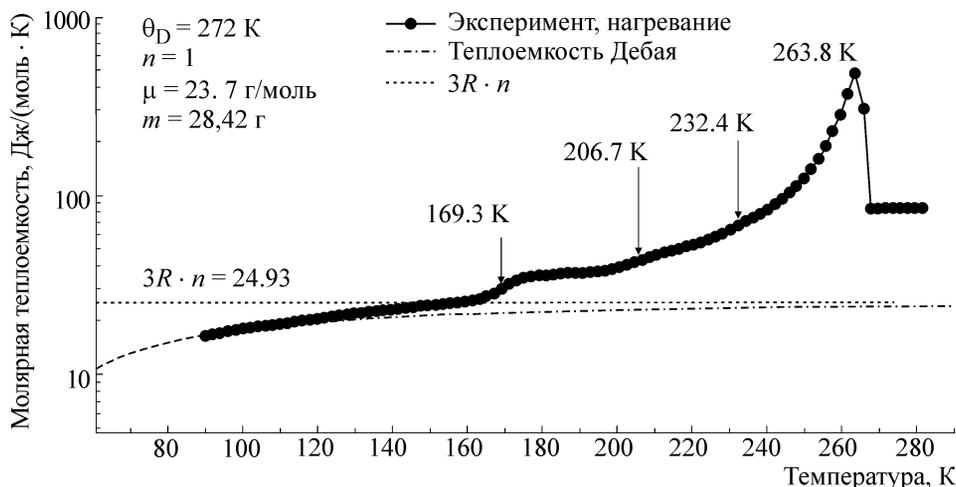


Рис. 7. Зависимость молярной теплоемкости от температуры для коммерческого криопротектора SpermFreeze.

кий процент выживаемости клеток, несмотря на увеличение области образования гетерогенных ядер кристаллизации по сравнению с водным раствором глицерина. В дальнейшем мы планируем исследовать, как меняются основные термодинамические характеристики при добавлении каждого компонента к изученному нами водному раствору глицерина для формирования криопротектора, аналогичного SpermFreeze.

Для расчета изменений таких термодинамических характеристик, как энтропии и энтальпии, из экспериментального графика вычитали величину экстраполированной теплоемкости по Дебаю. Изменения энтропии и энтальпии были рассчитаны по следующим формулам, где пределы интегрирования составляли от $T = 0$ К до $T = T_n$ (температура плавления):

$$\Delta S = \int_0^{T_n} \frac{C}{T} dT, \quad \Delta H = \int_0^{T_n} C dT. \quad (3)$$

Результаты расчетов представлены в табл. 2. Изменения энтропии и энтальпии рассчитаны в области исследуемых температур от 70 К до начала фазового перехода первого рода

(247,25 К). Данная температура получена из экстраполяции теплоемкости в жидкой фазе.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в работе был модернизирован стандартный метод измерения теплоемкости твердых тел калориметром PPMS для измерения жидких и коллоидных сред; получена зависимость теплоемкости от температуры для буферной среды, содержащей 12% глицерина; выявлено наличие четырех особенностей, связанных со структурными перестройками среды при изменении температуры. Предлагаемый в работе метод позволит понять, как меняются термодинамические характеристики сред для криоконсервации биологического материала при добавлении в них тех или иных новых компонент, изучить фазовые переходы и изменения агрегатных состояний.

В результате анализа температурных зависимостей теплоемкости двух образцов было выявлено увеличение в полтора раза изменений энтропии и энтальпии в коммерческом криопротекторе (Sperm Freeze), в состав которого кроме водного раствора глицерина входят такие компоненты, как альбумин и сахароза. Осно-

Таблица 2. Калориметрические характеристики исследуемых образцов

Параметры	Исследуемый образец	Коммерческий криопротектор SpermFreeze
ΔS , Дж/(К·моль)	$6,17 \pm 0,03$	$10,02 \pm 0,44$
ΔH , Дж/моль	1360 ± 68	$2103,56 \pm 14,54$
Температура плавления, °К	247,3	263,8
Температура стеклования, °К	168,9	169,3
Температура Дебая, °К	298	272

вываясь не только на показателях клеток, но и на термодинамических характеристиках криопротекторов, можно будет подобрать среды, способствующие лучшему выживанию клеток при криохранении.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. P. Bruder, N. Jaiswal, and S. E. Haynesworth, *Cell. Biochem.* **64** (2), 278 (1997).
2. W. F. Rall and G. M. Fahy, *Nature* **313**, 573 (1985).
3. A. M. Belous, V. I. Lugovoj, V. A. Moiseyev, et al., *Cryobiology* **27** (2), 184 (1990).
4. H. Bank and P. Mazur, *J. Cell Biol.* **57** (3), 729 (1973).
5. T. Morewood, N. Getreu, B. Fuller, et al., *CryoLett.* **38** (2), 137 (2017).
6. А. И. Жмакин, *Успехи физ. наук* **178** (3), 243 (2008).
7. B. C. Heng, M. V. Clement, and T. Cao, *Biosci. Rep.* **27** (4–5), 257 (2007).
8. B. J. Luyet and P. M. Geheunio, *Life and death of low temperatures* (Normandy, Missouri, 1940).
9. K. Shimada, in *Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Paper* (The Institute of Low Temperature Science, Hokkaido, 1978), pp. 49–69.
10. P. Mazur, *Cryobiology* **2** (4), 181 (1966).
11. L. L. Kuleshova, D. R. MacFarlane, A. O. Trounson, and J. M. Shaw, *Cryobiology* **38**, 119 (1999).
12. S. P. Libo, H. M. Picton, and R. G. Godson, in *Current Practices and Controversis in Assisted Reproduction* (World Health Organization, Geneva, 2001), pp. 152–165.
13. J. T. Anger, B. R. Gilbert, and M. Goldstein, *Urol. J.* **170** (4), 1079 (2003).
14. S. S. Courts and P. R. Swinehart, in *Advances in Cryogenic Engineering* (Springer, Boston, USA, 2000), pp. 1841–1848.
15. A. Khod'ko, *Kharkov University Bulletin, Chemical Series* **21** (44), 177 (2012).
16. J. Bachler, V. Fuentes-Landete, D. A. Jahn, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys. J.* **18** (16), 11058 (2016).
17. *Physical properties of glycerine and its solutions* (Glycerine Producers' Association, 1963); https://www.aciscience.org/docs/Physical_properties_of_glycerine_and_its_solutions.pdf.
18. G. E. Gibson and W. F. Glauque, *J. Am. Chem. Soc.* **45** (1), 93 (1923).
19. K.-I. Murata and H. Tanaka, *Nature Commun.* **4**, 2844 (2013).
20. I. Popov, G. A. Greenbaum, A. P. Sokolov, and Y. Feldman, *Phys. Chem. Chem. Phys. J.* **17** (27), 18063 (2015).
21. G. Vali, in *Biological Ice Nucleation and Its Applications*, Ed. by R. E. Lee, G. J. Warren, and L. V. Gusta (APS Press, Michigan, 1995), pp. 1–28.

Method of Adiabatic Calorimetry for Determination of Thermodynamic Characteristics of Cryoprotectants

E.Yu. Simonenko, V.V. Pryadun, A.A. Ivanova, E.V. Burmistrova,
A.N. Vasiliev, and S.A. Yakovenko

Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1/2, Moscow, 119991 Russia

The effectiveness of cryoprotectants used to protect cells from damage is usually evaluated by changes in vital cell parameters after freeze-thaw cycle. Some physical parameters such as glass transition temperature, viscosity, toxicity and the minimum concentration that is necessary for vitrification are known for some components of cryoprotectants. However, no physicochemical characteristics of the medium containing penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents can be given. In this work the method of adiabatic calorimetry adapted to the study of liquid media was used to describe the temperature dependence of the heat capacity, find the temperature for a phase change and determine changes in the states of aggregates in a glycerol-containing solution, actively used as a base component of cryoprotectants and for a commercial cryoprotectant. Changes that increase the entropy and enthalpy by 1.5-times were observed in the commercial cryoprotectant when compared to those in an aqueous solution of glycerin.

Keywords: cryoprotectant, glycerin, adiabatic calorimetry, heat capacity