

Streszczenie poszerzone

Kriokonserwacja jest to proces, który polega na spowolnieniu aktywności materiału biologicznego poprzez obniżenie temperatury poniżej temperatury fizjologicznej (na przykład do około $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ lub $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), a następnie na przywróceniu funkcji kriokonserwowanych tkanek lub komórek, zachowując równocześnie ich podstawowe czynności życiowe. Kriokonserwacja jest ważną i stale rozwijającą się dziedziną kriobiologii. Wykorzystywana jest do zamrażania komórek i tkanek zarówno zwierzęcych, jak i ludzkich. Kriokonserwacja jest przeprowadzana na następujących komórkach i tkankach: oocytach, zarodkach, plemnikach, nasieniu, tkankach jąder, hepatocytach i innych. Badania w tej dziedzinie obejmują dodatkowo konserwację narządów do przeszczepów. Niskotemperaturowe przechowywanie komórek macierzystych to krok w rozwoju inżynierii tkankowej, który daje szansę na regenerację tkanek miękkich i leczenie wielu chorób. Kriokonserwacja umożliwia również bankowanie komórek lub różnych patogenów w celu zachowania ich do dalszych badań.

Jedną z przyczyn uszkodzenia próbki biologicznej, które może wystąpić podczas kriokonserwacji, jest krystalizacja wody zawartej w komórkach w lód. W rezultacie mechanizm komórkowy dąży do wyrównania ciśnienia osmotycznego. Dlatego substancje rozpuszczone w cytozolu stają się coraz bardziej skoncentrowane, co prowadzi do odwodnienia organelli. Zmienia się również przepuszczalność błony lipidowej, co ma kluczowe znaczenie dla integralności komórki. Uszkodzenia spowodowane stresem osmotycznym, przepuszczalnością błony i zniekształceniem cytoszkieletu destabilizują komórkę. Ponadto obrażenia fizyczne wywołane tworzeniem się kryształków lodu w środku ostatecznie prowadzą do śmierci komórki.

W celu uniknięcia negatywnych skutków procesu stosuje się związki chemiczne zwane krioprotektantami (CPA). Pod wpływem CPA zmieniają się właściwości płynu komórkowego, np. jego temperatura krzepnięcia. Oczekuje się, że te dodane substancje chemiczne będą miały niską toksyczność i biokompatybilność, a także będą miały zdolność penetracji komórek. CPA można podzielić na przenikające przez błony komórkowe i pozostające poza komórką (nieprzenikające). Do najczęściej stosowanych CPA należą glicerol, glikol etylenowy i dimetylosulfotlenek.

Innym sposobem zapobiegania uszkodzeniu materiału biologicznego jest regulowanie prędkości chłodzenia. W zależności od szybkości chłodzenia i stężenia CPA, wyróżnia się różne rodzaje kriokonserwacji. Do najbardziej popularnych technik należy wolne zamrażanie i witrifikacja. Powolne zamrażanie charakteryzuje się głównie niską szybkością chłodzenia

i niskim stężeniem CPA w porównaniu do witrifikacji. Natomiast witrifikacja, w której stan szklisty przechodzi ze stanu ciekłego, charakteryzuje się dużą szybkością chłodzenia i wysokim stężeniem CPA. Znane są również inne techniki kriokonserwacji, takie jak metoda „liquidus tracking” (LT). Główną ideą podejścia LT jest zanurzenie próbki biologicznej w roztworze CPA przy jednoczesnym kontrolowaniu jego temperatury i stężenia. Następuje wówczas zmiana temperatury zamarzania (topnienia), a warunki termodynamiczne roztworu „śledzą” linię likwidusu dla układu.

Procesowi kriokonserwacji towarzyszą również zjawiska transportowe. Podczas tego procesu zachodzą przede wszystkim przemiany związane z wymianą ciepła. Mechanizm przenoszenia biociepła jest rozpatrywany jako połączenie konwekcji i przewodnictwa cieplnego. Rozkład cieplny jest najczęściej opisywany równaniem Fouriera, równaniem Pennesa, równaniem Cattaneo-Vernotte'a oraz równaniem opóźnienia dwufazowego. Przygotowując model transportu ciepła dla procesu kriokonserwacji ważne jest również uwzględnienie zjawisk przemian fazowych, które są związane z krystalizacją lodu.

Oprócz wymiany ciepła podczas kriokonserwacji zachodzi również transport masy. Modelowanie dostarczania krioprotektanta do komory próbki, zwłaszcza w układach mikroprzepływowych, jest rozpatrywane jako problem przepływu płynu za pomocą np. równań Naviera-Stokesa. Transport masy jest również związany z ruchem cząsteczek, gdy stężony roztwór krioprotektanta dyfunduje do macierzy zewnątrzkomórkowej. W związku z tym do wyrażenia tego zjawiska stosuje się równanie konwekcji-dyfuzji. W przypadku pominięcia adwekcji, dyfuzję cząstek charakteryzują prawa Ficka.

Podczas modelowania kriokonserwacji należy również przeanalizować transport osmotyczny. Opisuje on zmiany objętości komórek spowodowane zmianami liczby molowej krioprotektanta i objętości wody w roztworze wewnątrzkomórkowym. Do wyznaczenia tych wartości można zastosować model dwuparametryczny lub równania Kedem-Katchalsky'ego.

Kriokonserwacja jest niezwykle złożonym procesem, a jej modelowanie wymaga połączenia wiedzy z zakresu mechaniki, biologii i chemii. Niniejsza rozprawa poświęcona jest wieloskalowemu modelowaniu wymiany ciepła i masy podczas kriokonserwacji. Należy podkreślić, że efektywne rozwiązania bardziej skomplikowanych problemów brzegowo-początkowych dotyczących wymiany ciepła i masy na poziomie tkanek i komórek można uzyskać jedynie za pomocą metod numerycznych, na przykład stosując metodę różnic skończonych (MRS).

Ponadto niektóre wielkości fizyczne wykorzystywane do obliczeń numerycznych są wyznaczone doświadczalnie. W rezultacie często spotyka się parametry o przybliżonych wartościach, które są obarczone pewną niedokładnością. Aby poprawnie zinterpretować takie niedokładne wartości i zastosować je do analizy problemów technicznych, do symulacji numerycznych można wykorzystać arytmetykę przedziałową lub rozmytą. Wówczas niedokładnie zdefiniowane wielkości są reprezentowane jako liczby przedziałowe lub liczby rozmyte nieposiadające ostrych granic. Liczby przedziałowe są uważane za „prekursorów” liczb rozmytych. Parametry, dla których nie podano dokładnej wartości, ale znane są dokładne wartości dolnej i górnej granicy przedziału, do którego zawsze należy dana wartość liczbowa, mogą być interpretowane jako liczby przedziałowe. Zastosowanie zarówno teorii zbiorów rozmytych, jak i liczb przedziałowych, pozwala na lepsze przedstawienie wielu zjawisk fizycznych podczas modelowania matematycznego.

Celem niniejszej rozprawy jest przedstawienie różnych modeli matematycznych wymiany ciepła i masy w tkance biologicznej podczas procesu kriokonserwacji z nieprecyzyjnie zdefiniowanymi parametrami w opisie matematycznym poprzez wprowadzenie liczb przedziałowych i rozmytych. Do rozwiązania tak sformułowanego problemu zastosowano przedziałową i rozmytą metodę różnic skończonych. W niektórych przykładach przedstawionych w rozprawie wyniki symulacji numerycznych porównano z danymi eksperymentalnymi występującymi w literaturze. Integralną częścią pracy są autorskie programy komputerowe wykorzystujące skierowaną arytmetykę przedziałową oraz arytmetykę rozmytą.

Sformułowano następującą **tezę pracy**:

Uwzględnienie nieprecyzyjnych parametrów występujących w opisie matematycznym pozwala na efektywne wieloskalowe modelowanie procesu wymiany ciepła i masy podczas kriokonserwacji tkanek i komórek.

Praca składa się z sześciu rozdziałów, bibliografii oraz streszczenia w języku polskim i streszczenia w języku angielskim.

Rozdział 2. zawiera przegląd literatury dotyczącej metod kriokonserwacji. Przedstawiono w nim różne sposoby przeprowadzania tego procesu. Omówiono również procedury etapu chłodzenia i dostarczania roztworu CPA do próbki. W rozdziale opisano również najczęściej stosowane CPA.

Rozdział 3. poświęcony jest mechanizmom transportu zachodzącym podczas kriokonserwacji. Zawiera on przegląd mechanizmów wymiany ciepła oraz przedstawia niektóre z powszechnie stosowanych modeli do definiowania procesów termicznych i zjawiska krystalizacji w próbkach biologicznych. W rozdziale tym opisano również model transferu masy związany po pierwsze z przepływem kąpeli zawierającej krioprotektant do próbki (przepływ płynu), a po drugie z dyfuzją cząsteczek do roztworu zewnątrzkomórkowego tkanki biologicznej (dyfuzja molekularna). W rozdziale przedstawiono także model przenoszenia cząsteczek wody i CPA przez błony komórkowe (transport osmotyczny).

W rozdziale 4. wprowadzono teorię zbiorów przedziałowych i zbiorów rozmytych. Sformułowano w nim podstawowe działania matematyczne wykonywane w zbiorze liczb rozmytych oraz w zbiorze liczb przedziałowych.

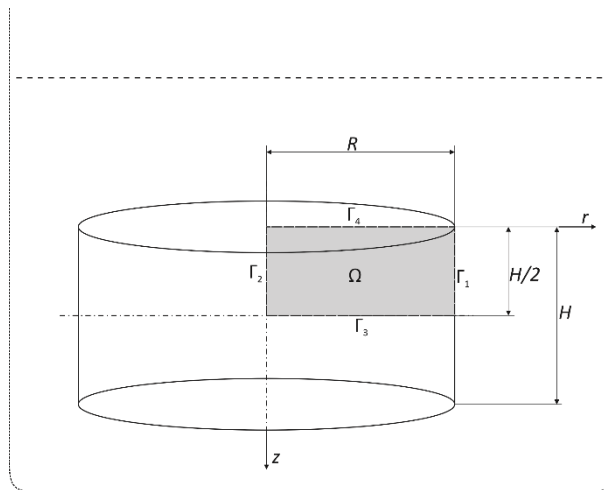
W rozdziale 5. rozpatrzono problem wymiany ciepła opisany w trzech przykładach. W Przykładzie 1 zdefiniowano model określony równaniem Fouriera. Natomiast w Przykładzie 2 model termiczny uzupełniono o przemiany fazowe wprowadzone do równania Pennesa za pomocą metody jednego obszaru. W Przykładzie 3 zbadano zjawisko krystalizacji za pomocą modelu strefowego i równania nieizotermicznego zaproponowanego przez Boutrona i Mehla.

Rozdział 6. przedstawia trzy przykłady związane z problemem przenoszenia masy. W Przykładzie 1 analizowano przenoszenie masy opisane drugim prawem Ficka, w którym pominięto zjawisko adwekcji. W Przykładzie 2 zaprezentowano model transportu osmotycznego zdefiniowany za pomocą metody dwuparametrycznej. W Przykładzie 3 przedstawiono model układu mikroprzepływowego, w którym rozważano zjawisko adwekcji, dlatego w tym przypadku model przenoszenia masy został uwzględniony za pomocą równania konwekcji-dyfuzji.

W Rozdziale 7. podsumowano rozprawę i zaproponowano kierunki dalszych badań.

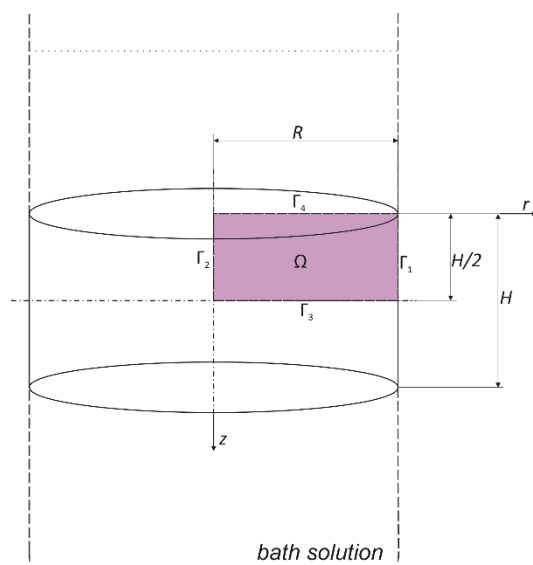
W Przykładzie 1. Rozdziału 5. przedstawiono model matematyczny opisujący zmiany rozkładu termicznego w cylindrycznej próbce chrząstki stawowej (Rysunek 1). Chrząstka stawowa znajduje się na końcu kości wewnątrz stawu. Tkanka ta jest elastyczna i przenosi obciążenia działające w stawie podczas ruchu. Składa się głównie z wody (65%-80%). Pozostałe elementy chrząstki stawowej to kolagen (10%-20%) i macierz proteoglikanowa (5%-10%). Macierz zewnątrzkomórkowa (proteoglikan) zawiera komórki zwane chondrocytami. Chrząstka stawowa nie posiada unerwienia, nerwów, naczyń krwionośnych i limfatycznych. Dlatego nie jest konieczne uwzględnianie perfuzji tkanki, w wyniku czego

nasz proponowany model wymiany ciepła jest oparty na równaniu Fouriera. Model matematyczny uzupełniono o warunki brzegowe 2. i 3. rodzaju oraz o warunek początkowy. Warto wspomnieć, że w modelu numerycznym rozkład temperatury w kriokonserwowanej próbce chrząstki stawowej wyznaczono za pomocą metody LT, która gwarantuje odpowiednią regulację temperatury i stężenia roztworu kąpieli. W trakcie analizowanego procesu następuje modyfikacja właściwości próbki, na przykład jej temperatury krzepnięcia, zapobiegając jednocześnie procesowi krystalizacji lodu. Dlatego w tym przykładzie pominięto przemiany fazowe oraz zjawisko krystalizacji. Dodatkowo parametry termofizyczne wyznaczone eksperymentalnie zostały uwzględnione w modelu matematycznym jako liczby interwałowe i rozmyte.



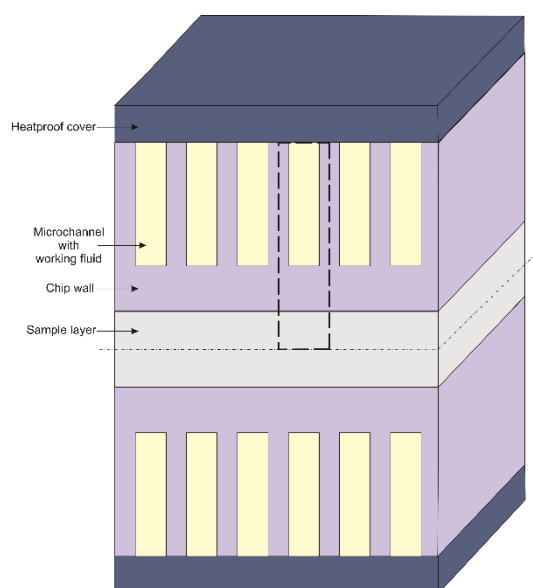
Rysunek 1. Model geometryczny próbki w Przykładzie 1 (Rozdział 5)

W **Przykładzie 2. Rozdziału 5.** przedstawiono model przepływu ciepła z uwzględnieniem zjawiska przemian fazowych. W tym przypadku zmiany termiczne modelowano w nieokreślonej tkance miękkiej. Założono, że materiał biologiczny zawiera naczynia krwionośne, które są źródłami ciepła związanymi z perfuzją i metabolizmem. Rysunek 2. ilustruje dwuwymiarowy model próbki biologicznej zanurzonej w roztworze kąpieli. Model matematyczny tego przykładu jest oparty na równaniu Pennesa z uwzględnieniem przemian fazowych za pomocą metody jednego obszaru. W zadaniu zadano warunki brzegowe 2. i 3. rodzaju oraz warunki początkowe. Przeprowadzono symulacje numeryczne dla kriokonserwacji poprzez wolne zamrażanie i witrifikację, a następnie porównano ze sobą te dwie metody, aby uwzględnić różnice w rozkładzie temperatur. Parametry termofizyczne występujące w modelu zostały wprowadzone jako liczby interwałowe.



Rysunek 2. Model geometryczny próbki w Przykładzie 2 (Rozdział 5)

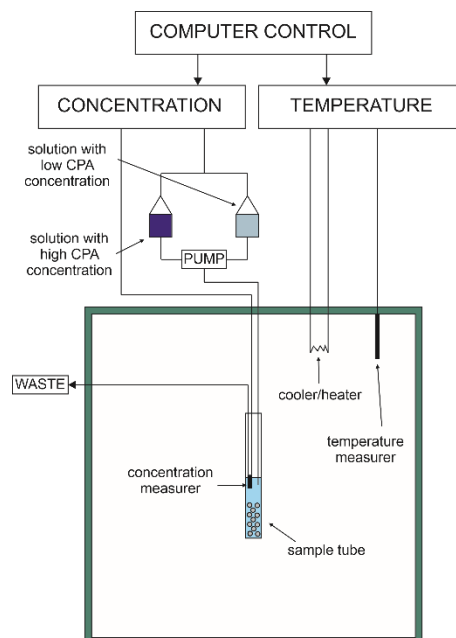
W **Przykładzie 3. Rozdziału 5.** opisano procesy termiczne, w tym zjawisko krystalizacji lodu w ujęciu mikroskopowym dla rozpatrywanej próbki biologicznej. Z uwagi na fakt, że komórki i tkanki biologiczne składają się głównie z wody, rozpatrywaną próbkę zamodelowano jako roztwór wodny CPA. W przykładzie tym badano stopień krystalizacji kryształów lodu podczas procesu witrifikacji. Zaprezentowany model (Rysunek 3) opiera się na koncepcji układu mikroprzepływowego, w którym ciecz robocza przepływa przez mikrokanały.



Rysunek 3. Model układu mikroprzepływowego w Przykładzie 3 (Rozdział 5)

W mikrokanałach w centralnej części układu znajduje się cienka warstwa próbki, co zapewnia równomierny rozkład temperatury wewnątrz próbki. Poprzez mikrokanały dostarczany jest płyn roboczy, który reguluje szybkość chłodzenia. Cały układ zamknięty jest w obudowie zapewniającej izolację termiczną. Pominięto w tym przypadku wymianę ciepła między układem a otoczeniem. Analizę numeryczną przeprowadzono dla układu mikroprzepływowego, w którym model przepływu ciepła opisany został za pomocą równania Fouriera sprzężonego ze stopniem krystalizacji wyznaczanym z zależności Boutrona-Mehla. Ponadto założono, że parametry termofizyczne zależą od temperatury, wprowadzając tym samym słabą nieliniowość do równania wymiany ciepła. Obliczenia wykonano z wykorzystaniem arytmetyki interwałowej i rozmytej.

W **Przykładzie 1. Rozdziału 6.** kontynuowano rozważania Przykładu 1. z Rozdziału 5. Przedstawiono w tym przykładzie model przepływu masy w próbce chrząstki stawowej. Ponownie zamodelowano proces kriokonserwacji za pomocą protokołu LT. Na Rysunku 4. przedstawiono schemat aparatury zastosowanej do przeprowadzenia tego procesu. W układzie tym próbka umieszczona jest w probówce wypełnionej roztworem, który jest regularnie wymieniany w zależności od pożądanego stężenia CPA.

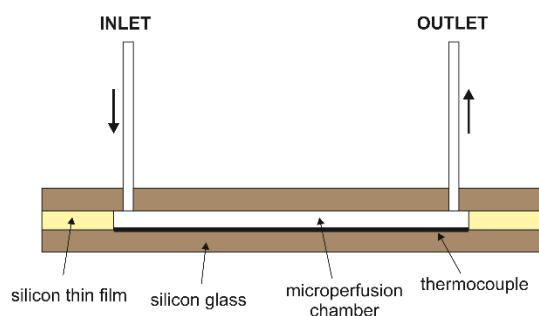


Rysunek 4. Układ do przeprowadzania kriokonserwacji metodą LT (Przykład 1, Rozdział 6)

Całość znajduje się w komorze, w której kontrolowana jest temperatura. Próbka jest zanurzona w roztworze kąpieli, dlatego pominięto zjawisko konwekcji, a przepływ masy zdefiniowano za pomocą drugiego prawa Ficka. Z uwagi na to, że model przepływu masy sprzężony jest z modelem przepływu ciepła, obliczenia wykonano wykorzystując arytmetykę interwałową oraz rozmytą.

W **Przykładzie 2. Rozdziału 6.** analizowano wymianę cząsteczek wody i CPA przez błonę komórkową oraz zmianę objętości komórek. Warto dodać kilka informacji na temat składu roztworu kąpieli. Podstawą roztworu kąpieli jest roztwór CPTes2, który zawiera DMSO jako CPA, wodę i KCl, co powoduje, że zastosowany roztwór kąpieli jest mieszaniną bogatą w potas. Transport osmotyczny jest spowodowany różnicą potencjałów chemicznych między macierzą zewnątrzkomórkową a roztworem wewnątrzkomórkowym. Obecność CPA w roztworze pozakomórkowym powoduje transport wody z roztworu wewnątrzkomórkowego (odwodnienie). Następnie ponownie przenoszona jest do roztworu wewnątrzkomórkowego woda wzbogacona cząsteczkami CPA. W rozpatrywanym przypadku zmiany objętości komórek oszacowano na podstawie zmiany objętości wody i liczby moli CPA w komórce. Do określenia tych parametrów zastosowano formalizm dwuparametryczny. Uwzględniając, że model transportu osmotycznego sprzężony jest z modelem przepływu ciepła i masy, obliczenia przeprowadzono z wykorzystaniem arytmetyki interwałowej.

W **Przykładzie 3. Rozdziału 6.** przedstawiono model przepływu ciepła i masy oraz transportu osmotycznego z uwzględnieniem sposobu dostarczania CPA do próbki. Niewłaściwe ładowanie i rozładowywanie CPA może powodować uszkodzenia osmotyczne komórek. Z tego powodu często jest to proces czasochłonny. Odpowiednie dostarczanie CPA można osiągnąć, stosując na przykład system mikroprzepływowy. W rozpatrywanym przykładzie stworzono uproszczoną geometrię układu mikroprzepływowego (Rysunek 5). Głównym elementem układu mikroprzepływowego jest tu cylindryczny mikrokanal zamknięty w szklanym szkiełku. Otwory wejściowe i wyjściowe są wydrążone w obudowie, a kąpiel z roztworem jest wtryskiwana i usuwana w sposób ciągły. Dlatego model wymiany masy uwzględnia nie tylko zjawisko dyfuzji, ale także konwekcję spowodowaną ruchem roztworu kąpieli. Równanie przepływu oparte jest na równaniu konwekcji-dyfuzji. Obliczenia wykonano z wykorzystaniem arytmetyki interwałowej i rozmytej.



Rysunek 5. Uproszczony układ mikroprzepływowo (Przykład 3, Rozdział 6)

Przedstawione w rozprawie rozważania teoretyczne i wyniki obliczeń prowadzą do następujących wniosków:

1. Arytmetyka przedziałowa i rozmyta są efektywnymi narzędziami do symulacji zjawisk transportowych zachodzących w procesie kriokonserwacji. Metody te umożliwiają wprowadzenie do modelu matematycznego zestawu niedokładnie i niedokładnie zdefiniowanych parametrów, np. wyznaczonych eksperymentalnie wielkości opisujących właściwości termofizyczne danej tkanki biologicznej, które często zależą od wielu czynników, takich jak wiek, płeć itp.
2. W literaturze zjawiska zachodzące podczas kriokonserwacji opisywane są głównie w oparciu o podejście deterministyczne. Zachowanie się struktur biologicznych jest raczej losowe i stochastyczne, dlatego można stwierdzić, że modele deterministyczne są uproszczeniem zjawisk naturalnych. Modele stochastyczne mogą być wdrażane w celu zbadania tych problemów, co jest niestety czasochłonne. W rozprawie przedstawiono nowatorskie podejście polegające na wprowadzeniu do modelu liczb przedziałowych lub rozmytych. W konsekwencji otrzymuje się wyniki w postaci pewnych zbiorów (przedziałów) zawierających poprawne wartości obliczeń.
3. Kriokonserwacja to złożony proces obejmujący wiele powiązanych ze sobą zjawisk fizycznych. Kompletny model powinien przede wszystkim uwzględniać przepływ ciepła i masy oraz transport osmotyczny.

Na podstawie wykonanych prac w prezentowanej rozprawie doktorskiej można zaproponować następujące dalsze kierunki badań:

- Wprowadzenie parametrów termofizycznych zależnych od temperatury w postaci funkcji wielomianowych do przedstawionych modeli matematycznych.
- Przygotowywanie analiz transportu masy i transportu osmotycznego do kriokonserwacji metodą powolnego zamrażania i witrifikacji.

- Zastosowanie innych równań przepływu ciepła i masy oraz transportu osmotycznego do modelowania kriokonserwacji.
- Analiza innych przykładów kriokonserwowanych próbek biologicznych.
- Uzupełnienie modelu procesu krystalizacji o badanie nukleacji oraz energii aktywacji.
- Wyznaczanie temperatury krzepnięcia próbek zmieniającej się podczas kriokonserwacji pod wpływem CPA.
- Rozszerzenie modelu dwuwymiarowego do modelu trójwymiarowego.

Rozprawa była realizowana w latach 2019-2023 we Wspólnej Szkole Doktorskiej prowadzonej przez Politechnikę Śląską. Badania sfinansowano w ramach projektu InterPOWER (grant POWR.03.05.00-00-Z305, Unia Europejska w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego) oraz ze środków dotacji statutowej (w ramach projektów 10/040/BKM20/0099, 10/040 /BKM21/0115 i 10/040/BKM22/0125).

Praca związana jest z Priorytetowym Obszarem Badawczym POB1: Onkologia obliczeniowa i spersonalizowana medycyna, rozwijanym na Politechnice Śląskiej.

Najważniejsze publikacje mgr inż. Anny Skorupy:

1. Piasecka-Belkhat A, Skorupa A.; Crystallisation degree analysis during cryopreservation of biological tissue applying interval arithmetic; *Materials*; 2023; t. 16 (6); 2186; s. 1–15; doi:10.3390/ma16062186; 140 pkt.; IF 3,748.
2. Skorupa A, Piasecka-Belkhat A.; Comparison of heat transfer phenomena for two different cryopreservation methods: slow freezing and vitrification; *Journal of Applied Mathematics and Computational Mechanics*; 2023; t. 22 (1); s. 53–65; doi:10.17512/jamcm.2023.1.05; 70 pkt.
3. Piasecka-Belkhat A, Skorupa A.; Application of interval arithmetic in numerical modeling of cryopreservation process during cryoprotectant loading to microchamber.; *Numerical Heat Transfer Part A-Applications*; 2022; s. 1–19; doi:10.1080/10407782.2022.2105078; 100 pkt.; IF 2,569.
4. Piasecka-Belkhat A, Skorupa A.; Numerical study of heat and mass transfer during cryopreservation process with application of directed interval arithmetic; *Materials*; 2021; t. 14 (11); 2966; s. 1–15; doi:10.3390/ma14112966; 140 pkt.; IF 3,748.
5. Skorupa A, Piasecka-Belkhat A.; Numerical modeling of heat and mass transfer during cryopreservation using interval analysis; *Applied Sciences-Basel*; 2021; t. 11 (1); s.1–16; doi:10.3390/app11010302; 100 pkt.; IF 2,838.