

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ МАШИНОБУДУВАННЯ

---

На правах рукопису

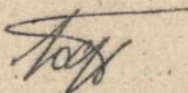
Тодрін Олександр Феліксович

ДІАГНОСТИКА ПРОЦЕСІВ ЗАМОРОЖУВАННЯ І ВІДІГРІВ  
ДРІВНОДИСПЕРСНИХ КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ

Спеціальність 05.14.05 - теоретична теплотехніка

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата технічних наук



Львів - 1997



00751026 (L)

Робота виконана в інституті  
 ліцини Національної Академії наук

Науковий керівник:

доктор технічних наук,  
 професор Братута Е.Г.

Офіційні опоненти:

доктор технічних наук,  
 професор Маляренко В.А. ;  
 кандидат технічних наук,  
 с.н.с. Голощанов В.М.

Провідна організація:

Національний науковий  
 центр "Харківський фізик-  
 ко-технічний інститут"  
 НАН України, м. Харків.

Захист відбудеться "11" вересня 1997 р. о "14" годині  
 на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 02.18.03 при Інститу-  
 ті проблем машинобудування НАН України (310046, м. Харків, вул.  
 Пожарського, 2/10).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту  
 проблем машинобудування НАН України.

Автореферат розіслано "24" липеня 1997 р.

Вчений секретар Спеціалізованої ради  
 кандидат технічних наук, с.н.с.

М.Б.Чиркін

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Для заморожування і зоєригання різних видів біологічних об'єктів у світі широко застосовується технологічне обладнання з використанням рідкого азоту.

Використання низьких температур ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) дозволяє отримати надвисокі швидкості охолодження біоб'єктів, що дає змогу істотно знизити концентрацію криопротекторів у клітинних суспензіях, а у деяких випадках і зовсім відмовитись від їх застосування. Проте до останнього часу заморожування великих об'ємів клітинних суспензій з надвисокими швидкостями охолодження вважалося неможливим. Крім того, біоб'єкти, які заморожені з надвисокими швидкостями охолодження, повинні й відігріватися з високими швидкостями. У зв'язку з цим особливе значення набуває розробка опосередкованого обладнання для надшвидких охолодження і нагріву клітинних суспензій.

Запропонована робота є одним з етапів дослідження, яке проводилося Інститутом проблем криобіології і криомедицини відповідно з координаційними планами Національної Академії наук України по бюджетних темах: ГР N 01.82.0 086.762, ГР N 01.87.0 053447; а також відповідно з програмою ГІНТ СРСР 0.69.14, завданням 02.051 і завданням 03.01.Т.

Мета роботи. На підставі проведення експериментально-теоретичних досліджень встановити найкращі доцільні режими характеристики процесів заморожування і відігріву дрібнодисперсних клітинних суспензій, а також запропонувати нову технічну реалізацію теплових процесів їх криоконсервування.

Задача дослідження. Експериментально-теоретична діагностика параметрів заморожування клітинних суспензій і модельних середовищ при розпиленні їх на охолоджену поверхню оєртовим диском і відігріву грануляції замороженого

ІНБ ім. В. Стефаника  
АН України

На підставі діагностики розробити способи і пристрої для надшвидких заморожування і відігріву клітинних суспензій.

Наукова новизна. Отримана можливість заморожувати і відігрівати еритроцити людини з надвисокими швидкостями охолодження і нагріву в будь яких кількостях, без застосування кріопротекторів, у стерильних умовах.

Визначено режими надшвидких заморожування і відігріву еритроцитів людини і гепатоцитів шурів з кріопротекторами різних концентрацій.

З метою розрахунку швидкості охолодження були отримані емпіричні залежності для визначення форми краплі, яка упала на охолоджену горизонтальну поверхню, від її кінетичної енергії, а також емпіричні залежності поверхневого натягу від температури для плазми крові людини, 10%, 20%, 30% і 40% водних розчинів гліцерину.

Отримано залежності для розрахунку дисперсності розпилу крові обертовим диском.

Практичне значення. Розроблен спосіб і створен пристрій для надшвидкого заморожування клітинних суспензій розпиленням на охолоджену поверхню (А.с. N 1122869, N 1406855, N 1597505).

Розроблено методику інженерного розрахунку параметрів теплообмінного пристрою для відігріву гранул, які заморожені.

Розроблен спосіб і створен пристрій для надшвидкого відігріву клітинних суспензій, заморожених у вигляді гранул (А.с. N 1732900).

Впровадження. Розроблені на підставі досліджень, які проведені, способи і пристрої для надшвидких заморожування клітинних суспензій розпиленням на охолоджену поверхню і відігріву гранул, які заморожені, впроваджені у відділі низько-

температурної консервації ІПКІК НАН України.

Апробація роботи. Наслідки роботи доповідались і обговорювались на II-й конференції молодих вчених ІПКІК НАН України "Холод у біології та медицині", м.Харків, 1984; на 2 Всесоюзній конференції "Механізми крипошкодження і криозахисту біологічних об'єктів", м.Харків, 1984; I-му з'їзді Українського товариства криобіології і криомедицини, м.Харків, 1985 р.

Публікації. Основи положення дисертаційної роботи викладені у 4 статтях і 4 авторських свідоцтвах.

Особиста участь пошукача в роботах, опублікованих у співавторстві, полягає у наступному:

1. Розробив методикку експерименту і технологію криоконсервування еритромаси при надвисоких швидкостях охолодження і нагріву.

3. Розробив схему реалізації процесів надвидких заморожування і відігріву еритромаси і провів експериментальне відпрацювання режимів криоконсервування.

5. Розробив пристрій для обігріву трубопроводів постачання клітинної суспензії на обертовий диск.

6. Запропонував і експериментально обґрунтував формулу для розрахунку швидкості руху дискового розпилювача.

7. Запропонував конструкцію системи постачання клітинної суспензії на обертовий диск.

Об'єм роботи. Дисертаційна робота, яка складена з вступу, 4 глав, висновків, закінчення, переліку посилань, додатку викладена на 144 сторінках машинописного тексту. Малюнків 38, таблиць 3. Перелік посилань містить 128 назв.

#### ЗМІСТ РОБОТИ

У першій главі виконано огляд відомих робіт, які опубліковано у країнах СНД, США, Великій Британії, ФРН, Японії, де

наведено дані досліджень з кріоконсервування біологічних об'єктів і факторів, впливаючих на збереження кліток, а також інформація про методи і пристрої для заморожування і відігріву біологічних об'єктів. Виконано аналіз способів надшвидкого охолодження матеріалів і можливостей надшвидкого заморожування і відігріву клітинних суспензій.

Аналіз цих робіт дозволив зробити наступні висновки.

1. Бважається можливим проводити заморожування малих об'ємів біоб'єктів без застосування кріопротекторів при надвисоких швидкостях охолодження, призводящих до отримання аморфного або дрінокристалічного (менш ніж 0,05 мкм) внутрішньоклітинного льоду. Перехід внутрішньоклітинного середовища в аморфний стан можливий при швидкостях охолодження порядку  $10^4$  К/с, що досягається при заморожуванні зразків, основний характеристичний розмір яких не перевищує 0,3 мм.

2. Застосування надвисоких швидкостей охолодження при кріоконсервуванні еритромаси може бути більш перспективним, ніж застосування повільного охолодження. При цьому клітини, які заморожені з великими швидкостями охолодження, повинні відігріватися з великими швидкостями нагріву.

3. Традиційні способи заморожування і відігріву біологічних об'єктів при конвективному теплообміні та теплообміні при кипінні кріогенних рідин не дозволяють одержати надвисоких швидкостей охолодження і нагріву. Щонайбільші швидкості охолодження досягаються при заморожуванні тонких шарів біоб'єктів на охолодженій високотеплопровідній поверхні за допомогою контактного теплообміну.

4. Відсутні відомості про дослідження, які дозволяють визначити форму краплі, яка розтікається по твердій поверхні в умовах твердіння і прогнозувати швидкість її охолодження.

У другій главі зрозуміно теоретичний аналіз параметрів заморожування клітинних суспензій розпилом на охолоджену поверхню. За основу було взято схему пристрою, в якій клітина суспензія заморожується шляхом нанесення крапель на охолоджену високотеплопровідну поверхню за допомогою обертового диска, який виконує зворотньо-поступний рух по осі циліндричного контейнера, розташованого у рідкому азоті.

Одним з основних параметрів, впливаючих на заморожування рідин при нанесенні крапель на охолоджену поверхню шляхом генерації їх за допомогою обертового диска, є діаметр отриманих крапель. Дисперсність крапель при цьому залежить від витрати рідини, її теплофізичних характеристик, діаметра і частоти обертання диска.

Відомо, що існують три режими розпилювання рідини обертовим диском. Перший і другий режими характеризуються відносно однорідними розмірами крапель, тоді як третій режим характеризується великою неоднорідністю розмірів.

Щоб отримати рівномірні швидкості охолодження необхідно проводити заморожування при однорідних розмірах крапель, тому розрахунок дисперсності, а також і експерименти проводилися при першому і другому режимах розпилю. Розрахунок дисперсності проводився за допомогою відомих рівнянь для розпилю ньютонівських рідин обертовим диском. Результати розрахунків середнього поверхнево-об'ємного діаметра краплі крові (мкм) наведені у таблиці I.

На підставі інтегрування рівняння для швидкості руху краплі в газоподібному середовищі в залежності від відстані та з урахуванням опору газу були отримані рівняння для визначення миттєвої та середньої швидкостей руху краплі в залежності від діаметра краплі, початкової швидкості та долаємої

Таблиця I

Параметри розпилювання	Частота обертання диска, об/хв			
	3000	7000	12000	19500
$D_A = 18 \text{ мм}; H = 0,8;$ $G = 0,167 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3/\text{с}$	1322	447	219	40
$D_A = 18 \text{ мм}; H = 0,2;$ $G = 0,167 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3/\text{с}$	1035	321	166	82
$D_A = 18 \text{ мм}; H = 0,2;$ $G = 0,5 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3/\text{с}$	811	245	127	34
$D_A = 25 \text{ мм}; H = 0,8;$ $G = 0,22 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3/\text{с}$	437	168	53	37

відстані. Миттєва швидкість  $v_k$  визначається із рівняння:

$$l = -\frac{2}{b_1} \left[ v_k^{1/3} - v_0^{1/3} - \sqrt{a_1} \left( \operatorname{arctg} \frac{v_k^{1/3}}{\sqrt{a_1}} - \operatorname{arctg} \frac{v_0^{1/3}}{\sqrt{a_1}} \right) \right], \quad (1)$$

$$\text{де } a_1 = 6 \left( \frac{v}{D^2} \right)^{2/3}; \quad b_1 = \frac{3 \rho_{\text{ж}} v^{1/3}}{\rho D^{4/3}}.$$

Для визначення середньої швидкості краплі отримано рівняння для визначення часу руху краплі в залежності від долаємої відстані:

$$l = \frac{a_1^{1,5}}{o} \left[ \frac{2}{\sqrt{E-1}} + 2 \operatorname{arctg} \sqrt{E-1} - \frac{2}{\sqrt{E e^{ot}-1}} - 2 \operatorname{arctg} \sqrt{E e^{ot}-1} \right], \quad (2)$$

$$\text{де } E = \frac{a_1 + v_0^{2/3}}{v^{2/3}}; \quad o = \frac{2}{3} a_1 b_1.$$

Визначивши час  $t$  руху краплі із рівняння (2) і знаючи відстань  $l$ , яку вона долає за цей час, знаходимо середню швидкість краплі.

Виходячи з середньої швидкості руху краплі на підставі відомих рівнянь нестационарної теплопровідності при г.у. 3-го роду визначено температурне поле і середня температура краплі у мить потрапляння на поверхню контейнера, а також була визначена ступінь твердіння краплі, яка рухається в охолодженому

газі. Крім того, розраховано температуру поверхні диска, що обертається в охолодженій атмосфері контейнера.

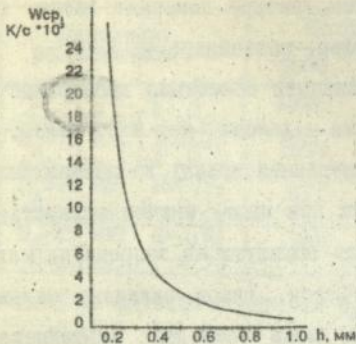
Все це дало можливість визначити обмеження дисперсності розпилю, швидкості руху краплі та відстані, яку вона долає, з метою запобігання можливості осмерзання краплі до потрапляння на поверхню контейнера, оскільки при цьому значно знижується її швидкість охолодження, що може вплинути на збереження клітинних суспензій, які заморожуються. Також виявлено максимально можливий час находження диска всередині контейнера, обмежений можливістю намерзання рідини на поверхні диска.

На підставі наближеного аналітичного методу вирішення спряженої задачі Стефана для кінцевого об'єму, заснованого на можливості введення ортогональної криволінійної системи координат, погодженої з формою досліджуемого об'єкту, розраховані миттєва і середня швидкості охолодження краплі на поверхні контейнера в залежності від висоти краплі та положення межі поділу фаз. При цьому вважалось, що крапля має форму зрізаного еліпсоїда обертання. Середня швидкість охолодження знаходиться за допомогою рівнянь, одне з яких дозволяє визначити середню температуру краплі, а інше - час досягнення цієї температури:

$$\theta_{\text{сер.}} = \frac{T_{\text{сер.}} - T_w}{T_f - T_w} = \frac{(1+L) \ln(1+L) + (1-L) \ln(1-L)}{L \ln \left[ \frac{(1+L)}{(1-L)} \right]}, \quad (3)$$

$$\rho_{0_f} = \frac{\Delta H}{(T_f - T_w)} \left[ L \left( 1 - \frac{L^2}{3} \right) \ln \frac{1+L}{1-L} + \frac{2}{3} \ln(1-L^2) - \frac{L^2}{3} \right]. \quad (4)$$

Середня швидкість розраховувалась у мить досягнення межею поділу фаз верхівки краплі. Залежність середньої швидкості охолодження краплі від її висоти показана на мал. 1.



Мал.1 - Залежність середньої швидкості охолодження краплі від висоти краплі

Розроблено методику розрахунку параметрів розмірочувача клітинних суспензій, які заморожені у вигляді гранул, головним елементом якого є обертовий теплообмінний стакан, маючий форму перевернутого зрізаного конуса. На підставі рівноваги сил (відцентрова сила і сила тяжіння, силою тертя нех-

туємо), діючих на гранулу на поверхні теплообмінного стакану при заданому куті  $\alpha$  нахилу образуючої конуса, визначаємо радіус нижньої (меншої) основи стакану:

$$r_0 = g \operatorname{ctg} \alpha / \omega^2 \quad (5)$$

Далі, з урахуванням швидкості плавлення гранули і швидкості її руху по радіусу конуса, знаходимо радіус  $r$  верхньої основи стакану, спочатку завдаючись висотою гранули  $h$ :

$$\frac{2}{3} h^{3/4} = \frac{D}{U_1} \cos^{1/4} \alpha \left[ 2\sqrt{x} + \frac{\sqrt{a}}{2} \ln \left| \frac{\sqrt{x} - \sqrt{a}}{\sqrt{x} + \sqrt{a}} \right| + \sqrt{a} \operatorname{arctg} \sqrt{\frac{a}{x}} - 2\sqrt{x_0} - \frac{\sqrt{a}}{2} \ln \left| \frac{\sqrt{x_0} - \sqrt{a}}{\sqrt{x_0} + \sqrt{a}} \right| - \sqrt{a} \operatorname{arctg} \sqrt{\frac{a}{x_0}} \right] \quad (6)$$

Маючи значення  $r_0$ ,  $r$  і  $\alpha$ , знаходимо висоту теплообмінного стакану:

$$H_0 = (r - r_0) \operatorname{ctg} \alpha \quad (7)$$

Після аналізу результатів розрахунків були обрані наступні параметри теплообмінного стакану, який має форму зрізаного перевернутого конуса: кут нахилу образуючої, діаметри

меншої та більшої основ, висота, частота обертання, температура поверхні, матеріал стакану.

В третій главі наведено результати експериментальних досліджень.

Оскільки для проведення розрахунків необхідно знати поверхневий натяг таких рідин, як плазма крові людини і водні розчини гліцерину в залежності від температури, нами були розроблені методика і пристрій, які дозволяють визначати поверхневий натяг в залежності від температури. Поверхневий натяг визначався по розмірам лежачої краплі з використанням модифікованих таблиць Ваннфорта-Адамса. Експерименти, проведені на відстиглованій воді, показали, що похибка методу не перевершує  $\pm 2,4\%$ . Були отримані значення поверхневого натягу плазми крові людини, 10%, 20%, 30% і 40% водних розчинів гліцерину та кореляційні рівняння для розрахунку значень поверхневого натягу  $\sigma$  в залежності від температури для цих рідин, які мають вигляд:

$$\sigma = -A \cdot T + B. \quad (8)$$

У таблиці 2 наведено значення коефіцієнтів А і В для розрахунку поверхневого натягу досліджених рідин.

Таблиця 2

Рідина	Коефіцієнти	
	$A \times 10^{-4}, \text{Н}/(\text{м} \cdot \text{К})$	$B \times 10^{-2}, \text{Н}/\text{м}$
Плазма крові людини	3,299	18,323
10% водний розчин гліцерину	0,46	8,38
20% водний розчин гліцерину	0,63	8,785
30% водний розчин гліцерину	0,52	8,373
40% водний розчин гліцерину	0,49	8,147

Оскільки відомі рівняння для визначення дисперсності розпилу рідин обертаним диском є емпіричними і отримані для ньютонівських рідин, а кров є неньютонівською рідиною, то

необхідно визначити можливість застосування цих рівнянь для розрахунку дисперсності розпилу крові. Були проведені експерименти по розпилу крові, в яких краплі потрапляли на горизонтально встановлене скло з нанесеним на нього тонким шаром трансформаторного масла і під мікроскопом проводилося обмірвання їх діаметру. Результати експериментального визначення середнього поверхнево-об'ємного діаметра краплі крові (мкм) при різних режимах розпилювання наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Параметри розпилювання	Частота обертання диска, об/хв			
	3000	7000	12000	19500
$D_d = 18 \text{ мм}; H = 0,8;$ $G = 0,167 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3/\text{с}$	$1132 \pm 27$	$406 \pm 12$	$202 \pm 13$	$49 \pm 9$
$D_d = 18 \text{ мм}; H = 0,2;$ $G = 0,167 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3/\text{с}$	$874 \pm 21$	$277 \pm 14$	$148 \pm 11$	$89 \pm 10$
$D_d = 18 \text{ мм}; H = 0,2;$ $G = 0,5 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3/\text{с}$	$722 \pm 19$	$228 \pm 12$	$112 \pm 10$	$39 \pm 7$
$D_d = 25 \text{ мм}; H = 0,8;$ $G = 0,22 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3/\text{с}$	$428 \pm 17$	$154 \pm 11$	$59 \pm 9$	$43 \pm 8$

Встановлено, що відомі залежності для визначення дисперсності розпилу рідин обертовим диском при першому режимі розпилювання завищують результати, а при другому режимі - занижують і дають похибку  $\pm 18,3\%$  для крові. Проведні експерименти по обміру діаметрів крапель дозволили отримати рівняння для розрахунку дисперсності при розпиленні обертовим диском такої неньютонівської рідини, як кров.

Для розрахунку дисперсності при першому режимі розпилення отримано рівняння:

$$D = 59 \frac{\sigma^{0,46} G^{0,153} \mu^{0,233}}{\rho^{0,693} (\omega R)^{1,306}} \left(\frac{\mu}{\sigma}\right)^{0,27} \text{Lp}^{0,17} \quad (9)$$

Для другого режиму розпилення пропонується рівняння:

$$D = 1,23 \left[ \frac{\mu \sigma}{\rho \omega^3 R^{2,5}} \right]^{2/7} \text{Re}_{\text{пл}}^{0,124} \quad (10)$$

Залежності (9) і (10) дають похибку, яка не перевищує  $\pm 6,7\%$  і можуть бути використані для розрахунку дисперсності розпилення крові людини обертовим диском при слідуючих параметрах розпилу: витрата рідини  $Q = (0,1 - 0,5) \cdot 10^{-6} \text{ м}^3/\text{с}$ , діаметр диска  $D_d = 18 - 35 \text{ мм}$ .

При розрахунках швидкості охолодження краплі на поверхні контейнера необхідно знати форму, яку приймає крапля після потрапляння на поверхню. Для вирішення цієї задачі були розроблені методика експерименту і спеціальний пристрій, дозволяючий генерувати краплі різних розмірів (1,8 - 4 мм), падаючих з різною швидкістю на горизонтальну підкладку, охолоджену до  $-165 - -190^\circ\text{C}$ . Підкладки були виготовлені з різних металів. Температура газу в камері пристрою (камера була заповнена газоподібним азотом для запобігання конденсації атмосферної вологи на поверхні підкладки) була на  $1 - 3^\circ\text{C}$  вище за температуру плавлення досліджуємої рідини. При дослідженні використовувалися дистильована вода, 10% і 30% водні розчини гліцерину. Після падіння краплі на підкладку здійснювалося її фотографування. У наслідок обміру меридіонального перерізу були отримані дані по висоті краплі, діаметру плями контакту краплі з підкладкою, площі та периметру перерізу краплі. Оскільки лежача крапля має вигляд еліпсоїду, отриманого шляхом обертання урізаного еліпса відносно вертикальної осі, то визначенню підлягають півосі еліпса. Була визначена слідуюча система рівнянь, яка дозволяє знайти форму краплі в залежності від її кінетичної енергії та властивостей рідини:

$$\frac{D}{h} = 0,07740 We + \frac{3604690}{P} + 1, \quad (11)$$

$$\frac{D}{d} = \frac{0,989311}{\exp(0,016801We) We^{0,09724}} \cdot \quad (12)$$

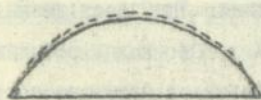
$$\frac{D}{a} = \frac{2}{\exp(0,0380721We + 92455/\hat{P})}, \quad (13)$$

$$\left. \begin{aligned} b &= h \sqrt{1 - \frac{1}{2a} \sqrt{4a^2 - d^2}}, \quad We > 4,4 \\ b &= h \sqrt{1 + \frac{1}{2a} \sqrt{4a^2 - d^2}}, \quad We \leq 4,4 \end{aligned} \right\} \quad (14)$$

Середньоквадратична похибка залежностей (11) - (14) не перевершує  $\pm 7,3\%$ .

Як бачимо з отриманих рівнянь, форма краплі не залежить від теплофізичних властивостей матеріалу підкладки, а залежить тільки від швидкості руху, діаметра краплі та властивостей рідини при даній температурі, що повністю збігається з даними Madejsky J. (1983 р.).

На мал.2 наведено описи крапель, отримані експериментально і розраховані за допомогою рівнянь (11) - (14).



a



b

— — експеримент  
 - - - розрахунок  
 a - D=2,3мм, We=9,36  
 b - D=2,24мм, We=1,47  
 Мал.2. Порівняння розрахованого та експериментального перерізів краплі

Проведено експерименти для визначення розподілу температури газу в охолоджуемому контейнері при знаходженні в ньому обертового диска і різних режимах розпилу рідини.

Спочатку проводилися експерименти по визначенню впливу підсосу теплого повітря в контейнер внаслідок обертавання в ньому розпилюючого диска. Диск оуло розташовано в середній частині відкритого контейнера. В результаті експериментів оуло встановлено,

що через 30 с. після початку обертавання диска в контейнері

температура газу над ним піднялась від  $-196^{\circ}\text{C}$  до  $-70^{\circ}\text{C}$ , а під ним - до  $-122^{\circ}\text{C}$ . По мірі охолодження розпилюючої системи температура газу знижувалася і через 130 с. роботи знизилася на  $10^{\circ}\text{C}$ . Перепад температури над і під диском був у межах  $50 - 52^{\circ}\text{C}$ .

Після цього були проведені експерименти при тих же умовах, але в повністю замкненому контейнері та з заздалегідь охолодженою системою розпилу. В цьому випадку не спостерігалося будь-якого змінення температури. Це показує, що на температуру газу в контейнері основний вплив має підсос теплого повітря з атмосфери, а тепло, що виділяється при терті в системі "диск-газ" встигає відводитись до рідкого азоту.

Далі були проведені експерименти при обертанні та зворотньо-поступному русі диска, але без розпилу рідини. Перепад температур над і під диском склав  $35 - 45^{\circ}\text{C}$ , а по висоті контейнера (при вимірюванні її тільки над чи під диском) -  $15 - 17^{\circ}\text{C}$ .

Останньою серією експериментів були експерименти з розпилом рідини. В експериментах варіювалися витрата рідини і потужність нагрівача, встановленого на трубопроводі подачі рідини до обертового диска. Потужність нагрівача не перевищувала 20 Вт. Експерименти показали, що змінювання потужності нагрівача при одній і тій же витраті рідини слабо впливає на змінювання температури газу в контейнері. Значно більший вплив справляє змінювання витрати рідини.

Таким чином, для зниження температури газу в контейнері необхідно зменшити підсос теплого повітря або зменшити час перебування розпилюючої системи всередині контейнера.

У четвертій главі описано технологію для заморожування і нагріву клітинних суспензій і наведено схеми її реалізації, а

також відображено результати експериментів по заморожуванню-нагріву еритроцитів людини і гепатоцитів щура.

У відповідності з проведеними дослідженнями була розроблена нова технологія заморожування клітинних суспензій. Вона полягає в тому, що в циліндричний контейнер, встановлений вертикально в ємкості з рідким азотом, вводиться обертовий диск, здійснючий зворотно- поступний рух вздовж осі контейнера. На обертовий диск під час його руху догори подається рідина (суспензія клітин), котра під впливом відцентрової сили розпорошується на краплі. Краплі, потрапляючи на поверхню контейнера, замерзають. Потім вони скидуються з поверхні контейнера і потрапляють у спеціальний збірник, а процес розпилювання повторюється. Необхідно відмітити, що для запобігання попадання крапель одна на одну на поверхні контейнера диск повинен рухатися зі швидкістю, яка відповідає наступній нерівності:

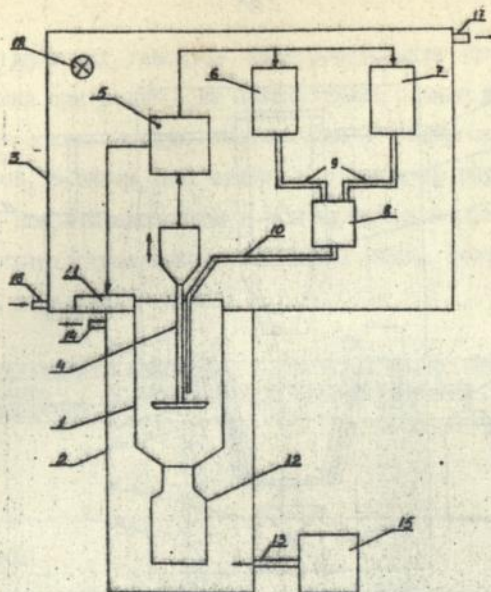
$$v > \frac{3 g d_{\max}}{2 \pi D_{\kappa} D^3}, \quad (15)$$

де  $d_{\max}$  - максимальний діаметр краплі на поверхні контейнера, який відповідає діаметру плями контакту при  $We > 4,4$  або великій осі еліпса при  $We \leq 4,4$ .

Згідно цьому процесу був розроблен і виготовлен пристрій для заморожування клітинних суспензій розпилком на охолоджену поверхню. Схема реалізації цього процесу наведена на мал.3.

Оскільки біологічні об'єкти, які заморожені з надвисокими швидкостями охолодження, повинні й відігріватися зі швидкостями того ж порядку, нами була запропонована технологія, яка дозволяє розморозувати з надвисокими швидкостями нагріву клітинні суспензії, що заморожені у вигляді гранул.

Сушність запропонованого процесу полягає в тому, що ві-

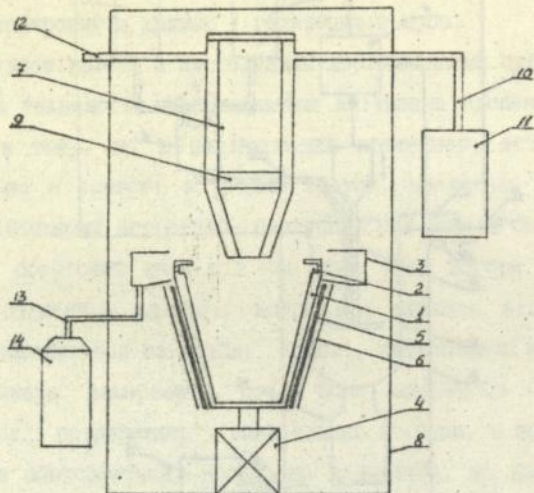


Мал.3. Схема реалізації процесу заморожування клітинних суспензій.

1- контейнер; 2- емкість з рідким азотом; 3- корпус; 4- розпилювач; 5- преривач; 6,7- дозатори; 8- змішувач; 9,10,13, 14- трубопроводи; 11- пристрій для зйому гранул; 12- гранулозбірник; 15- система подавання холодоагенту; 16,17- патрубки; 18- джерело УФ випромінювання.

дiгрiвається не весь об'єм замороженого матерiалу одноразово, а кожна гранула окремо. Для цього гранули дрибними порцiями висипаються в обертовий нагрiвуваний теплообмiнний стакан, мавчий форму зрiзаного перевернутого конуса. Потрапляючи на поверхню цього стакана, гранула притискується до його стiнки вiдцентровою силою, рухається по нiй догори i плавиться. Розморожений матерiал пiд впливом вiдцентрової сили усувається з поверхнi стакана. Згiдно цьому способу i на пiдставi проведеного розрахунку нами був розроблен i виготовлен пристрiй для розморожування гранул на теплiй поверхнi пiд дiєю вiдцентрової сили. Схема реалiзацiї цього процесу наведена на мал.4.

Для вiдпрацювання режимiв заморожування- вiдгриву були



Мал.4. Схема реалізації процесу розморожування гранул. 1- теплообмінний стакан; 2- канавка; 3- збірник; 4- електродвигун; 5- нагрівач; 6- відсисач; 7- оункер; 8- корпус; 9- система подавання гранул; 10,12,13- трубопроводи; 11- система подавання холодоагента; 14- емкість для розмороженого матеріалу.

обрані еритроцити людини і гепатоцити щура, які можливо отримати у неохідній кількості.

У всіх проведених експериментах параметри відігріву залишалися постійними: витрата гранул -  $0,3 \text{ см}^3/\text{с}$ ; частота обертання теплообмінного стакана - 500 об/хв; температура поверхні теплообмінного стакана -  $40^\circ\text{C}$ .

Варіювання швидкостей охолодження здійснювалося зміненням розміру краплі та швидкості її руху в мить потрапляння на поверхню контейнера. Це досягалося шляхом змінення частоти обертання розпилюючого диска, діаметрів диска і контейнера і витрати рідини, що розпилюється. Цілісність клітин визнача-

лась по відносному гемолізу спектрометричним способом. Для заморожування еритроцитів як позаклітинні рідини застосовувались плазма крові людини, ізотонічний і гіпертонічний водні розчини NaCl, а також їхні суміші з різними криопротекторами: сахарозою, поліетиленоксидом з молекулярною масою 1500 (ПЕО-1500), полівінілпіролідом м.м. 12500 (ПВП). Результати експериментів наведено у таблиці 4.

Таблиця 4

Зовнішньоклітинне середовище	Показник гематокриту, %	Середня швидкість охолодження, К/с	Гемоліз, %
Еритроконцентрат	82	5500	41,5 ± 3
Плазма	20	2600	52,5 ± 4
	20	5700	28,5 ± 3
	40	5600	29,7 ± 2,1
	20	10700	43,2 ± 4,3
	20	115000	70 ± 7
0,9% NaCl	20	2800	47,4 ± 3,7
	20	6400	29,2 ± 1,7
	20	10250	43,2 ± 3,6
	20	112000	81,7 ± 5,3
1,2% NaCl	20	18000	24 ± 2
3:2 0,9% NaCl: 1,5М сахарози	20	25800	11 ± 1,2
3:2 0,9% NaCl: 1,5М сахарози	20	9500	16,5 ± 2,5
10% ПЕО-1500	30	8500	25 ± 2
15% ПЕО-1500	30	14500	17,3 ± 1,7
30% ПЕО-1500	30	16000	3 ± 1
10% ПВП	30	8400	14,3 ± 1,8

Як бачимо з результатів експериментів, ми отримали максимум цілості еритроцитів, заморожених без криопротектора, при швидкостях охолодження на рівні 6000 К/с.

Що стосується еритроцитів заморожених з криопротектором, то можна побачити, що максимальний захисний вплив на клітини при надвисоких швидкостях охолодження виявляє ПЕО-1500 з початковою концентрацією 30%. При цьому треба зауважити, що при наведених швидкостях охолодження ПВП з початковою концентрацією 10% виявився більш ефективним, ніж 10% розчин ПЕО-1500.

Експерименти по заморожуванню-відігріву гепатоцитів

проводилися на ізольованих гепатоцитах щурів. Швидкість охолодження змінювалася тим же чином, що і в експериментах з еритроцитами. Оцінку життєздатності клітин проводили з використанням методу інкувації клітин у флуорисцеїндацетаті, трипановому синьому і по прилипанню клітин у культурі з наступним підрахунком кількості клітин. Заморожування гепатоцитів проводилось у присутності водних розчинів 1,2-пропандіола кінцевою концентрацією 15% з 2,5% сахарози.

#### Результати експериментів.

1. При заморожуванні гепатоцитів зі швидкістю охолодження 11500 К/с зберіглося  $10 \pm 2\%$  клітин не профарбованих трипановим синім, утримуваних флуоресцінін і прилиплених до підкладки.

2. Збільшення швидкості охолодження у 6,5 разів (71000 К/с) приводило до збільшення цілісності клітин після заморожування-відігріву. Кількість життєздатних клітин досягала  $50 \pm 4\%$ .

3. Послідовне збільшення швидкості охолодження до 122000 К/с приводило до зменшення цілісності клітин. Кількість життєздатних клітин не перевищувала 7%.

#### Висновки.

1. Розрахунковим шляхом визначено параметри розпику клітинних суспензій обертовим диском: середній поверхнево-об'ємний діаметр краплі, швидкість руху і температура краплі у мить потрапляння на поверхню контейнера.

2. На підставі проведених експериментів отримані рівняння для розрахунку дисперсності розпику обертовим диском такої ньютонівської рідини, як кров.

3. Розраховано локальна і середня швидкості охолодження

краплі на поверхні контейнера в залежності від товщини краплі та положення межі поділу фаз.

4. З метою розрахунку швидкості охолодження були отримані емпіричні залежності для визначення форми краплі, яка упала на охолоджену горизонтальну поверхню, від її кінетичної енергії, а також емпіричні залежності поверхневого натягу від температури для плазми крові людини, 10%, 20%, 30% і 40% водних розчинів гліцерину.

5. Досліджено розподіл температури газу в охолоджену циліндричному контейнері при знаходженні в ньому обертового диска і різних режимах розпилу рідини. Показано, що для запобігання підвищення температури газу в контейнері вище температури розкльовання води необхідно обмежити час знаходження в ньому системи, яка розпилює.

6. Розроблено методику інженерного розрахунку параметрів теплообмінного пристрою для розморожування клітинних суспензій, які заморожені у вигляді гранул.

7. На підставі проведення експериментально-теоретичної діагностики параметрів, впливаючих на заморожування і відігрів дрібнодисперсних клітинних суспензій розроблено технологію для надшвидкого заморожування клітинних суспензій шляхом розпилу їх за допомогою обертового диска на охолоджену поверхню і для надшвидкого відігріву клітинних суспензій, які заморожені у вигляді гранул, а також схеми реалізації цих процесів.

8. Отримана можливість заморожувати і відігрівати еритроцити людини з надвисокими швидкостями охолодження і нагріву без застосування кріопротекторів у будь яких кількостях у стерильних умовах.

9. Експериментально відпрацьована технологія надшвидких

заморожування і відігріву еритроцитів людини і гепатоцитів щура з різними концентраціями криопротекторів.

Позначення:  $\alpha_f$  - температуропровідність льоду;  $a, b$  - пів-осі еліпса;  $c\rho_f$  - теплоємність льоду;  $D$  - діаметр краплі;  $D_k$  - діаметр контейнера;  $d$  - діаметр плями контакту;  $G$  - об'ємна витрата рідини;  $g$  - прискорення вільного падіння;  $h$  - висота краплі;  $\Delta h$  - прихована теплота плавлення;  $L$  - відношення координати фронту твердіння до висоти краплі;  $l$  - відстань, яку долає краплею;  $P$  - атмосферний тиск;  $R$  - радіус диска;  $T$  - температура;  $T_f$  - температура плавлення;  $T_w$  - температура стінки;  $v_0 = 0,5\omega_d$  - початкова швидкість краплі;  $v_k$  - кінцева швидкість краплі;  $\mu$  - динамічна в'язкість;  $\nu$  - кінематична в'язкість;  $\rho$  - щільність;  $\sigma$  - поверхневий натяг;  $\omega$  - кутова швидкість обертання;  $P_1 = 4G/D$  - тиск Лапласа;  $\tilde{P} = P_1/P$  - відносний тиск Лапласа;  $We = \frac{\rho v_k^2 D}{\sigma}$  - критерій Вебера;  $Fo = \frac{4 \alpha_f t}{D^2}$  - число Фур'є;  $\beta = \frac{1}{\omega} \left[ \frac{\sigma}{2 R \rho} \right]^{0,5}$  - радіус кільця на крайці диска;  $Lp = 600/\mu^2$  - критерій Лапласа;  $Re_{пл} = 600/\mu$  - критерій Рейнольдса для плівки;  $\delta = \left( \frac{3\mu G}{2\pi\omega^2 R^2} \right)^{0,333}$  - товщина шару рідини на диску;  $U = 1,23\omega R$  - швидкість руху шару рідини у мить зриву з диска;  $A_1 = g/\omega^2$ ;  $B = \sigma t g \alpha$ ;  $C_1 = \omega \sin \alpha$ ;  $D = \frac{\rho}{\rho_a} \left[ \frac{2}{3} \frac{a^3}{\mu R^2} - Pe^3 (Ph) \rho_a \omega^2 \right]^{0,25}$ ;  $Pe(Ph) = 3Ph / (3 + Ph^{5/6})$ ;  $Ph = \frac{[T_w - T_f] \rho_p}{\Delta h}$ ;  $x = \sqrt{A_1 + B/V}$ ;  $x_0 = \sqrt{C_0 + A_1/V}$ ,  $a^2 = \frac{A_1(1+B^2)}{B}$  (до формули (6)).

Матеріали дисертації опубліковано у наступних роботах.

1. Пушкарь Н.С., Тодрин А.Ф. Криоконсервирование эритроцитов, замороженных без криопротектора. // Доклады НАН Украины - 1995, N 9 - с. 126-128.

2. Тодрин А.Ф. О форме капли, замороженной на твердой поверхности. // Проблемы криобиологии. - 1995, N2. - с. 26-29.

3. Пушкарь Н.С., Тодрин А.Ф. Исследование сверхбыстрого замораживания и отогрева эритроцитовой массы // Проблемы криобиологии - 1996 - N 3 - с. 22-26.

4. Тодрин А.Ф. Об измерении поверхностного натяжения

водных растворов глицерина и плазмы крови// Моделирование криобиологических процессов.- Харьков: Ин-т проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, 1988.- С.142- 145.

5. А.с. N 1122869 МКИ F 25 D 3/10. Способ замораживания жидких биологических объектов и устройство для его осуществления / Герашенко О.А., Грищенко Т.Г., Печеный М.Л., Рудько Ю.М., Тодрин А.Ф. (СССР)- N 3549881: Заявлено 7.02.1983: Опубл. 7.11.84. Бюл. N41.

6. А.с. N 1406855 МКИ F 25 D 3/10. Способ замораживания эритромаcсы / Печеный М.Л., Рудько Ю.М., Тодрин А.Ф. (СССР)- N 4088039: Заявлено 9.07.1986: ДСП.

7. А.с. N 1597505 МКИ F 25 D 3/10. Устройство для замораживания эритромаcсы / Тодрин А.Ф., Рудько Ю.М., Космодемьянский Ю.В. (СССР)- N 4607258: Заявлено 21.11.88.: Опубл. 7.10.90. Бюл. N 37.

8. А.с. N 1732900 МКИ А 01 N 1/00 Способ размораживания клеточных суспензий и устройство для его осуществления / Тодрин А.Ф. (СССР)- N 4699476: Заявлено 31.05.89.: Опубл. 15.05.92. Бюл. N 18.

Тодрин А.Ф. "Диагностика процессов замораживания и отогрева мелкодисперсных клеточных суспензий". Диссертация является рукописью, представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 05.14.05 - теоретическая теплотехника ИПМаш НАН Украины, г.Харьков, 1997 г.

Представлены результаты экспериментально- теоретической диагностики параметров, влияющих на замораживание клеточных суспензий при напылении их на охлажденную высокотеплопроводную поверхность с помощью вращающегося диска, а также на отогрев замороженных гранул на высокотеплопроводной поверхности. Описаны способы и устройства для сверхбыстрого замораживания и отогрева клеточных суспензий. Представлены результаты экспериментов по замораживанию и отогреву эритроцитов и гепатоцитов с различными концентрациями криопротекторов и без них.

Todrin A.F. "Diagnostics of freezing and thawing processes of fine dispersive cell suspensions". Manuscript of thesis for obtaining scientific degree of the candidate of technical science on the speciality of 05.14.05 - theoretical thermotechnics of Institute for Problems of Machinebuilding of National Academy of Science of the Ukraine, Kharkov, 1997.

AB 38.352

The results of experiments on the influence of various parameters, which influence the process of cell preservation under its spraying on a high-thermoconducting surface using rotatable disk and thawing of freezing granules on the high-thermoconducting surface are presented. The methods and equipment for the ultrarapid freezing and thawing of cell suspensions are described. The experimental data on the freezing and thawing of erythrocytes and hepatocytes with or without cryoprotectants of several concentrations are presented.

Ключові слова: діагностика, теплообмін, заморожування, відігрів, клітинна суспензія, обертовий диск, розпилення, дисперсність, крапля, високотеплопровідна поверхня.



Відповідальний за випуск – доктор біол. наук Е.О.Гордієнко

Підписано до друку 15.07.97. Умовн.-друк. арк. 1. Зам. 41-97  
Тираж 100 екз. Ротапринт ФТІНТ НАН України, м. Харків.

Безкоштовно