

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

ГУРИНА Татьяна Михайловна

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАЗОВОГО СОСТОЯНИЯ ЗАМОРОЖЕННЫХ
РАСТВОРОВ КРИОПРОТЕКТОРОВ, КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИИ
И ТКАНЕЙ МЕТОДОМ ТЕРМОПЛАСТИЧЕСКОЙ ДЕФОРМАЦИИ

(03.00.22 - криобиология

03.00.02 - биофизика)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Харьков - 1993

AB 27.254

Работа выполнена в Институте проблем криобиологии и кримедицины АН Украины.

Научные руководители: член-корреспондент АН Украины, профессор Н.С.Пушкарь,
кандидат физико-математических наук А.И.Осецкий.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор, лауреат Государственной премии Украины В.И.Луговой,
доктор биологических наук, профессор, В.В.Лемешко.

Ведущая организация – Физико-технический институт низких температур.

Защита состоится "18" мая 1993 года в "13"³⁰ часов на заседании специализированного совета Д 016.60.01 при Институте проблем криобиологии и кримедицины АН Украины (г. Харьков, ул. Переяславская, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан "16" апреля 1993 года.

Ученый секретарь специализированного совета,
доктор медицинских наук

А.Н.Гольцев

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00803024 (H)

Актуальность проблемы. Данные о фазовых состояниях охлаждаемых биологических систем входят в число основных параметров, определяющих как структурно-функциональные характеристики биообъектов, так и технологию их криоконсервирования. Поэтому проблемам их определения в криобиологии уделяется традиционно большое внимание. В настоящее время относительно хорошо разработаны экспериментальные методы определения таких параметров, как температура начала кристаллизации воды в биообъектах, температурный интервал, в котором развиваются кристаллизационные процессы или процессы плавления при отогреве, температура стеклования (расстеклования) системы, а также интервалы температур, соответствующие рекристаллизационным процессам. Однако эти методы недостаточно эффективны при изучении кинетики протекающих в криоконсервируемых биологических системах фазовых или структурных переходов при температурах, близких к температурам стеклования. Кроме того, они не позволяют определить упруго-пластические свойства исследуемых систем в каждой конкретной точке фазовой диаграммы. В тоже время результаты последних исследований показывают, что именно особенности кинетики структурных переходов и изменение упруго-пластических свойств биосистем, связанных с этими переходами, во многом определяют механизмы их повреждения.

Проблема определения упруго-пластических свойств твердых образцов достаточно хорошо решена в физике металлов (Р.Бернер, Г.Кронмюллер, 1969; Д.А.Вигли, 1974) и физике полимеров (В.Е.Гуль, В.Н.Кулезнев, 1972). Но все известные устройства для определения механических свойств образцов совершенно непригодны для работы с образцами, изначально находящимися в жидкофазном состоянии (В.В.Пустовалов, 1971). А как известно, большинство изучаемых в криобиологии биообъектов, является жидкообразными.

Таким образом, актуальным стал вопрос о разработке метода, который позволил бы определять не только традиционно измеряемые температурные интервалы фазовых переходов, но и одновременно регистрировать кинетику самого явления, а также измерять упруго-пластические свойства биосистем в процессе их охлаждения или нагрева.

В связи с этим был предложен новый метод фазового анализа замороженных растворов и биосистем, основанный на их термопластической деформации.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является разработка нового метода, предназначенного для изучения фазовых и структурных переходов в замораживаемых биосистемах - метода термо-

пластической деформации, позволяющего исследовать кинетику этих процессов и определять изменения упруго-пластических свойств системы, связанные с такими переходами.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- разработать и теоретически обосновать метод термопластической деформации для изучения фазового состояния замороженных биосистем, а также устройство для его реализации;
- апробировать метод термопластической деформации на водных растворах криопротекторов различной концентрации (глицерин, ПЭО-1500, 1,3-ДМЭГ), клеточных суспензиях и тканях;
- экспериментально и теоретически изучить фазовое состояние и кинетику структурных переходов в водных растворах криопротекторов различной концентрации, клеточных суспензиях и тканях;
- с учетом полученных результатов сформулировать практические рекомендации по совершенствованию технологии криоконсервирования биологических объектов.

Научная новизна работы. Разработан новый метод для изучения фазовых и структурных переходов в замораживаемых биосистемах - метод термопластической деформации, позволяющий впервые исследовать не только кинетику этих процессов, но и определять упруго-пластические свойства системы, связанные с этими переходами.

Создана оригинальная установка с набором деформационных приставок для реализации метода термопластической деформации в криобиологическом эксперименте. Впервые проведено изучение термопластических свойств целого ряда растворов криопротекторов и биосистем в широких интервалах температур и внешних напряжений.

На водных растворах криопротекторов обнаружено новое явление их заторможенного низкотемпературного эвтектического расслоения. Рассмотрен механизм действия этого явления, как одного из основных повреждающих факторов при криоконсервировании биосистем с суммарной концентрацией криопротекторных веществ до 30 %.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный новый метод позволяет:
 - проводить фазовый анализ замороженных растворов криопротекторов, клеточных суспензий и тканей;
 - исследовать кинетику процессов, протекающих при охлаждении-нагреве растворов криопротекторов, клеточных суспензий и тканей;
 - изучать структурные изменения биосистем, а также связанные

с ними упруго-пластические свойства.

2. Экспериментально обнаружено явление низкотемпературного эвтектического расслоения охлаждаемых криопротекторных растворов.

3. Рассмотрено влияние явления низкотемпературного эвтектического расслоения криопротекторных растворов на сохранность криоконсервируемых биосистем.

4. Сформулированы принципы оптимизации режимов криоконсервирования клеточных суспензий и тканей на основе данных по термопластике их образцов.

Практическая ценность. На основании полученных в работе экспериментальных данных и развития теоретических представлений будут сформулированы рекомендации по оптимизации режимов криоконсервирования биологических систем.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на IV Всесоюзной конференции по химии низких температур (Москва, МГУ, 21-23 декабря 1988), II Всесоюзной конференции "Химия и применение неводных растворов" (Харьков, ХГУ, 3-5 октября 1989), Всесоюзном семинаре "Современные методы аттестации методик выполнения измерений" (Харьков, ХГУ, 18-20 апреля 1990), XVIII-th International Congress of Refrigeration, (Canada, August 10-17, 1991), International Symposium on Calorimetry and Chemical Thermodynamics (USSR, Moscow, June 23-28, 1991), Международной конференции "Успехи современной криобиологии" (Харьков, 21-25 апреля 1992)

Публикации. Основные материалы диссертации опубликованы в 8 печатных работах, получено 1 авторское свидетельство, 2 заявки признаны изобретением и принято решение о выдаче патентов.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и иллюстрирована 29 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, 3-х глав собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 168 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

В качестве материала для исследований были использованы:

- водные растворы криопротекторов различной концентрации (глицерин, ПЭО-1500, 1,3-ДМЭГ);
- клеточные суспензии (эритроциты, клетки костного мозга линейных мышей-гибридов);
- ткани животных (печень крысы, сердце крысы, почка крысы, головной мозг крысы, поперечно-полосатая мышца бедра крысы).

Для исследований был разработан новый метод фазового анализа замороженных растворов и биосистем – метод термопластической деформации и устройство для его реализации. Суть предложенного метода заключается в том, что исследуемые образцы водных растворов крипротекторов, клеточных суспензий или тканей, помещенные в специальное деформационное устройство, охлаждаются по заданной программе до температуры жидкого азота с последующей стабилизацией температуры в течение определенного промежутка времени. После этого к ним прикладываются внешние напряжения и начинается отогрев образца с заданной скоростью.

Получаемые экспериментальные термопластические кривые позволяют в деталях проследить кинетику фазовых и структурных переходов в исследуемых образцах, и, что особенно важно, с высокой разрешающей способностью определить изменение их физико-механических характеристик. Это открывает принципиально новые возможности при исследовании целого ряда криобиологических проблем и оптимизации технологий криоконсервирования биосубъектов.

На рис. 1 представлена типичная термопластическая кривая $\epsilon = \epsilon(T)$ (позиция 2), полученная в режиме отогрева замороженного раствора глицерина доэвтектической концентрации. Для сравнения на этом же рисунке представлена термограмма процесса расстеклования того же раствора глицерина (позиция 1), полученная с помощью сканирующей

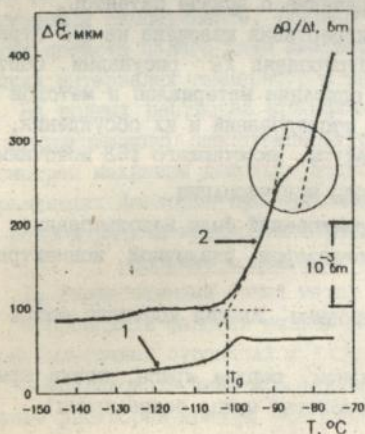


Рис. 1. Термограмма (1) и термопластическая кривая процесса расстеклования водного раствора глицерина доэвтектической концентрации.

щего калориметра. Из приведенных графиков видны преимущества термопластических кривых, на которых эффект расстеклования сопровождается увеличением скорости термопластической деформации на четыре порядка. Это естественно, так как на несколько порядков изменяется при расстекловании модуль упругости образцов. Столь резкое изменение контролируемого параметра позволяет значительно точнее определять температуру начала процесса расстеклования, а также проследить кинетику самого процесса расстеклования и всех протекающих при более высоких температурах процессов, связанных с изменением структуры образца (например, образование микрокристаллов льда). То же относится и к другим процессам, сопровождающимся резким изменением упруго-пластических характеристик исследуемых биообъектов.

Метод термопластической деформации позволяет с большой точностью определять температуры стеклования (расстеклования) растворов криопротекторов, температурные интервалы и кинетику процессов рекристаллизации, кристаллизации и протекающих в расстеклованных системах явлений.

На водных растворах глицерина по термопластическим кривым была получена концентрационная зависимость температуры расстеклования T_g (рис. 2). Полученные данные по зависимости $T_g = T_g(C_{г.л.})$ хорошо согласуются с имеющимися в литературе.

Учитывая, что охлаждаемые растворы криопротекторов, применяемые в криобиологии, имеют высокие вязкостные параметры, то обычная кристаллизация обеих компонентов А и В не идет до конца, т.е. в оставшейся жидкой фракции не достигается эвтектическая концентрация $C = C_{eut}^0$. В результате в этих системах не происходит обычная эвтектическая кристаллизации, заканчивающаяся выпадением кристал-

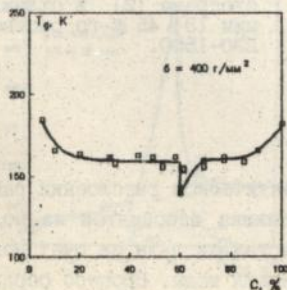


Рис. 2. Температура расстеклования водных растворов глицерина.

лов обеих фаз при строго постоянной температуре эвтектики T_{eut} . Процесс низкотемпературного эвтектического расслоения раствора протекает в широком температурном интервале ($T_{ав} \dots T_g$), где T_g — температура стеклования, а $T_{ав}$ — температура начала сборки молекул криопротектора в ассоциаты, и имеет заторможенный характер. В этом интервале происходит образование ассоциатов из молекул криопротекторных веществ, что вызывает уменьшение гидратационных чисел молекул криопротекторов. Часть молекул воды оказываются свободными при крайне низких температурах $-60 \dots -100$ °C, и они немедленно образуют микрокристаллы льда. Это явление впервые удалось обнаружить с помощью метода термопластической деформации.

Для выяснения природы наблюдаемого эффекта на растворах криопротекторов различных концентраций были сняты как термопластические кривые, так и дилатограммы. Для раствора ПЭО-1500 с концентрацией 45 % на рис. 3 нанесены термопластическая кривая 1 и дилатометрические кривые, полученные в процессе охлаждения раствора со скоростью $v_{охл.} = 0,5$ град/мин (кривая 3) и при отогреве образца со скоростью $v_{от.} = 1$ град/мин (кривая 2).

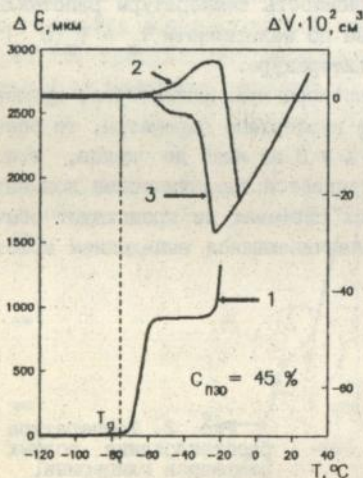


Рис. 3. Термопластическая кривая (1) и дилатометрические кривые на отогреве (2) и охлаждении (3) 45 %-го раствора ПЭО-1500.

Итак, при низкотемпературном эвтектическом расслоении раствора идет образование двух новых фаз: сшивка ассоциатов из молекул криопротекторов и образование микрокристаллов льда за счет появляющихся вблизи ассоциатов свободных молекул воды. Процесс образова-

ния ассоциатов из молекул криопротектора ведет к повышению вязкости раствора и отчетливо регистрируется на термопластической кривой характерным перегибом в области температур $-65 \dots -23^\circ\text{C}$ (кривая 1 рис. 3). А специфические объемные эффекты, сопровождающие образование микрокристаллов льда, и кинетика их протекания отчетливо отображены на dilatометрических кривых. Согласно dilatометрической кривой, снятой на охлаждении (кривая 3 рис. 3), после окончания кристаллизации раствора при достижении температуры $T = -45^\circ\text{C}$ в процессе охлаждения образца вновь начинается резкое возрастание его объема, что однозначно подтверждает наличие процессов образования микрокристаллов льда, сопровождающих явление низкотемпературного эвтектического расслоения.

При помощи термопластических кривых удалось определить значения предельных концентраций C_{eut}^A и C_{eut}^B , которые достигаются компонентами А и В при охлаждении раствора со скоростью $V_{охл.}$. Этот интервал $\Delta C_\eta = [C_{eut}^A, C_{eut}^B]$ условно можно назвать эвтектическим концентрационным интервалом. В связи с отсутствием в этих растворах макрокристаллов льда они должны иметь повышенную текучесть выше температуры расстеклования T_g , а значит интервал ΔC_η должен однозначно определяться с помощью термопластических кривых.

На примере водных растворов глицерина на рис. 4 показана полученная с их помощью зависимости $\Delta \epsilon_{10} = \Delta \epsilon(c_{гл.})$, где $\Delta \epsilon_{10}$ — приращение пластической деформации исследуемого образца при повышении его температуры на 10 градусов после начала процесса расстеклования, т.е. от температуры T_g до температуры $(T_g + 10)^\circ\text{C}$.

Резкий пик на кривой однозначно определяет предельные значе-

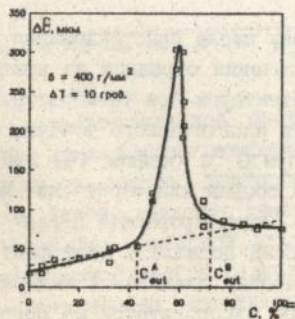


Рис. 4. Приращение деформации водных растворов глицерина при изменении температуры на 10 градусов после начала процесса расстеклования.

ния эвтектического концентрационного интервала. Ширина этого интервала является функцией скорости охлаждения раствора $v_{\text{охл.}}$. Чем выше скорость охлаждения, тем шире интервал и наоборот, чем меньше скорость охлаждения, тем уже интервал.

При значениях концентраций до $C < C_{\text{eut}}^A$ структура образца представляет собой макрокристаллы льда, являющиеся результатом обычной кристаллизации, в промежутках между которыми находятся прослойки расстекловывшегося раствора близкого к эвтектической концентрации. Приложенная к образцу нагрузка σ воспринимается макрокристаллами и кривые $\epsilon = \epsilon(T)$ в этом интервале фактически отражают дислокационную пластичность льда.

При концентрациях $C_{\text{гл}} > C_{\text{eut}}^B$ образец имеет аморфную структуру и его течение определяется вязкостью η аморфной фазы после ее расстеклования. Так как величина η растет с увеличением $C_{\text{гл}}$, то приращение деформации $\Delta \epsilon_{10}$ соответственно падает вплоть до концентрации $C_{\text{гл}} = 100\%$.

Аналогичные результаты для определения эвтектического концентрационного интервала были получены для водных растворов криопротектора полиэтиленоксида с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500).

Метод термопластической деформации позволяет исследовать особенности фазового состояния не только растворов криопротекторов, но и клеточных суспензий, тканей.

Из литературных данных был известен тот факт, что при предварительной инкубации клеток крови в растворе криопротектора ПЭО-1500 при температуре 0°C с последующим замораживанием клеточной суспензии результаты по выживаемости клеток крови оказывались выше, чем в случае, когда клетки замораживались без такой начальной обработки. В работе мы попытались объяснить этот эффект, используя данные по термопластике образцов.

Из рис. 5 хорошо видно, что сразу после расстеклования аморфной фракции скорость пластического течения образцов из эритромаcсы, которая инкубировалась с криопротектором при температуре 22°C (кривая 2), значительно выше скорости пластического течения образцов из эритромаcсы, инкубированной при 0°C (кривая 1). Это означает, что процесс низкотемпературной сборки кластеров из молекул криопротектора в клеточной суспензии, инкубированной перед охлаждением при 0°C , в значительной степени подавлен. Этот факт можно объяснить предположив, что при достаточно длительной выдержке при 0°C некоторая часть молекул ПЭО-1500 адсорбируется на поверхнос-

ти клеток. В результате подвижность молекул криопротектора снижается и создаются энергетически благоприятные условия для начала сшивки молекул криопротектора на поверхности клеток при более высоких температурах, что в дальнейшем приводит к обрастанию клеток кластерами из молекул ПЭО-1500 и соответствующему уменьшению концентрации этих молекул в общем объеме раствора. Поэтому при дальнейшем охлаждении этой клеточной суспензии процесс низкотемпературной сборки кластеров во внеклеточной среде заторможен. Соответственно менее активно протекают связанные с этим процессы низкотемпературного эвтектического расслоения раствора криопротектора, происходящие в интервале температур $-35...-65^{\circ}\text{C}$. Поскольку низкотемпературное эвтектическое расслоение наиболее опасно с точки зрения повреждения охлаждаемых клеток, то их сохранность должна быть значительно выше в случае предварительной инкубации клеточной суспензии при умеренно низких температурах.

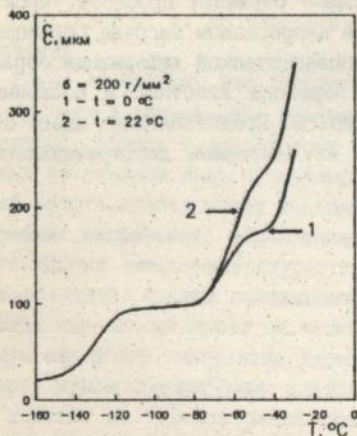


Рис. 5. Термопластические кривые эритроцитической массы человека, инкубированной с 30%-ным раствором ПЭО-1500 при температуре 0°C (кривая 1) и 22°C (кривая 2).

В экспериментальной биохимии традиционно большое внимание уделяется исследованию конформационной подвижности молекул белков как одному из основных факторов, определяющих их реакционную способность. Особую важность данная проблема приобретает при исследовании механизма холодной адаптации гетеротермов, где структурно-функциональные свойства белковых молекул изменяются в зависимости от физиологического состояния животных.

Исследуя с помощью метода термопластической деформации плазмы крови сусликов, находящихся в состоянии зимней спячки, при искусственно вызванном пробуждении и бодрствовании, удалось получить новые данные по низкотемпературной динамике белковых молекул.

При низких температурах ($-100^{\circ}\text{C} \dots -20^{\circ}\text{C}$) метод термопластической деформации очень чувствителен к химическому составу межзеренных прослоек и определяется эффективной вязкостью этих прослоек, которая зависит от подвижности внешних фрагментов входящих в прослойки белковых молекул.

Чтобы выделить межзеренное скольжение в чистом виде были построены дифференциальные термопластические кривые, которые представляют собой разность пластической деформации двух образцов, замороженных и отогретых в одинаковых условиях: плазмы крови суслика и закристаллизованного физиологического раствора. Это позволило вычлесть деформацию, связанную с дислокационной пластичностью во всем исследованном интервале температур. В результате регистрируемые дифференциальные термопластические кривые отражают процессы, происходящие в межзеренных прослойках при непрерывном нагреве образцов.

Эффект резкого уменьшения термопластической деформации образцов из плазмы крови сусликов при переходе животных в состояние зимней спячки наглядно показан на рис. 6. Представленная здесь зависимость $\epsilon_s = \epsilon_s(t_{\text{рект.}})$ получена на основании дифференциальных

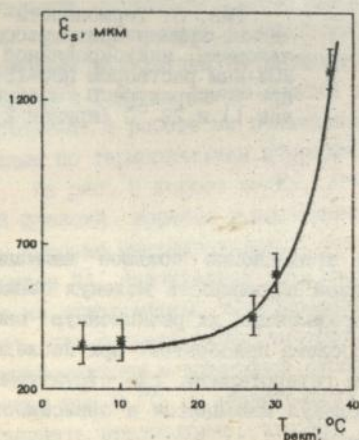


Рис. 6. Влияние температуры тела животного на суммарную термопластическую деформацию замороженных образцов плазмы крови сусликов.

термопластических кривых, где деформация ϵ_{Σ} в каждом из четырех исследованных случаев (температура тела животного 5, 10, 27, 37 °C) определялась как суммарная термопластическая деформация замороженного образца к моменту достижения им температуры -20 °C. Данный эффект может быть связан с появлением в плазме естественных модификаторов, которые могут адсорбироваться на белковых молекулах и достаточно сильно менять микровязкость среды, с которой контактируют фрагменты белковых молекул.

На основании экспериментальных данных, полученных с помощью метода термопластической деформации, в работе показана возможность оптимизировать технологию криоконсервирования клеточных суспензий.

Материалом для исследований служил костный мозг мышей-гибридов F_1 (СВА x C57 B16). Суспензию клеток готовили на растворе ЦОЛИП-3 с добавлением 15 % глицерина и 10 % мышиной сыворотки. Влияние различных скоростей охлаждения (нагрева) на биологическую полноценность клеток костного мозга оценивали по изменению функции стволовых клеток: их пролиферативной активности, дифференцировки и вызревания.

Ранее считалось, что существует лишь две причины возникновения внутренних напряжений: градиенты температур в охлаждаемом (нагреваемом) образце и анизотропия теплового сжатия (расширения) отдельных кристаллов льда в твердофазной матрице. Проведенные в настоящей работе исследования выявили еще один механизм возникновения внутренних напряжений: образование микрокристаллов льда, сопровождающее эффект низкотемпературного эвтектического расслоения растворов полиолов. Оценки показывают, что характерная амплитуда возникающих напряжений может на несколько порядков превосходить характерную амплитуду внутренних термоупругих напряжений. Поэтому сохранность криоконсервируемых клеточных суспензий в значительной степени зависит от удачной реализации попыток уменьшить этот эффект. Исходя из полученных экспериментальных данных по термопластике криоконсервирующего раствора был предложен следующий оптимальный режим охлаждения (нагрева) криоконсервируемых клеточных суспензий.

На первом этапе замораживания, определяемом интервалом температур от комнатной до температуры начала кристаллизации, происходит частичная адсорбция молекул криопротектора на клетках и их агрегация в растворе. Оба эти эффекта в дальнейшем уменьшают интенсивность процесса низкотемпературного эвтектического расслоения и связанного с ним явления докристаллизации освобождающихся молекул

воды. Поэтому этот этап необходимо проходить с минимальными скоростями охлаждения (менее 1 град/мин), чтобы обеспечить необходимое развитие процессов адсорбции и агрегации молекул криопротектора.

Второй этап охлаждения охватывает интервал от температуры начала кристаллизации до температуры начала низкотемпературного эвтектического расслоения раствора криопротектора. В этом диапазоне температур охлаждение можно вести с обычно применяемыми в криобиологии скоростями: 5...10 град/мин.

Третий этап охлаждения определяется интервалом температур, в котором при охлаждении или нагреве наблюдается явление низкотемпературного эвтектического расслоения раствора криопротектора. Этот этап следует проходить с максимально возможными скоростями изменения температуры (выше 20...50 град/мин), чтобы уменьшить время нахождения криоконсервируемого объекта в этом интервале температур и, следовательно, снизить влияние явления низкотемпературного эвтектического расслоения как одного из основных повреждающих факторов на этом этапе.

Четвертый этап охлаждения наступает при переходе системы в полностью твердофазное состояние (ниже температуры стеклования биосистемы) и продолжается до конечной температуры охлаждения -196°C (температуры жидкого азота, при которой будет храниться замороженная клеточная суспензия). На этом этапе следует вновь уменьшить скорость охлаждения до 1...5 град/мин для уменьшения амплитуды внутренних термоупругих напряжений, связанных с градиентом температур в образце.

Согласно имеющимся экспериментальным данным в процессе охлаждения тканей ниже температуры начала кристаллизации воды в них неизбежно развиваются такие повреждения, как механические пробои мембран клеток, фрагментация основных молекулярных комплексов, изменение пространственной структуры отдельных элементов тканей. Основным механизмом, способным вызвать такие повреждения по всему объему охлаждаемой биосистемы, является пластическая релаксация термоупругих напряжений. Этот механизм особенно важен для тканей и органов, где явления, связанные с развитием осмотических давлений и концентрационных эффектов в значительной степени подавлены спецификой кристаллизации воды в этих объектах.

В связи с этим особую важность приобретает проблема фазового анализа тканей и определения температурных интервалов, в которых возникают оптимальные условия для реализации деформационного меха-

низма повреждений, что однозначно можно определить при помощи метода термопластической деформации.

Термопластические кривые были получены для целого ряда тканей животных. Типичный вид таких кривых показан на примере поперечно-полосатой мышцы бедра крысы и мозга крысы (рис. 7). Представленные кривые имеют ярко выраженный многостадийный характер, причем каждая из стадий соответствует определенному фазовому состоянию ткани. Температуры начала фазовых переходов T_m для разных тканей могут сильно отличаться. Экспериментально было получено, что для тканей головного мозга $T_m = -77^\circ\text{C}$, в то время как для ткани желудка крысы она составляет $T_m = -38^\circ\text{C}$. Температура плавления ткани почки крысы $T_m = -62^\circ\text{C}$, ткани сердца $T_m = -44,5^\circ\text{C}$, ткани поперечно-полосатой мышцы бедра крысы $T_m = -43^\circ\text{C}$.

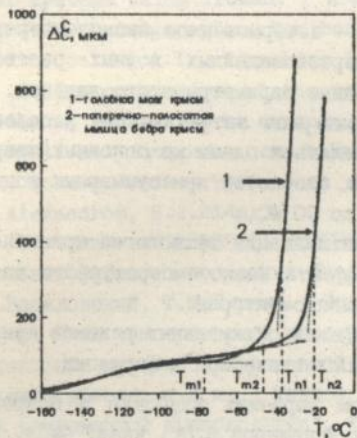


Рис. 7. Типичный вид термопластических кривых замороженных образцов тканей животных.

Таким образом, термопластические кривые могут служить объективным тестом при определении температурных интервалов наибольшего повреждения охлаждаемых тканей. Так на основании рис. 7 можно сделать вывод, что для повышения эффективности криодеструкции необходимо обязательно охлаждать ткани ниже температуры T_m , где образцы переходят в полностью твердофазное состояние и процессы повреждения необратимы. В то время, как при охлаждении образцов до температуры T_m процессы механических повреждений ткани не успевают развиться в полной мере и возможна неполная криодеструкция ткани.

ВЫВОДЫ

1. Разработан новый метод фазового анализа растворов криопротекторов и криоконсервируемых биосистем, а также определения температурных зависимостей их упруго-пластических свойств - метод термопластической деформации.

2. Создана установка с набором деформационных устройств для реализации метода термопластической деформации в криобиологических экспериментах.

3. Методом термопластической деформации исследована кинетика фазовых и структурных превращений в охлаждаемых растворах криопротекторов и биосистемах и определены изменения упруго-пластических свойств изучаемых образцов, сопровождающие эти превращения.

4. Показана эффективность метода термопластической деформации при получении данных для построения полных диаграмм состояния растворов криопротекторов.

5. Обнаружено новое явление - заторможенное низкотемпературное эвтектическое расслоение переохлажденных водных растворов криопротекторов и определены основные параметры этого явления.

6. Показано, что низкотемпературное эвтектическое расслоение растворов криопротекторов может являться одним из основных повреждающих факторов криоконсервируемых биосистем при суммарных концентрациях криопротекторных веществ до 30 %.

7. Сформулированы принципы оптимизации технологий криоконсервирования биосистем с учетом эффекта низкотемпературного эвтектического расслоения растворов криопротекторов.

8. Разработаны методы определения оптимальных режимов криодеструкции тканей на основе их термопластической деформации.

Считаю своим приятным долгом выразить глубокую и искреннюю признательность доктору мед. наук Игнашевой Л.П., канд. биол. наук Бабийчук Л.А., канд. биол. наук Загнойко В.И., канд. мед. наук Василевскому В.Ю., канд. хим. наук Видному С.Ю. за постоянный интерес к разрабатываемым проблемам и помощь в проведении совместных экспериментов.

Материалы диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Влияние режима замораживания на сохранность эритроцитов, консервируемых под защитой 1,2-пропандиола. / Об.науч.тр.: Криоконсервирование клеток и тканей.- Харьков: ИПКиК АН Украины, 1989. - С. 43-48 (совместно с Печеным М.Л., Воротилиным А.М.).

2. Устройство для замораживания биообъектов.- А.с. 1464019. МКИ⁴ F 25 D 3/10.- Оpubл. 07.03.89.- Бюл. 9 (совместно с Печеным М.Л., Рудько Ю.М., Тодриным А.Ф.).
3. Универсальный объемный микротензодилатометр для исследования термодинамических характеристик неводных и смешанных растворителей./ В кн.: Тезисы II Всесоюзной конференции "Химия и применение неводных растворов", Харьков, ХГУ.- т.2.- 1989.- С. 121 (совместно с Осецким А.И., Бидным С.Ю.).
4. Применение тензодилатометрии для изучения кинетики расстворения растворов./ В кн.: Тезисы Всесоюзного семинара "Современные методы аттестации методик выполнения измерений".- Харьков, ХГУ.- 1990.- С. 92 (совместно с Осецким А.И., Бидным С.Ю.).
5. New methods of determination of the phase state of biological systems being frozen. / Abstracts of XVIII-th International Congress of Refrigeration, Montreal, Canada.- 1991.- P. 161 (jointly with Osetsyky A.I., Ignashova L.P.).
6. Thermodynamics of the processes of low temperature association of molecules in aqueous polyol solutions. / Abstracts of International Symposium on Calorimetry and Chemical Thermodynamics, Moscow, USSR.- 1991.- p. 141 (jointly with A.I.Osetsyky, J.G.Alexandrov, S.J.Bidny).
7. Заявка №4903585/14 (006381). МКИ⁵ G 01 N 33/483. Способ определения фазового состояния биологических объектов./ А.И.Осецкий, В.Д.Василовский, Т.М.Гурина.- Пол.реш.на выд. патента от 12.10.91.
8. Низкотемпературное консервирование щитовидной железы. Трансплантация криоконсервированной щитовидной железы как метод лечения гипотиреоза. / В кн.: Тезисы II Международной конференции "Успехи современной криобиологии", Харьков.- 1992.- С. 147 (совместно с Пушкарем Н.С., Осецким А.И., Македонской В.А.).
9. Исследование фазовых состояний замороженных растворов и биосистем методом термопластической деформации. // Проблемы криобиологии.- 1992.- н 2.- С.24-29 (совместно с Осецким А.И.).
10. Термопластические свойства замороженной плазмы крови зимоспящих животных. // Проблемы криобиологии.- 1992.- н 3.- С. 19-24 (совместно с Осецким А.И., Загнойко В.И.).
11. Заявка № 4900524/28. МКИ⁵ G 01 N 3/18. Устройство для испытания на сдвиг образцов материалов при низких температурах. / А.И.Осецкий, Т.М.Гурина.- Полож. реш. на выд. патента от 07.06.92.

Григорьев

Ответственный за выпуск академик АН Украины
директор ИШКиК АН Украины В.И.Грищенко

Подп. к печ. 12.04.93. Формат 60×84¹/₁₆. Бумага тип. Печать офсетная. Усл. печ. л. 10
Уч.-изд. л. 1.0. Тираж 110 экз. Зак. № 1812. Бесплатно.

Харьковское межвузовское арендное полиграфическое предприятие.
310093, Харьков, ул. Свердлова, 115.

As B. 22

161021

AB 27.254