

УДК 576.7:57.086.13

В.В. ЧИЖЕВСКИЙ*, М.И. ГРОШЕВОЙ, О.С. ПРОКОПЮК

Особенности использования низкотемпературного хранилища для долгосрочного хранения биологического материала в парах жидкого азота

UDC 576.7:57.086.13

V.V. CHIZHEVSKY*, M.I. GROSHEVOJ, O.S. PROKOPYUK

Peculiarities of Using the Low Temperature Tank for Long-Term Storage of Biological Material in Liquid Nitrogen Vapours

Исследована возможность использования парового криогенного хранилища для долгосрочного хранения биологического материала в условиях низкотемпературного банка ИПКиК НАН Украины. Разработаны методические подходы полноценного хранения биообъектов при проведении технологических операций в парах жидкого азота.

Ключевые слова: низкотемпературное хранилище, пары жидкого азота, криопробирки, температура.

Досліджена можливість використання парового криогенного сховища для довгострокового зберігання біологічного матеріалу в умовах низкотемпературного банку ІПКіК НАН України. Розроблено методичні підходи повноцінного збереження біологічних об'єктів при проведенні технологічних операцій в парах рідкого азоту.

Ключові слова: низкотемпературне сховище, пари рідкого азоту, криопробірки, температура.

There was studied the possibility of vapour cryogenic tank use for biological material long-term storage under low temperature bank conditions at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. Methodical approaches for bioobject integral storage when performing technological operations in liquid nitrogen vapours have been elaborated.

Key-words: low temperature tank, liquid nitrogen vapours, cryovials, temperature.

С целью оптимизации условий хранения криоконсервированных биоматериалов и разработки методологических принципов работы низкотемпературного банка (НТБ) была исследована возможность хранения биологических образцов в парах жидкого азота в условиях НТБ Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Значительная часть биологического материала низкотемпературного банка хранится в криопробирках. Некоторые образцы подобного вида криогенной тары вследствие недостаточной герметизации подвержены натеканию внутрь жидкого азота. Данное обстоятельство приводит к крайне нежелательному для биологических образцов перепаду давления внутри пробирок в результате проведения технологических операций, когда азот, нагреваясь, из жидкой фазы переходит в парообразное состояние. Кроме того, резкое испарение азота может вызывать выброс микрочастиц содержимого криопробирок.

Следует отметить, что при низкотемпературном хранении биологического материала существует значительный риск контаминации образцов вирусами через среду жидкого азота [1]. Большин-

In order to optimise storage conditions for cryopreserved biomaterial and to design methodological principles for low temperature bank (LTB) activity there was studied the possibility of biological material storage in liquid nitrogen vapours under LTB conditions of Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. Significant part of biological material of low temperature bank is stored in cryovials. Some samples of this kind of cryogenic containers due to an insufficient sealing are subjected to a liquid nitrogen inleakage. This circumstance results in an extremely undesirable pressure differential inside of vials during some technological operation performance, when nitrogen passes from a liquid phase to a vapour state under heating. In addition a sharp nitrogen evaporation may cause a microparticle emission of cryovial content.

Of note is the fact that under low temperature storage of biological material there is a significant risk of viral contamination of sample via liquid nitrogen medium [1]. The majority of viruses preserves its structure and functions under low temperature conditions. Therefore a liquid nitrogen may be a potential source of biological material contamination.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-59-53, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 5953, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ство вирусов в условиях низких температур сохраняют свою структуру и функции. Поэтому жидкий азот может являться потенциальным источником заражения биологического материала [1].

Возможное решение данных проблем – хранение биологических образцов в парах жидкого азота. Однако при использовании паровых хранилищ возникают некоторые вопросы, связанные с тем, что теплоёмкость и теплопроводность парового хранилища намного меньше, чем хранилища, заполненного жидким азотом. Это обуславливает инерционность тепловых процессов в паровом хранилище и, как следствие, может приводить во время технологических операций к опасному повышению температуры биологических образцов. Поэтому при использовании парового хранилища важно учитывать время на закладку/ извлечение биообразцов из хранилища, количество загружаемого материала и т.д.

На основании указанных фактов была определена необходимость исследований влияния тепла, которое поступает при технологических работах в НТБ, на температурное поле внутри хранилища биопродуктов ХБ-0,5 (Россия) при малых уровнях его заполнения жидким азотом.

Цель работы – исследование возможности использования хранилища ХБ-0,5 в качестве парового, а также разработка методических подходов безопасного и полноценного хранения биообъектов при проведении технологических операций (закладка, извлечение, сортировка и т.п.) в парах жидкого азота.

Материалы и методы

В эксперименте использовали заполненные средой для замораживания криопробирки объемом 2 мл (Corning) в количестве 20 единиц. Контрольную ампулу со средой замораживания и расположенным внутри нее измерительным спаем термпары помещали на высоте 25 и 60 см отдельно или между другими ампулами стандартных алюминиевых стаканов/укладок (h=55 и 65 см), которые находятся в низкотемпературном паровом хранилище ХБ-0,5.

Температуру измеряли термометром сопротивления медным ТСМ6 (градуировка М100) и дифференциальной термпарой типа медь-константан (МК), один спай которой находился при температуре 0°C. Для определения абсолютной величины сопротивления, а также величины ЭДС рабочей термпары МК был использован вольтметр универсальный В7-21А.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе работы для определения характера стационарного температурного поля в паровом хранилище мы провели теплофизические

This problem may be solved if storing the biological samples in liquid nitrogen vapours. However when using vapour tank some questions arise, associated to much lower heat capacity and conduction in vapour tank if compared with liquid nitrogen one. This stipulates the persistence of heat processes in a vapour tank and may cause a dangerous temperature increase in biological samples during technological operation performance. Therefore when using vapour tank of importance is to consider the time for biological sample placing/removal from tank, the amount of placed material etc.

Owing to the mentioned facts the necessity in studying the heat effect, coming during technological operations in LTB, onto a temperature field inside of KhB-0.5 tank for biological products (Russia) under low levels of liquid nitrogen filling was determined.

Research was aimed to investigate the possible ways for KhB-0.5 tank usage as a vapour one, as well as to elaborate the methodical approaches for safe and integral bioobject storage during technological operation performance (placing, removal, sorting etc.) in liquid nitrogen vapours.

Materials and methods

Twenty Corning cryovials (2 ml) filled with freezing medium have been used in the experiment. Control ampoule with freezing medium and measuring thermocouple junction fixed inside was placed either separately or between other vials of the standard aluminium containers/case-rack (h=55 and 65 cm), being in KhB-0.5 low temperature vapour tank.

Temperature was measured with CRT6 copper resistance thermometer (M100 grade) and differentiated thermocouple of copper-constantan (CC) type, which one junction was at 0°C. In order to determine the resistance absolute value, as well as the EMF value of CC operative thermocouple we used B7-21A universal voltmeter.

Results and discussion

At an initial work stage we have carried-out the thermophysical trials of temperature distribution in KhB-0.5 tank at a 10-cm level of nitrogen filling to determine the fixed temperature field character in a vapour tank. The trial device scheme is shown in the Fig. 1.

The experimental data indicate the fact, that in stationary state the temperature in tank volume changes from –130 down to –190°C. At a 10 cm level of nitrogen filling the temperature in the most “warm” point, i.e. in the area of tank neck does not augment higher than –120°C but at the maximum height of biopreparation storage it is higher than –170°C. The obtained measurement data are shown in the Fig. 2.

Proceeding from previous research we have determined a critically acceptable temperature for biological

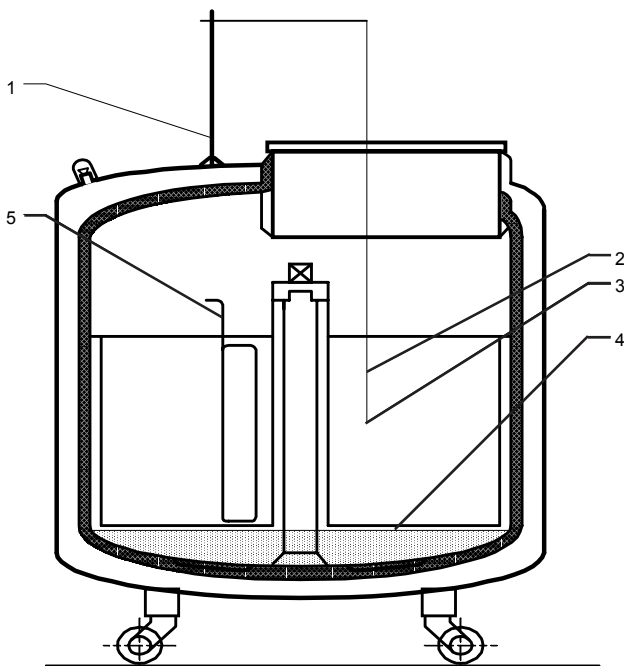


Рис. 1. Схема испытательной установки: 1 – штатив; 2 – измерительная рейка; 3 – термометр сопротивления; 4 – зеркало азота; 5 – стакан.

Fig. 1. Scheme of test device: 1 – support; 2 – gage rod; 3 – resistance thermometer; 4 – nitrogen mirror; 5 – container.

испытания распределения температур в хранилище ХБ-0,5 при уровне заливки азота 10 см. Схема испытательной установки приведена на рис. 1.

Экспериментальные данные указывают на то, что в стационарном состоянии температура в объеме хранилища изменяется от -130 до -190°C . При уровне заливки азота 10 см температура в наиболее “теплой” точке, т. е. в зоне горловины хранилища, не поднимается выше -120°C , а на максимальной высоте хранения биопрепаратов – выше -170°C . Полученные результаты измерений приведены на рис. 2.

Основываясь на предыдущих экспериментальных исследованиях, мы определили критически допустимую температуру для биологического материала, который длительное время хранился при низких температурах. Такой пороговой величиной является температура -130°C . Неоднократное колебание температуры выше -130°C значительно снижает жизнеспособность криоконсервированных препаратов эмбрионального происхождения, а также некоторых штаммов микроорганизмов [2].

Из вышеизложенного следует, что теоретически возможно создание низкотемпературного хранилища на базе ХБ-0,5 с использованием паров жидкого азота.

В дальнейших исследованиях с целью гарантированного полноценного хранения биологического материала была принята максимально допустимая температура (МДТ) -150°C .

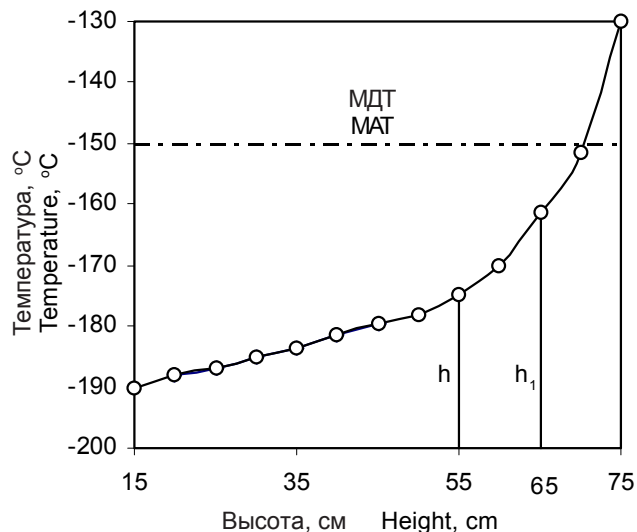


Рис. 2. Вертикальное распределение температуры в паровом хранилище при уровне азота 10 см. h – высота круглого стакана; h_1 – высота прямоугольного стакана.

Fig. 2. Vertical temperature distribution in vapour tank at 10 cm nitrogen level. h – round container height; h_1 – rectangular container height.

material, stored for a long-time under low temperatures. This threshold value is -130°C . A repeated temperature change higher than -130°C considerably reduces the viability of cryopreserved preparations of embryonic origin, as well as some microorganism strains [2].

As it follows from the mentioned above, the design of KhB-0.5-based low temperature tank using liquid nitrogen vapours is theoretically possible.

In further research, aiming to guarantee an integral storage for biological material we accepted a maximally allowable temperature (MAT): -150°C .

Within the further work we have studied the effect of heat, entering during technological operations on temperature field inside of vapour storage tank.

At the initial stage of experiments we have modelled the following critical situation: the standard container with the control vial was removed from a tank for 1 min, then get back onto the storage place (container placing/removal usually takes 10-15 sec). Sample with a thermocouple was placed in upper container case at 60 cm height from the tank bottom.

At a single container removal for a relatively long term the temperature in a vial was established as approaching the critically allowable values even in upper case rack layer.

Temperature of control vial changes by stages (Fig. 3): thawing (temperature increase in vial), recovery (rapid temperature decrease), stabilisation (relatively slow temperature change). At the last stage the temperature may be considered as a constant. Temperature at a different storage height, in particular at a lower layer of the standard container (at 25 cm

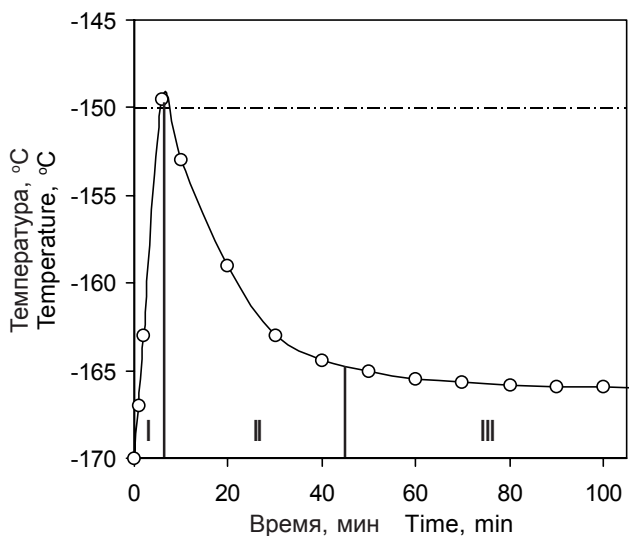


Рис. 3. Изменение температуры в контрольной ампуле при подъеме стакана на 1 мин. I – зона нагрева; II – восстановление температуры; III – стабилизация температуры.

Fig. 3. Temperature change in the control ampoule during container lifting for 1 min. I – warming zone; II – temperature restoration; III – temperature stabilisation.

В ходе последующей работы изучали влияние тепла, поступающего при технологических операциях, на температурное поле внутри парового хранилища.

На начальном этапе экспериментов моделировали критическую ситуацию: стандартный стакан с контрольной ампулой извлекали из хранилища на 1 мин, а затем возвращали на место хранения (как правило, для закладки/извлечения стакана необходимо 10-15 с). Образец с термопарой помещали в верхнюю кассету стакана на высоте 60 см от дна хранилища.

Установлено, что при однократном извлечении стакана на относительно продолжительное время температура в ампуле не достигает критически допустимой, даже в верхнем ярусе укладки.

Температура контрольной ампулы изменялась поэтапно (рис.3): отогрев (повышение температуры в ампуле); восстановление (быстрое снижение температуры); стабилизация (сравнительно медленное изменение температуры). На последнем этапе температуру можно считать постоянной. Также определяли температуру на разной высоте хранения, в частности на нижнем ярусе стандартного стакана (на высоте 25 см от дна хранилища).

Из рис. 4 видно, что от высоты хранения в стакане зависят температура после отогрева и скорость восстановления температуры в ампуле. Установлено, что на нижнем ярусе стакана ($h=25$) температура повышается в меньшей степени, а скорость ее восстановления выше, чем при тепловых процессах на верхнем ярусе ($h=60$).

height from tank bottom) was determined as well.

The Fig. 4 shows that temperature after thawing and temperature recovery rate in a vial depend on storage height. At a lower container layer ($h=25$) the temperature was established to be less increased but the rate of its recovery was higher than during heat processes at upper layer ($h=60$).

When placing/removing biological material the same container was to be removed in short time periods. This situation occurs if using some cases of one container. Therefore at the following stage we have modelled a technological procedure of material placing/removal, as well as an admissible number of its repeats. At the same time the temperature of biological objects should not approach the critical one. Within the experiment the same container was lifted for 15 sec. Each following container lifting from a tank was realised when the control vial temperature reached the initial values after previous lifting, i.e. at the moment of temperature curve bend (Fig. 5).

As a result of research the temperature at the level of upper layer after nine cylinder lifts was established as -152°C (the standard case rack for biological material generally comprises 9 layers-cases).

Thus, when performing technological operations with all container cases the temperature does not reach the critical value.

The KhB-0.5 low temperature tank may comprise from 18 to 40 standard cases racks of different configurations. At previous research stages we estimated the temperature change in the case rack, lifted for 15 sec and 1 min and then re-immersed into liquid nitrogen vapours. It is regular that due to an additional heat, entering from outside the temperature redistri-

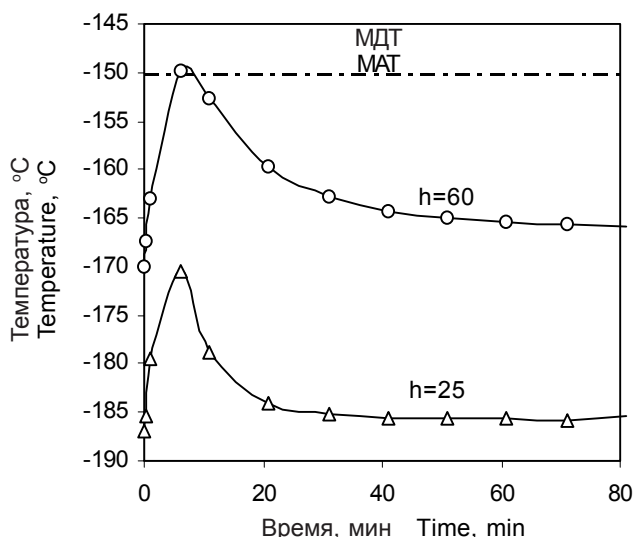


Рис. 4. Изменение температуры в контрольной ампуле в зависимости от высоты хранения после подъема стакана на 1 мин.

Fig. 4. Temperature change in the control ampoule depending on storage height after container lifting for 1 min.

При закладке/извлечении биоматериала часто приходится извлекать один и тот же стакан через небольшие промежутки времени. Эта ситуация возникает при использовании нескольких кассет одного стакана. Поэтому на следующем этапе мы моделировали технологическую процедуру закладки/извлечения материала, а также допустимое количество ее повторов. При этом температура биологических образцов не должна достигать критической. В ходе эксперимента один и тот же стакан поднимали на 15 с. Каждый последующий подъём стакана из хранилища осуществляли, когда температура контрольной ампулы достигала исходных значений после предыдущего подъема, т.е. в момент перегиба температурной кривой (рис. 5).

В результате исследований установлено, что после девяти подъемов стакана температура на уровне верхнего яруса составляет -152°C (стандартная укладка для биологического материала, как правило, состоит из 9 ярусов-кассет).

Таким образом, при проведении технологических операций со всеми кассетами стакана температура не достигает критического значения.

В низкотемпературном хранилище ХБ-0,5 могут быть размещены от 18 до 40 стандартных упаковок разной конфигурации. На предыдущих этапах исследований оценивали изменение температуры в упаковках, которые поднимали на 15 с и 1 мин, а затем снова опускали в пары жидкого азота. Закономерно, что за счет поступающего извне дополнительного тепла происходит перераспределение температуры во всем объеме хранилища. Поэтому необходимо было установить изменение температуры в стаканах, которые не поднимали из парового хранилища. Значение температуры в неподвижном стакане определяли после закладки/извлечения стандартного оборудования, которое вынимали из хранилища на 1 мин (рис. 6).

Из рис. 6 видно, что при закладке/извлечении подвижного стакана (кривая 1) поступает тепло, в результате чего повышается температура в соседних стаканах на $4-6^{\circ}\text{C}$ – верхнем ярусе хранения (кривая 2) и на $1-2^{\circ}\text{C}$ – нижнем (кривая 3).

Логично предположить, что температура в наиболее отдаленных зонах хранилища будет меньше или равна температуре в точке измерения.

При проведении текущих технологических работ в низкотемпературном банке несколько раз проводят закладку/извлечение разных стаканов в одно и то же криогенное хранилище. Поэтому важно установить, как влияет тепло после последовательного внесения нескольких стаканов на температуру контрольной ампулы, которая расположена на верхнем ярусе неподвижного стакана. Следующую операцию закладки/извлече-

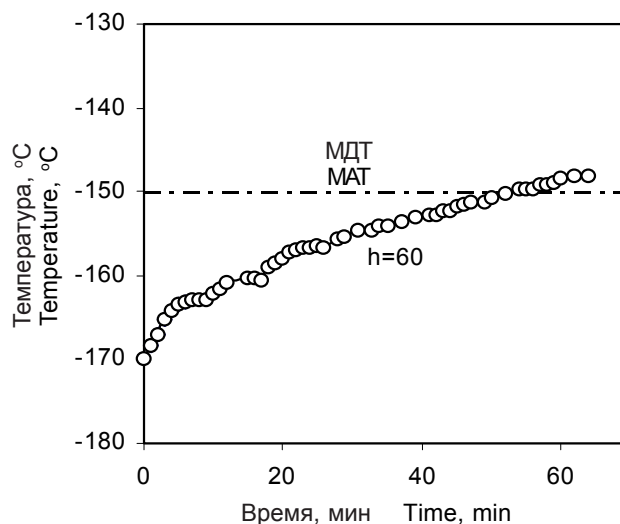


Рис. 5. Изменение температуры в контрольной ампуле при многократном подъеме стакана.

Fig. 5. Temperature change in the control ampoule during manifold container lifting.

tion in the whole tank volume occurs. Therefore of necessary was to establish the temperature change in containers not lifted out of vapour tank. Temperature value in an immobile container was determined after placing/removal of the standard equipment, that was removed from a tank for 1 min (Fig. 6).

The Fig. 6 demonstrates that during mobile container placing/removal (curve 1) the heat enters, resulting in temperature increase by $4-6^{\circ}\text{C}$ in adjacent containers at upper storage layer (curve 2) and by $1-2^{\circ}\text{C}$ at a lower one (curve 3). The temperature in the most distant tank areas is assumed as being either lower or equal to that in measurement point.

When carrying-out the current technological works

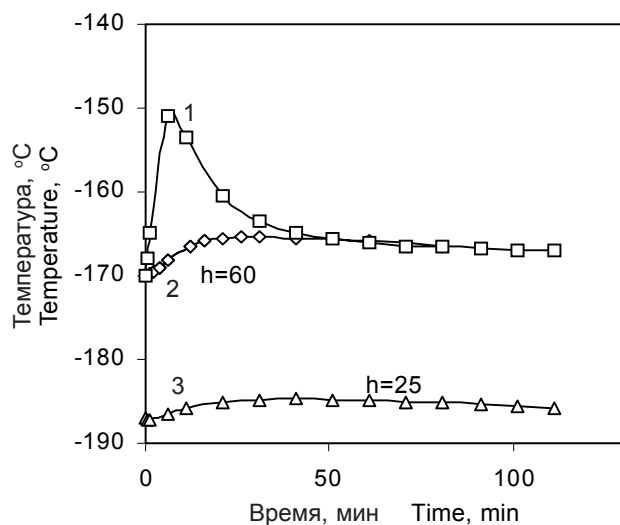


Рис. 6. Влияние тепла, поступившего извне на температуру в неподвижном стакане.

Fig. 6. Effect of heat entering from outside on temperature in immobile container.

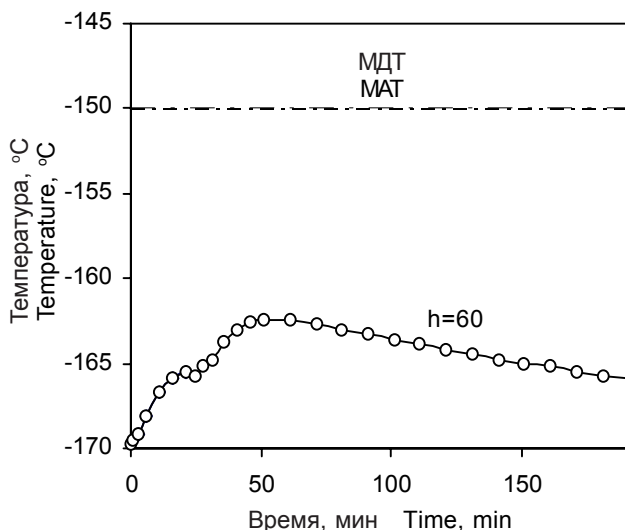


Рис. 7. Изменение температуры в контрольной ампуле ($h=60$ см) после двукратного подъема соседнего стакана.
Fig. 7. Temperature change in the control ampoule ($h=60$) after two-fold lifting of adjacent container.

ния стакана проводили, когда ампула заканчивала отогреваться после внесения предыдущего стакана. Образцы вынимали на 1 мин (рис. 7).

Полученные данные свидетельствуют, что после последовательного внесения в хранилище двух стаканов, которые вынимали на 1 мин, температура повышается в близлежащем объеме парового хранилища на $7-8^{\circ}\text{C}$.

Измерение температуры на уровне верхнего яруса стандартной укладки позволило оценить граничные температурно-временные условия безопасного хранения образцов во всем рабочем объеме хранилища. Очевидно, при размещении биологического материала на нижних ярусах хранилища создаются более благоприятные условия для его сохранности.

Выводы

1. Низкотемпературное хранилище биологических объектов ХБ-0,5 может использоваться как паровое (уровень жидкого азота не менее 10 см).

2. Операция закладки/извлечения в течение 1 мин стандартной укладки из парового хранилища в среду с температурой $18-23^{\circ}\text{C}$ приводит к повышению температуры в стакане на $15-20^{\circ}\text{C}$ на верхнем ярусе хранения ($h=60$ см).

3. Операция закладки/извлечения в течение 15 с стандартной укладки из парового хранилища при аналогичных условиях повышает температуру в данном стакане на $5-7^{\circ}\text{C}$ на верхнем ярусе хранения ($h=60$ см).

4. Продолжительность восстановления температуры в контрольной ампуле после указанной

in a low temperature bank one performs several placing/removals of different containers in the same cryogenic tank. Therefore of importance is to establish how the heat affects after gradual placements of some containers the temperature of control vial, placing at upper layer of immobile container. The following operation of container placement/removal was carried-out when the vial finished its thawing after the placing of previous container. Samples were removed for 1 min (Fig. 7).

The data obtained testify to the fact, that after gradual placing into the tank of two containers, removed for 1 min the temperature increases in adjacent volume of vapour tank by $7-8^{\circ}\text{C}$.

Temperature measurement at the level of upper layer of the standard case rack enabled to estimate the boundary temperature-time conditions of sample safe storage in the whole work volume of tank. When placing biological material at the lower layers of tank the more favourable conditions for its preservation are evidently created.

Conclusions

1. KhB-0.5 low temperature tank for biological objects may be used as a vapour one (liquid nitrogen level not lower than 10 cm).

2. Operations of placement/removal for 1 min of the standard case rack from vapour tank into the medium with $18-23^{\circ}\text{C}$ results in temperature increase in container by $15-20^{\circ}\text{C}$ at an upper layer of tank ($h=60$ cm).

3. Operation of placement/removal for 15 sec of the standard case rack from vapour tank under similar conditions augments the temperature in this container by $5-7^{\circ}\text{C}$ at an upper tank layer ($h=60$ cm).

4. Duration of temperature recovery in a control vial after the mentioned technological operation is 45 min for samples, placed at an upper layer of storage ($h=60$ cm) and 25-30 min at lower ones ($h=25$ cm).

5. Each technological operation of placement/removal of the standard equipment augments temperature in the volume of vapour tank by $3-5^{\circ}\text{C}$ after lifting for 1 min and by $1.5-2^{\circ}\text{C}$ after 15 sec lifting.

The results obtained enable to elaborate the detailed methodical recommendations about KhB-0.5 operation and maintenance as a vapour tank, to specify the current technological operations, related to a long-term storage of biological material in liquid nitrogen vapours.

References

1. Grischenko V.I., Snurnikov O.S., Kadnikova N.G. et al. Some aspects of avoiding microbial contamination of donor materials in low temperature banks // *Transplantologiya*. – 2000. Vol. 1.– N1.– P.34-35.

технологической операции составляет 45 мин для образцов, которые находятся на верхнем ярусе хранения (h=60 см) и 25-30 мин на нижнем (h=25см).

5. Каждая технологическая операция закладки/извлечения стандартного оборудования повышает температуру в объеме парового хранилища на 3-5°C после подъема на 1 мин и на 1,5-2°C после подъема на 15 с.

Полученные результаты позволяют разработать конкретные методические рекомендации относительно эксплуатации ХБ-0,5 в качестве парового хранилища, регламентировать текущие технологические операции, связанные с долгосрочным хранением биологического материала в парах жидкого азота.

2. *Chizhevsky V.V., Vysekantsev I.P., Groshevoy M.I.* Optimising conditions for biological material storage in low temperature bank // Current aspects of reproduction, perinatal medicine and cryobiology.– Kharkov, 2003.– P.242-247.

Accepted in 27.07.2006

Литература

1. *Грищенко В.І., Снурніков О.С., Каднікова Н.Г. и др.* Деякі аспекти запобігання мікробній контамінації донорських матеріалів у низькотемпературних банках // Трансплантологія.– 2000.– Т.1, №1.– С. 34-35.
2. *Чижевський В.В., Высеканцев И.П., Грошевой М.И.* Оптимизация условий хранения биологического материала в низкотемпературном банке // Сучасні аспекти репродуктології, перинатальної медицини і кріобіології.– Харків, 2003.– С.242-247.

Поступила 27.07.2006