

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ ТА КРІОМЕДИЦИНИ

на правах рукопису

Розанов Леонід Федорович

КІНЕТИКА РЕАКЦІЙ КЛІТИН НА ДІЮ ФАКТОРІВ
КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

03.00.22 - кріобіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дісертатії на здобуття вченого ступеню
доктора біологічних наук

Харків - 1995



AB 33.843

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології та
кріомедицини Національної Академії наук України

Науковий консультант:

доктор біологічних наук Є.О.Гордієнко

Офіційні опоненти:

академік НАН України, доктор біологічних наук,
професор

І.С.Магура

доктор біологічних наук, професор

В.О.Моисєєв

доктор біологічних наук, професор

Ю.П.Благой

Провідна установа:

Інститут фізіології ім. О.О.Вогомольця НАН України, м.Київ

Захист відбудеться "19" черта 1996 р. о 13³⁰
годині на засіданні спеціалізованої ради Д 50.21.01 при
Інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України
(310015, м.Харків, вул. Переяславська, 23)

Автореферат розіслано "1" феврале 1996 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради,

доктор медичних наук, професор

А.М.Гольцев

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність проблеми. Дослідження поведінки клітин в гіпо- та гіпертонічних розчинах речовин, які проникають або не проникають у клітини в умовах гіпо-, нормо- та гіпертермії, а також безпосередньо у циклі заморожування-відтавання, є одним з класичних підходів (Грищенко В.І., Білоус А.М., 1994) до вивчення закономірностей кріопшкодження та кріозахисту клітин. Визначена з експериментів реакція клітин на дію осмотичних факторів певної сили в сполученні з фізико-математичним аналізом поведінки клітин в аномальних умовах дає багату інформацію для аналізу причин та механізмів пошкоджуючого впливу різних фізичних факторів, які діють на різних етапах циклу кріоконсервування (Гордіснко Є.О., Пушкар М.С., 1994). Еквілібрація клітин у кріозахисних середовищах є важливим етапом оптимізації методів кріоконсервування та задовільною моделлю щодо прогнозу пошкодження клітин осмотичним фактором у процесі заморожування-відтавання. Вивчення процесів та явищ, що виникають на цьому етапі у клітинній суспензії, як правило, стає частиною будь-якого системного дослідження кріобіологічних проблем і дає суттєву інформацію про об'єкт, який консервується. Вона необхідна для фізико-математичного моделювання (Mazur P., Miller R.H., 1976) та визначення можливого характеру пошкодження клітин на послідовних етапах циклу кріоконсервування. Не зважаючи на велику різноманітність відгуків різних біологічних об'єктів на однотипні екстремальні впливи можна визначити деякі універсальні неспецифічні реакції та ознаки пошкодження, які є загальними, практично, для усіх клітин. До таких реакцій, зокрема, належать дегідратація та регідратація клітин (Merzhan N.T., 1974), явища набухання та утворення мембранних пухирів (Bernard A.G., Fuller B.J., Shaw R.W., 1990).

Вивчення динаміки росту останніх, можливо, має значення не тільки у випадку визначення механізмів кріпошкодження, воно має зв'язок також і з фундаментальною проблемою будови клітини та її фізико-хімічного стану.

Дане дослідження ґрунтувалось на вивченні кінетики процесів дегідратації, регідратації та набухання клітин методами експериментального та фізико-математичного моделювання на етапах екілібрації у розчинах кріопротекторів та солей, а також у процесі заморожування-відтавання.

Метою дослідження було вивчення закономірностей розвитку реакцій клітин різного типу на дію факторів, які супроводжують заморожування-відтавання, та умов, при яких ці реакції мають місце.

Задачі дослідження. У згоді з поставленою метою було передбачено вирішити такі задачі.

1. Визначити умови та динаміку пошкодження клітин концентрованими розчинами кріопротекторів та солей.

2. Вивчити, як впливають умови протікання процесів дегідратації та внутрішньоклітинної кристалізації на динаміку розвитку реакцій клітин різного типу на ці фактори.

3. Вивчити кінетику змінювання об'єму клітин, поза- та внутрішньоклітинної концентрацій кріопротектору та солі при ізотермічній експозиції клітинних суспензій у розчинах кріопротекторів з різною концентрацією проникаючих та не проникаючих у клітини добавок при варіюванні щільності суспензії та інших параметрів з залученням засобів експериментального та фізико-математичного моделювання.

4. Вивчити кінетику змінювання об'єму клітин, внутрішньоклітинних концентрацій кріопротектора і солі та внутрішньоклітинного переохолодження при заморожуванні клітинних суспензій з різною швидкістю та варіюванні інших найбільш

вагомих параметрів засобами експериментального та фізи-ко-математичного моделювання.

Наукова новизна. Вперше вивчені закономірності явища набухання клітин різного типу з пошкодженою та інтактною мембраною у процесі заморожування клітинної суспензії та експозиції клітин в середовищах різного складу. Одержані експериментальні та теоретичні дані, які не погоджуються з класичними уявленнями щодо механізмів та закономірностей кріопшкодження клітинних структур та свідчать, що для їх пояснення, аналізу та тлумачення необхідно залучати не тільки положення мембранної теорії проникності, але й положення фазової теорії будови клітини. Отримані нові, не відомі раніше дані щодо динаміки передгемолітичних трансформацій та кінетики гемолізу еритроцитів у гіпертонічних розчинах кріопротекторів та солей. Одержані дані щодо залежності кристалізації в клітинних суспензіях від початкового переохолодження позаклітинного розчину та режиму кріоконсервування.

Теоретичне та практичне значення роботи. З залученням одержаних даних побудовано схему розвитку кріопшкодження клітин при заморожуванні та вказані можливі засоби їх кріо-захисту. За допомогою чисельного моделювання отримані нові дані щодо процесів масопереносу між клітинами та оточуючим їх середовищем на різних етапах циклу кріоконсервування. Спираючись на ці дані, сформульовано рекомендації щодо оптимізації засобів кріоконсервування. Теоретично вагомими є результати щодо кінетичних особливостей розвитку процесу гемолізу у середовищах різного складу. З практичної точки зору важливими є дані про залежність кінетики процесів масопереносу у клітинній суспензії, яка консервується, від щільності клітин у суспензії, а також дані щодо кінетики переохолодження внутрішньоклітинного середовища на етапі криста-

лізації.

ПОЛОЖЕННЯ, ЯКІ ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ.

1. Набухання є універсальною неспецифічною реакцією клітин не тільки на дію гіпотонії, але й на пошкоджуючу дію заморожування-відтаювання та гіпертонічних розчинів солей та кріопротекторів. Опір, який чинить цитоматрикс клітин розтягуванню під час набухання, веде до утворення мембранних пухирів, які продовжують осмотичну реакцію клітин.

2. Щільність клітин у суспензії безпосереднього впливу на процеси масопереносу на етапі кристалізації не має, але існує її посередній вплив, який відбувається через характеристики біооб'єкту, які він набуває під час експозиції у кріозахисному середовищі: збільшення щільності клітин у суспензії на етапі експозиції у кріозахисному розчині веде до зниження ступеня їх збезводнення, рівня насичення кріопротектором та пікового значення концентрації внутрішньоклітинного електроліту, що, в свою чергу, впливає на кінетику переохолодження клітин на етапі кристалізації.

3. Переохолодження позаклітинного розчину веде до зниження швидкості охолодження, при якій стає можливою кристалізація всередині клітини; переохолодження внутрішньоклітинного середовища під час охолодження з постійною швидкістю, в свою чергу, зростає монотонно тільки під час швидкого охолодження та коли відсутня суттєва дегідратація клітин до початку заморожування - в інших випадках за стадією зростання переохолодження настає стадія його виразного зниження.

4. Кінетика гемолізу еритроцитів у розчинах гліцерина, 1,2-пропандіола та діметилсульфоксида, які є гіпотонічними по відношенню до непроникаючого компонента, в області концентрацій від 5 до 20% при зниженні температури гальмується,

а в області концентрацій вище, ніж 30% -40%, навпаки, має місце її прискорення.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на I та II Міжнародних конференціях по кріобіології (Харків, 1988, 1992 рр.), на II Всесоюзній конференції по анабіозу (Рига, 1984), щорічних робочих нарадах по проблемі "Консервація генетичних ресурсів" (Пушино, 1983, 1990, 1992)

Публікації. По матеріалам дисертації опубліковано 2 монографії та 23 статті.

Обсяг та структура роботи. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, трьох глав, в яких викладені результати власних досліджень та їх обговорення, заключення, висновків та списку літератури, який містить 254 джерела. Робота викладена на 242 сторінках машинописного тексту, містить 86 малюнків та 6 таблиць.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для вирішення сформульованих задач були використані методи кріомікроскопії, спектрофотометрії, фазовоконтрасної мікроскопії, вольюміметрії, осмометрії та фізико-математичного моделювання кріобіологічних процесів.

Об'єктами дослідження у роботі були еритроцити донорської крові, клітини кісткового мозку щура, клітини перитонеального ексудату, тканеві лімфоцити, яйцеклітини та ембріони миші.

У кріомікроскопічних дослідженнях як криопротектори були використані гліцерин та поліетиленгліколь з молекулярною масою 400 (ПЕО-400). При дослідженні кінетики осмотичних реакцій та набування клітин у розчинах криопротекторів та солей були використані ПЕГ-100, ПЕГ-400, ПЕГ-1500, гліцерин,

1,2-пропандіол (1,2-ПД), діметилсульфоксид (ДМСО), хлорид та цитрат натрія.

Вивчення процесів заморожування-відтаювання здійснювали за допомогою виготовленого нами кріопрстрою до мікроскопу. Температура зразка у кріопрстрої вимірювалася за допомогою хромель-копелевої термопари та потенціометру та була об'єктом регулювання програмним блоком. Під час кріомікроскопічних досліджень був використаний інтерференційно-поляризаційний мікроскоп PSO-5 (Польща) у режимі інтерференційного контрасту у складі мікроустановки MKU-3.

Вивчення кінетики процесів, що відбуваються в біологічних об'єктах на етапі експозиції у кріозахисних середовищах, проведено за допомогою установки, яка була зазначена вище, або за допомогою інвертованого мікроскопу МБІ-13 у режимі фазового контрасту з реєстрацією реакцій, які спостерігалися, на кіноплівку. Крім того, вивчення кінетики гемолізу еритроцитів в середовищах різного складу було проведено на спектрофотометрі "Pye Unicam SP-8000" по стандартній методиці.

В цих дослідженнях 10 мкл крові додавалось до кювети спектрофотометру, яка містила 3 мл розчину кріопротектора при певній температурі у діапазоні від 5°C до 37°C. Температуру у кюветі підтримували за допомогою спеціального пристрою. Кінетику зміни мутності суспензії (при $\lambda = 760$ нм) реєстрували безпосередньо після перемішування крові з кріопротектором.

Осмотичні характеристики розчинів вивчали вимірюванням депресії точки плавлення кожного розчину за допомогою термометра Бекмана або мікроосмометра ОМКА-Ц-ОІ.

Обчислення відносних клітинних об'ємів (площ) було проведено або за допомогою проєцирування фотографічних зобра-

жень клітин (на однорідному за товщиною папері), або вимірюванням середнього діаметру зображення клітини. Статистичну обробку цифрових даних проводили за стандартною методикою Стьюдента-Фішера.

Кількісний аналіз процесів масопереносу на деяких етапах циклу кріоконсервування клітинної суспензії здійснювали за допомогою ЕОМ шляхом вирішення рівнянь термодинаміки необоротних процесів, адаптованих (Гордієнко Є.О., 1989) до кріобіологічних задач.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

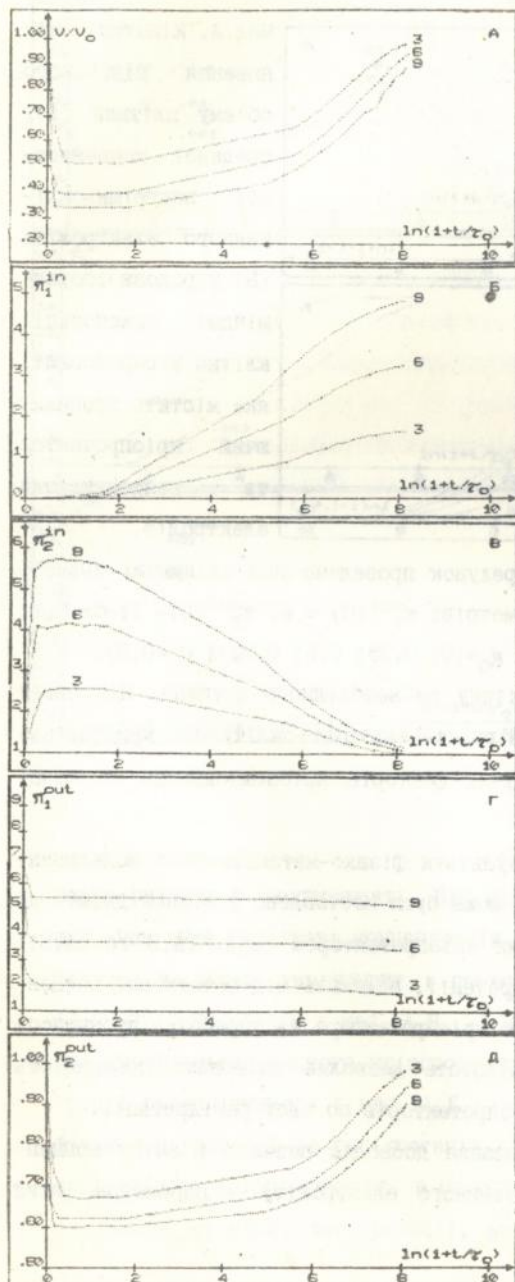
Осмотичні реакції клітин і процеси масопереносу на етапі ізотермічної експозиції у розчинах солей та еквілібрації у розчинах кріопротекторів.

Чисельне моделювання процесів масопереносу на етапі ізотермічної експозиції клітин у комбінованому водному розчині проникаючого кріопротектору та непроникаючої солі, яке засновано на мембранній теорії проникності, дозволило нам вивчити кінетику зміни клітинного об'єму, поза- та внутрішньоклітинних концентрацій кріопротектора та електролітів при різних початкових значеннях деяких, найбільш вагомих, параметрів. Система диференціальних рівнянь містить у собі коефіцієнти проникності клітинної мембрани до кріопротектору (k) та води (L_p); відношення площі поверхні клітини до її об'єму (γ); відносні початкові значення поза- (out) та внутрішньоклітинних (in) концентрацій кріопротектора ($\hat{\pi}_1(0)$) і солі ($\hat{\pi}_2(0)$), які визначали як відношення поточних значень осмотичного тиску до осмотичного тиску фізіологічного розчину; відношення загального об'єму клітин до повного об'єму суспензії (далі: щільність клітин у суспензії або гематокрит - g_0), об'ємну частку осмотично неактивних речовин у клітині (α), коефіцієнт відбиття (σ) та інш. Одержані у процесі

чисельного моделювання дані були подані в залежності від безрозмірного параметра $\ln(1 + t/\tau_0)$, де t - поточний час, а $\tau_0 = (\gamma_{LP} \pi_2^{\ln}(0))^{-1}$, де, в свою чергу, $\pi_2^{\ln}(0)$ - осмотичний тиск фізіологічного розчину.

Аналіз результатів чисельного моделювання вказує, що реакція клітин на експозицію у гіпертонічних розчинах містить у собі, як і очікувалося, дві фази: фазу дегідратації та фазу регідратації. Рівень дегідратації виявляє виразну залежність не тільки від концентрації криопротектора в позаклітинному середовищі, але й від щільності клітин у суспензії (мал. 1А та 2А): чим менше щільність, тим більше дегідратація, та навпаки. З даних, які зведені на мал. 1А, також випливає, що рівномірне зростання концентрації криопротектора в позаклітинному середовищі викликає нерівномірне зменшення об'єму клітини, яка збезводнюється. У діапазоні великих концентрацій збезводнення зростає менш виразно, ніж у діапазоні малих. Це пояснює ефект так званого "мінімального об'єму", який спостерігається в експерименті, без залучення спірних уявлень Мегуан Н.Т. щодо механічного опору клітини стисненню.

Аналіз фази регідратації вказує на те, що її тривалість залежить не тільки від параметру проникності, але, крім того, від концентрації проникаючої речовини у позаклітинному середовищі (мал 1А; 3А). В свою чергу, рівень регідратації залежить, перш за все, від концентрації непроникаючого компонента в позаклітинному середовищі: чим вона вище, тим менше об'єм, який досягається клітиною з часом (мал 4А). Отже, залучення до криозахисту комбінованого розчину, який включає речовини, що проникають, і речовини, які не проникають крізь мембрани клітин, дозволяє на етапі еквибрації не тільки досягнути необхідної концентрації криопротектора у клітині,



Мал.1. Кінетика змі
нення відносного
об'єму клітини (А),
зведених концентрацій
внутрішньо- (Б) та
позаклітинного (Г)
кріопротектора, внут-
рішньо- (В) та позак-
літинного (Д) елект-
роліта упродовж ізо-
термічної експозиції
клітин у середовищі,
яка містить проникаю-
чий кріопротектор та
непроникаючий елект-
роліт.

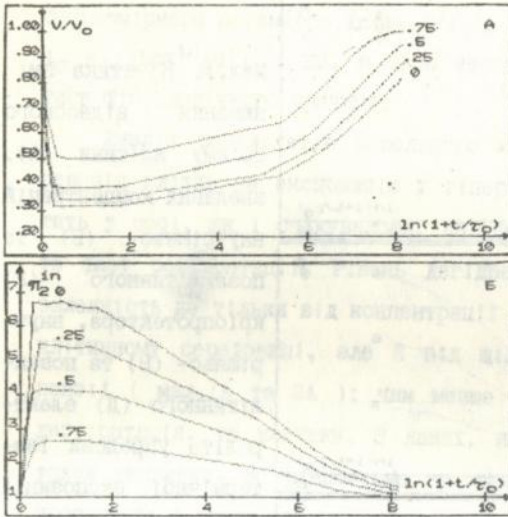
Розрахунок проведено
при наступних значен-
нях параметрів:

$$\pi_1^{out}(0) = (3, 6, 9);$$

$$\pi_2^{out}(0) = 1; \alpha = 0,2;$$

$$A = \frac{k}{Lp \pi_2^{in}(0)} = 0,001;$$

$$g_0 = 0,5; \sigma = 0,95.$$



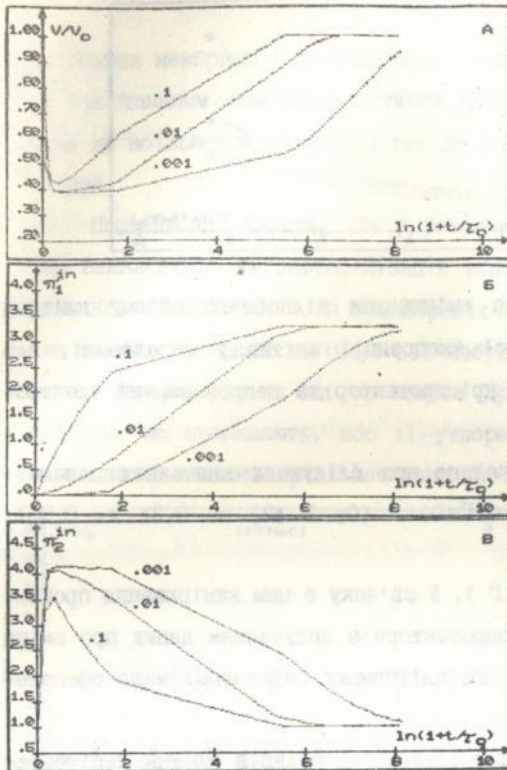
Мал.2. Кінетика змі-
нення відносного
об'єму клітини (А),
зведеної концентра-
ції внутрішньоклі-
тинного електроліта
(Б) упродовж ізотер-
мічної експозиції
клітин у середовищі,
яке містить проника-
ючий криопротектор
та непроникаючий
електроліт.

Розрахунок проведено при наступних значен-
нях параметрів: $\pi_1^{out}(0) = 6$; $\pi_2^{out}(0) = 1$; $\alpha = 0,2$;
 $A = 0,01$; $g_0 = (0; 0,25; 0,5; 0,75)$; $\sigma = 0,95$.

але і збезводити клітину до необхідного ступеня. Ці обидва
ефекти знижують імовірність внутрішньоклітинної кристаліза-
ції - одного з ведучих факторів крипошкодження на етапі
заморожування.

Як свідчать результати фізико-математичного моделюван-
ня, час регідратації може бути поставлено у відповідність до
часу насичення клітин криопротектором (мал. 1А,Б та 3А,Б),
який, як і час регідратації, залежить від початкової концен-
трації позаклітинного криопротектора та параметру проникнос-
ті. Знайдена відповідність дозволяє оцінювати проникність
клітин до різних криопротекторів по часу регідратації.

Чисельне моделювання дозволяє вивчити і зміни концен-
трації внутрішньоклітинного електроліту - параметра, який



Мал.3. Кінетика змі-
нення відносного
об'єму клітини (А),
зведених внутрішньо-
клітинних концентра-
цій кріопротектора
(Б) і електроліта
(В) упродовж ізотер-
мічної експозиції
клітин у середовищі,
яка містить проника-
ючий кріопротектор
та непроникаючий
електроліт.

Розрахунок проведено
при наступних значеннях параметрів:

$$\pi_1^{\text{out}}(0) = 6;$$

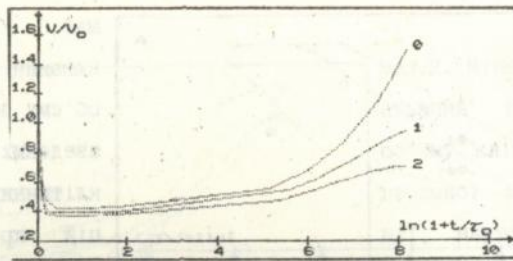
$$\pi_2^{\text{out}}(0) = 1; \alpha = 0,2;$$

$$A = (0,001; 0,01;$$

$$0,1); g_0 = 0,5;$$

$$\sigma = 0,95.$$

важко оцінити в експерименті. Пік цієї концентрації тим ви-
щий, чим вище початкова концентрація позаклітинного кріопро-
тектора та менше гематокрит і параметр проникності (мал.
1В,2В,3В). Як слідує з мал.1А,В, 2А,В,3А,В, зміни концентра-
ції внутрішньоклітинного кріопротектора, як і зміни концен-
трації позаклітинного (мал.1А,Д), задовільно відповідають
фазам дегідратації та регідратації клітин. Концентрація по-
заклітинного кріопротектора, в свою чергу, виразно змінюєть-
ся тільки на етапі дегідратації, на етапі регідратації її



Мал.4. Кінетика змінювання відносного об'єму клітини упродовж ізотермічної експозиції клітин у середовищі, яке містить проникаючий кріопротектор та непроникаючий електроліт.

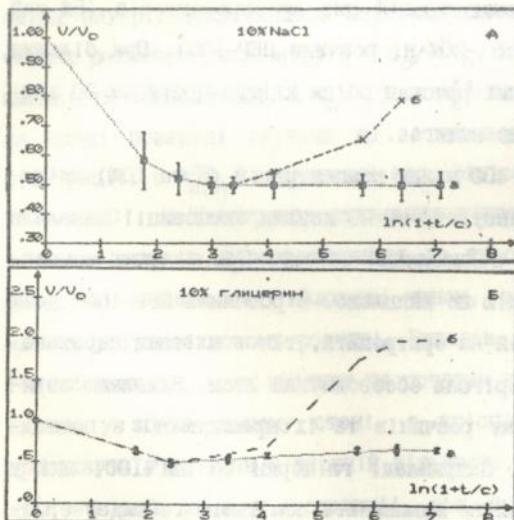
Розрахунок проведено при наступних значеннях параметрів: $\pi_1^{\text{out}}(0) = 6$; $\pi_2^{\text{out}}(0) = (0; 1; 2)$; $\alpha = 0,2$; $A = 0,001$; $\varepsilon_0 = (0,5)$; $\sigma = 0,95$.

зміни малі (мал.ІА,Г). У зв'язку з цим вимірювання проникності клітин до кріопротектора з залученням даних про зміни його концентрації у позаклітинному середовищі мало ефективно.

Вивчення кінетики осмотичних реакцій клітин перитонеального ексудату миші та еритроцитів людини у розчинах NaCl, цитрату натрія та ряду кріопротекторів з ізотонічною концентрацією NaCl показало, що в загальних рисах ця кінетика прогнозується у межах мембранної теорії проникності. У розчинах непроникаючих речовин (NaCl, цитрат натрія та ПЕГ-І500) клітини після дегідратації, рівень якої залежить від осмотичного тиску розчинів, залишаються дегідратованими аж до порушення проникності клітинних мембран. У розчинах речовин з різним ступенем проникності (гліцерин, ПЕГ-100 та ПЕГ-400) за фазою дегідратації настає фаза регідратації, яка триває тим менше, чим вище проникність клітини до даної речовини.

Порушення мембранної проникності, імовірність якого зростає зі зростанням осмотичного тиску розчину, у цьому випадку веде до збільшення об'єму клітин до рівня, що вищий за початковий.

Пошкодження клітин, яке у розчинах непроникаючих речовин виявляється як дестабілізація збезводненого стану, а в розчинах проникаючих – як прискорення процесу регідратації і яке в обох випадках закінчується набуханням клітин (мал.5), можна інтерпретувати як зростання проникності мембран до речовин, що проникають, або її утворення до речовин, що у нормі не проникають крізь мембрани клітин.



Мал.5. Кінетика змінення відносного об'єму клітин перитонеального ексудату упродовж експозиції в розчинах NaCl (А) і гліцерина (Б).

Примітка: криві а і б демонструють осмотичну поведінку клітин, які зазнають пошкодження в процесі експозиції.

Вивчення динаміки набухання пошкоджених дегідратацією еритроцитів та клітин перитонеального ексудату показало, що, якщо при набуханні останніх клітинний об'єм зростає монотонно, еритроцити протягом набухання демонструють не менш, ніж дві рознесені у часі трансформації, в ході яких мікроскопічне зображення еритроцитів приймає форму неповного, а по-

тім повного круга.

У зв'язку з визначеною при аналізі результатів чисельного моделювання відповідністю часу, за який клітинний об'єм повертається до початкового значення, часу насичення клітини кріопротектором була проведена оцінка проникності клітин перитонеального ексудату та еритроцитів до розчинів гліцерина, ПЕГ-100, ПЕГ-400 та ПЕГ-1500. Встановлено, що для насичення еритроцитів розчинами гліцерину та ПЕГ-100 навіть у концентраціях 30-40% досить експозиції протягом двох-трьох хвилин, тоді як клітини перитонеального ексудату за 20 хвилин експозиції встигають відновити початковий об'єм тільки у присутності малих концентрацій цих кріопротекторів (5%-ний розчин гліцерину та 5-20%-ні розчини ПЕГ-100). При більших концентраціях вказаних речовин об'єм клітин протягом 20 хвилин відновлюватися не встигає.

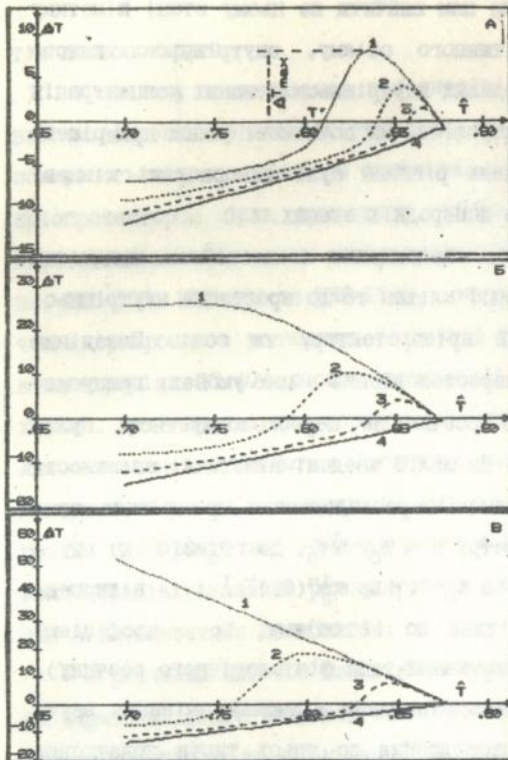
В розчинах ПЕГ-400 малих концентрацій (5 та 10%) клітини перитонеального ексудату за 20 хвилин експозиції виявляли тільки тенденцію до відновлення об'єму. При більших концентраціях таку тенденцію не виявлено. В розчинах ПЕГ-1500 усіх вивчених концентрацій як еритроцити, так і клітини перитонеального ексудату зберігали збезводнений стан. Виявлено зв'язок осмотичного тиску розчинів та їх проникності з пошкодженням клітин. Так, наприклад, гліцерин та ПЕГ-100, які у високих концентраціях не викликають помітного гемолізу еритроцитів, пошкоджували клітини перитонеального ексудату. ПЕГ-400 та ПЕГ-1500, в свою чергу, завдяки порівняно низькому осмотичному тиску їх розчинів за час експозиції до помітного порушення мембранної проникності не приводили.

Реакції клітин на дію факторів заморожування-відтаювання

Чисельне моделювання процесів масопереносу на етапі

кристалізації дозволило нам вивчити на цьому етапі кінетику зміни відносного клітинного об'єму, внутрішньоклітинного переохолодження та зведених внутрішньоклітинних концентрацій кріопротектора та електроліта. Як початкові умови при рішенні системи диференціальних рівнянь були використані кінцеві значення параметрів на попередніх етапах.

Як і очікувалося, охолодження з постійною швидкістю приводило до дегідратації клітин та до зростання внутрішньоклітинних концентрацій кріопротектору та солі. Поведінка внутрішньоклітинного переохолодження в цих умовах, припускаючи, що позаклітинний розчин не переохолоджується, була, однак, більш складною. На мал.6 зведені кінетичні залежності зміни внутрішньоклітинного переохолодження при різних значеннях режимного параметру $\beta = T_0 / \dot{T}_0$, де $T_0 = 310$ К, \dot{T} - швидкість охолодження, а $\tau_0 = (\gamma L_p \pi_2^{in}(0))^{-1}$ (γ - відношення площі поверхні клітини до її об'єму, L_p - коефіцієнт фільтрації, а π_2^{in} - осмотичний тиск фізіологічного розчину). Мал. 6А, Б і В ілюструють ставлення кінетики змінення внутрішньоклітинного переохолодження до трьох типів початкових умов, що впливають, головним чином, з умов екілібрації клітин у кріозахисному розчині. Випадок А відповідає недовгій експозиції, коли клітини на початку кристалізації знаходяться у збездвоєному стані, а кріопротектор не встигає проникнути у клітини в значній кількості. Випадок Б відповідає середній довжині експозиції, при якій об'єм клітини до початку кристалізації встигає відновитися тільки до значення 0,698Vo, але концентрація кріопротектора у клітині велика. Нарешті, випадок В відповідає експозиції, при якій об'єм клітини встигає майже повністю відновитися, а концентрація кріопротектора близька до рівня насичення. Як видно з малюнку 7, переохолодження внутрішньоклітинного розчину зростає



Мал.6. Кінетика змі-
нення внутрішньо-
клітинного переохолодження під час заморожування.

Розрахунок проведено при наступних значеннях параметрів:
 $\beta = T_0 / T^* \tau_0 = -1,25$
 (1); -2,5 (2);
 -6,2 (3); -310 (4);

(A) - $y_0 = 0,46$;

$\pi_1^{in}(0) = 1,149$;

$\pi_1^{out}(0) = 3,641$;

$\pi_2^{out}(0) = 0,59$;

(B) - $y_0 = 0,698$;

$\pi_1^{in}(0) = 5,389$;

$\pi_1^{out}(0) = 6,0$;

$\pi_2^{out}(0) = 1$;

(B) - $y_0 = 0,902$;

$\pi_1^{in}(0) = 3,187$;

$\pi_1^{out}(0) = 3,416$;

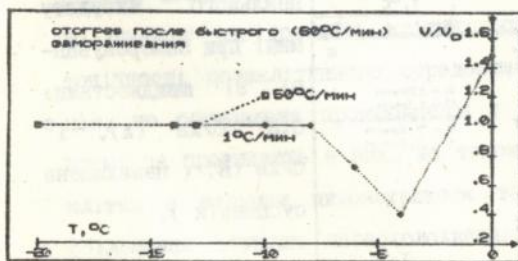
$\pi_2^{out}(0) = 0,91$.

із зниженням температури монотонно тільки при малих абсолютних значеннях параметру β . Із зменшенням цього параметру внутрішньоклітинне переохолодження суттєво змінюється. Спочатку йде його зростання, а потім зниження з переходом до області від'ємних значень. Дегідратація клітин до початку кристалізації, в свою чергу, веде до повного переходу від монотонного зростання переохолодження до його двофазного змінювання або монотонного зниження.

Одержані результати, перш за все, свідчать, що оптимальне значення режимного параметру повинно особливо точно витримуватися тільки на початковому етапі кристалізації, а не біля евтектичної області.

На відміну від режимного параметру β , вплив параметру g_0 на кінетику переохолодження був незначним. Проте, якщо врахувати, що цей параметр може впливати на рівень дегідратації та ступінь насичення клітини кріопротектором на етапі еквілібрації, то важливість його для процесу кріоконсервування стає очевидною.

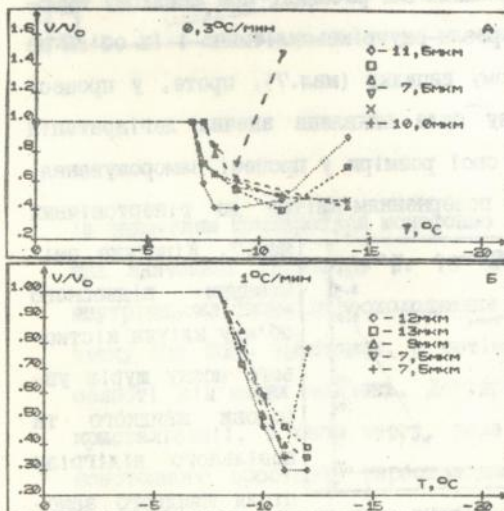
Дослідження кінетики реакції еритроцитів людини, клітин кісткового мозку щура, клітин перитонеального ексудату та тканинних лімфоцитів миші на заморожування-відтавання, які були проведені методом кріомікроскопії, доводять, що в загальних рисах ця кінетика відповідає положенням двофакторної теорії кріопшкодження. При повільному заморожуванні кінетика зміни об'єму клітин виявляла схожість з поведінкою об'єму клітин у розчинах непроникаючих речовин. При швидкому заморожуванні клітини замерзали внутрішньоклітинно і їх об'єм не змінювався. В останньому випадку (мал.7), проте, у процесі повільного відігріву була виявлена значна дегідратація клітин, які зберігали свої розміри у процесі заморожування, що, мабуть, обумовлено поверненням клітин до гіпертонічних



Мал.7. Кінетика зміни об'єму клітин кісткового мозку щурів упродовж швидкого та повільного відігріву після швидкого заморожування.

розчинів на етапі відігріву. Швидкий відігрів знижував рівень дегідратації клітин на цьому етапі. Пошкодження клітин, які були заморожені повільно без захисту криопротектором, починалось, переважно, як тільки вони збездриувалися до певного "критичного об'єму". Критичний рівень дегідратації еритроцитів відповідав зменшенню площі їх екваторіального зрізу приблизно у 2,5 рази. Клітини перитонеального ексудату та кісткового мозку зменшували площу свого мікроскопічного зображення під час дегідратації при повільному заморожуванні максимально до рівня 40-65% та 30-50% від початкового значення відповідно. У наближенні ізотропного стиснення це відповідає втраті клітинами 50-70% та 40-65% води.

Характер виявлених у процесі повільного заморожування крипошкоджень був, у загальних рисах, схожим з характером пошкодження клітин у процесі дегідратації концентрованими розчинами непроникаючих речовин. Об'єм клітин, що були дегідратовані у каналах між кристалами льоду, дестабілізувався та починав зростати (мал.8). У разі достатньо повільного



Мал.8. Кінетика змінивання відносного об'єму клітин перитонеального ексудату миші при заморожуванні зі швидкостями: $0,3^\circ\text{C}/\text{хв}$ (А), $1^\circ\text{C}/\text{хв}$ (Б) (незахиснена суспензія).

заморожування (при швидкостях охолодження 0,3 та 1°C /хв та при відсутності початкового переохолодження позаклітинного розчину) регідратація клітин з порушеною мембранною проникністю завершувалася їх набуханням, а у випадку еритроцитів – гемолізом. Таким чином очевидно, що порушення проникності клітин може статися на етапі заморожування внаслідок їх дегідратації. Ці дані суперечать гіпотезі Morris I.J. та інших авторів про те, що клітини пошкоджуються при повільному заморожуванні внаслідок втрати мембранних ліпідів у процесі їх стиснення при дегідратації, що робить мембрани нестійкими до наступної регідратації на етапі відігріву та веде до зростання мембранної проникності внаслідок дефіциту мембранної поверхні. Необхідно визначити, що пошкодження окремих клітин при повільному заморожуванні може виявитися ще до того, як вони значно обезводнюються. Цей факт суперечить гіпотезі Meryman H.T., згідно якій клітини пошкоджуються при повільному заморожуванні внаслідок їх нездатності до стиснення після досягнення мінімального об'єму. Збільшення темпу заморожування приводить до зростання температурного діапазону, у якому відбувається дегідратація клітин, та виключає або маскує ефекти їх пошкодження на етапі заморожування. У цьому випадку пошкодження виявлялося тільки на етапі відігріву, де до процесу регідратації клітин, яка обумовлена зниженням тоничності позаклітинного середовища, додається регідратація, що обумовлена проникненням у клітини речовин, які у нормі не проникають в них, що також приводило до набухання клітин з щільним цитоматриксом та гемолізу еритроцитів. Збільшення ступеня переохолодження препаратів до початку кристалізації, в свою чергу, приводило до зниження темпера-

тури, при якій відзначалася максимальна дегідратація клітин та зниження швидкості охолодження, при якій стає можливою внутрішньоклітинна кристалізація або вітрифікація частково збезводнених клітин. Наприклад, внутрішньоклітинна кристалізація у переохолоджених суспензіях еритроцитів, які не були під захистом кріопротектору, виявлялася навіть при швидкості охолодження $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, а в суспензіях клітин кісткового мозку та перитонеального ексудату – при швидкості $0,3^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. У той же час у відсутності значного переохолодження клітини кісткового мозку та перитонеального ексудату не показували будь-яких ознак внутрішньоклітинної кристалізації до швидкості охолодження $60^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, а еритроцити навіть при такій швидкості охолодження встигали частково збезводнюватися. Переохолодження клітин, які були заморожені з малими швидкостями, приводило також до того, що клітини виявлялися достатньо рівномірно розташованими у заморожених препаратах, не згуртовувалися замороженням та не виявляли ознаки неізотропної деформації при збезводнюванні, тоді як в умовах фазового переходу, який був близький до рівноваги, такі ознаки виявлялися.

Кріопротектори (гліцерин та ПЕГ-400) поширювали діапазон температур, у якому відбувалася дегідратація клітин. Збільшення концентрації кріопротектора у суспензії еритроцитів до 20% приводило до виразного зниження розмірів клітин навіть при швидкості охолодження $60^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. В суспензіях клітин кісткового мозку та перитонеального ексудату збільшення концентрації кріопротекторів до 20%, навпаки, запобігало дегідратації клітин як при швидкому, так і при повільному заморожуванні. Аналіз даних щодо осмотичних реакцій клітин у присутності кріопротекторів показує, що у зоні субнульових

температур кріопротектор, який концентрується заморожуванням, може виступати у ролі дегідратаційного фактору. Відсутність осмотичних реакцій клітин перитонеального ексудату та кісткового мозку під час заморожування у присутності гліцерину та ПЕГ-400 можна пояснити тим, що клітини, які експонуються у цих розчинах, не встигають відновити свій початковий об'єм на етапі експозиції внаслідок невеликої проникності гліцерину та ПЕГ-400 в ці клітини.

Динаміка набухання клітин у розчинах проникаючих кріопротекторів, гіпотонічних по NaCl.

При вивченні процесів набухання клітин у розчинах проникаючих кріопротекторів, які не містять речовин, що не проникають (а також в гіпо- та гіпертонічних розчинах непроникаючої солі) ми намагалися вирішити дві задачі: а) виявити ознаки та закономірності пошкодження клітин в умовах, що моделюють порушення мембранної проникності у процесі заморожування-відтавання; б) оцінити проникність клітин до розчинів деяких кріопротекторів по швидкості їх регідратації у цих розчинах.

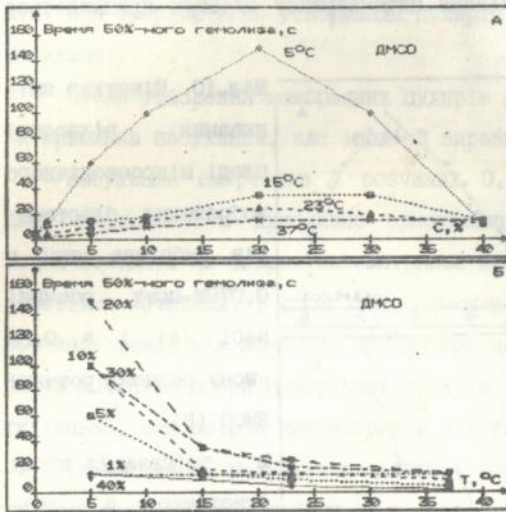
Процеси набухання еритроцитів вивчали методами спектрофотометрії та мікроскопії у режимах фазового та інтерференційного контрасту. При вивченні процесів набухання яйцеклітин та ембріонів миші застосовано метод волькуінометрії - мікроскопії з вимірюванням відносної площі зображення клітин з метою кількісної оцінки їх об'ємних змін.

Мікроскопічні дослідження показали, що час регідратації еритроцитів при набуханні в 1, 3 та 6M-ному водних розчинах гліцерину не перевищує, відповідно, 40 с, 1 та 5 хвилин. Процес набухання йде, переважно, у напрямі дискоцит-стоматоцит-набухлий стоматоцит. Набухлий стоматоцит є пере-

важною передгемолітичною формою еритроцита у розчинах гліцерину усіх вивчених концентрацій. Процес гемолізу, в свою чергу, складається з двох виразних стадій: 1) різкого затемнення фазово-контрастного зображення клітини, яке супроводжується втратою клітиною світлого ореолу, а іноді - зміщенням клітини у горизонтальному напрямі; 2) поступового знебарвлення зображення клітини до майже повного злиття з фоном. Перша фаза гемолізу, яка триває приблизно 3с, пов'язана, на наш погляд, з різким викидом розчину гемоглобіну з клітини в позаклітинне середовище, а друга - з подальшим поступовим виходом гемоглобіну з клітини. Наш погляд базується, перш за все, на положеннях теорії фазового контрасту, а також на вивченні зображень різних форм клітин, які обертаються в процесі руху у препараті, на вивченні форм тіней еритроцитів і, нарешті, на спостереганні "реактивного ефекту" - зміщення клітин на початку гемолізу. Неможливо пояснити затемнення зображення клітин інакше, ніж зменшенням показника заломлення внутрішньоклітинного розчину, яке пов'язане з втратою клітиною гемоглобіну. Треба відзначити, що перша стадія гемолізу мало залежить від концентрації кріопротектора в позаклітинному середовищі, друга, навпроти, значно залежить від цієї концентрації. Так, наприклад, час знебарвлення клітин в розчинах 1, 3 та 6М гліцерину, був відповідно 10-20 с, 30 с та 1 хвилина.

Спектрофотометричні дослідження кінетики процесів гемолізу еритроцитів у безсольових розчинах гліцерину, 1,2-ІІД та ДМСО, що були нами проведені, визначили наступне. Збільшення (до певної межі) концентрації кріопротекторів та зниження температури ведуть до зростання часу 50%-ного гемолізу клітин (мал.9). Однак, існує критичний рівень концентрації

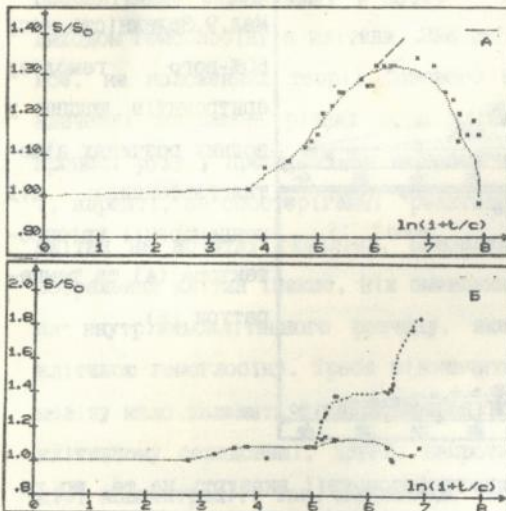
кріопротектора, перевищення якого веде до різкого зниження часу 50% -ного гемолізу. Для ДМСО та гліцерину ця концентрація складає 30% , а для І,2-ПД - 40%. Зменшення часу 50% -ного гемолізу, яке спостерігалось у концентрованих розчинах кріопротекторів при зниженні температури, можна пояснити, мабуть, різким збільшенням проникності еритроцитарних мембран до кріопротектору внаслідок гіпертонічного стресу.



Мал.9.Залежність часу 50%-вого гемолізу еритроцитів людини у водних розчинах диметилсульфоксида від концентрації кріопротектора (А) та температури (В).

В цілому дані спектрофотометрії вказують на те, що гемоліз еритроцитів в розчинах кріопротекторів, які не містять не проникаючих до клітин додатків, може бути наслідком не менш, ніж двох параметрів: коефіцієнта проникнення кріопротектора до клітини та гіпертонічного стресу. При оцінюванні проникливості еритроцитів до розчинів гліцерину, І,2-ПД та ДМСО різних концентрацій у діапазоні температур 5-37°C по часу 50%-ного гемолізу, звертає на себе увагу той факт, що І,2-ПД насичує клітини у 8-15 разів швидше, ніж гліцерин, а ДМСО - у 1,5 рази швидше, ніж І,2-ПД.

Дослідження процесів набухання яйцеклітин та ембріонів миші у середовищах різного складу показало, що незалежно від того, що ініціює набухання (порушення мембранної проникності в умовах гіпертонії, чи порушення осмотичної рівноваги на клітинній мембрані внаслідок поступу до клітини криопротектора з середовища, яке не містить непроникаючої речовини), після появи на поверхні клітини мембранних пухирів, а іноді й до їх появи, набухання цитоматриксу клітини припиняється (мал.10)



Мал.10. Кінетика змінування відносної площі мікроскопічного зображення бластомерів ембріона миші в 0,078М-ному розчині NaCl (А) і в 0,3М-ному водному розчині ДМСО (Б).

а - змінування площі бластомера; б - змінування площі бластомера з пухирем.

Зростання об'єму пухирів після припинення набухання цитоматриксу виявляє виразну залежність від присутності у позаклітинному середовищі непроникаючого компонента. Так, у розчинах ДМСО, які не містять солі (як ізотонічних, так і гіпертонічних концентрацій) ріст мембранних пухирів продовжувався, поки не затримувався зона pellucida, після чого пухирі або проростали крізь дефекти у блискучій оболонці

(ізотонія), або зникали, що, мабуть, пов'язано з їх розривом (гіпертонія). У той же час у розчинах ДМСО з гіпертонічною концентрацією NaCl (двократне розбавлення ізотонічного розчину NaCl) та у розчинах солі з концентрацією 0,078M збільшення об'єму мембранних пухирів було менш значним, і вони не досягали межі *zona pellucida*.

Звертає на себе увагу той факт, що яйцеклітини на відміну від ембріонів не утворювали пухирів навіть при значному набуханні.

Після утворення мембранних пухирів цитоматрикс не тільки припиняв набухання, але іноді й виразно стискувався.

Набухання ембріонів у розчинах 0,078M NaCl та 0,32M ДМСО починалося з приблизно однохвилинною затримкою, яку можна пояснити як опором цитоматрикса набуханню, так й особливостями методики. В свою чергу, затримка мала місце у цих розчинах також між моментом припинення набухання цитоматрикса та моментом появи мембранних пухирів (мал.10), що пояснити інакше, ніж опором цитоматрикса набуханню, неможливо.

Таким чином, результати описаної серії дослідів показали, що цитоматрикс клітини веде себе як осмотично активна фаза, яка спроможна чинити опір силам розтягнення, а пухири з моменту їх появи беруть на себе регуляцію клітинного об'єму.

ВИСНОВКИ.

I. Набухання є універсальною неспецифічною реакцією клітин не тільки на гіпотонію, в тому числі й гіпотонію, яка викликана проникненням кріопротектора до клітини з гіпотонічного по непроникаючому компоненту розчину, але й реакцією на пошкодження, яке викликане заморожуванням-відтаванням або експозицією у гіпертонічних розчинах кріопротекторів та со-

лей.

2. Під час експозиції у гіпертонічних розчинах, осмотичний тиск яких перевищує критичний рівень, набухання починається тим раніше, чим більше це перевищення; під час повільного заморожування набухання майже завжди передує дегідратація клітин з втратаю останніми від 40% до 70% води.

3. Альтернативою зростанню об'єму цитоматрикса під час набухання може бути поява на поверхні клітин мембранних пухирів, які продовжують осмотичну реакцію клітин (цитоматрикс при цьому припиняє набухання та може навіть стискуватися); поведінка цитоматеріала свідчить про те, що він веде себе як фаза, яка відрізняється по його фізико-хімічним властивостям від оточуючого клітини розчину і, зокрема, яка має обмежені можливості до розтягування.

4. Чисельне моделювання осмотичної поведінки клітин на етапі ізотермічної експозиції в гіпертонічних розчинах показало, що так званий "мінімальний об'єм" достатньо адекватно описується без залучення допущень щодо механічного опору клітин стисненню за допомогою рівнянь масопереносу термодинаміки необоротних процесів у перервних системах.

5. Клітини, які зберігали свій об'єм внаслідок швидкого заморожування, незалежно від того, показують вони чи ні ознаки внутрішньоклітинної кристалізації, збезводнюються в разі повільного відігріву до значень об'ємів, які є характерними для повільного заморожування; така дегідратація стає можливою завдяки тому, що внутрішньоклітинні кристали льоду таять раніше, ніж позаклітинні.

6. Позаклітинне перехолодження веде до зсуву процесу збезводнювання клітин під час заморожування в зону більш низьких субнульових температур та знижує швидкість охолод-

ження, при якій відбувається внутрішньоклітинна кристалізація; внутрішньоклітинне переохолодження в разі охолодження з постійною швидкістю зростає монотонно тільки при великих швидкостях охолодження у відсутності суттєвої дегідратації клітин; в інших випадках за стадією зростання переохолодження на початковому етапі кристалізації слідує стадія його виразного зниження.

7. Зростання щільності клітин у суспензії веде до зниження ступеня їх збезводнення, рівня внутрішньоклітинної концентрації електроліту на етапі ізотермічної експозиції клітин в гіпертонічному криозахисному середовищі; на етапі кристалізації зміна цього параметру на кінетику масопереносу безпосередньо не впливає.

8. Перехід еритроцитів з дуже збезводненого стану в передгемолітичну форму у концентрованих розчинах NaCl відбувається не повільно, а двома розділеними у часі стрибками.

9. Переважною передгемолітичною формою еритроцитів, які набухають у безсольових розчинах гліцерина є набухлий стоματοцит. Процес його гемолізу, який спостерігається методом фазово-контрастної мікроскопії, містить у собі дві стадії: "потемнення" клітин, яке відбувається у середньому за 3 с та іноді супроводжується зміщенням клітин у горизонтальному напрямі, й слідує за ним знебарвлення, швидкість якого тим менша, чим вище концентрація кріопротектора у позаклітинному середовищі; коли концентрація кріопротектора збільшується від 0 до 6М, час знебарвлення зростає приблизно у 6 разів.

10. Час повного гемолізу еритроцитів, які набухають у концентрованих водних розчинах гліцерина внаслідок його проникнення до клітин, в десятки разів перевищує час початку гемоліза в суспензії клітин; час 50%-ного гемолізу еритроци-

тив у розчинах гліцерина, 1,2-ГД та ДМСО зростає з підвищенням концентрації кріопротектора та зниженням температури. Перевищення концентрацією кріопротектора певного критичного рівня (30-40%) веде до зниження часу 50%-ного гемолізу при знижених температурах (5-15⁰С).

II. З залученням одержаних даних побудовано гіпотетичну схему розвитку кріопшкодження клітин під час заморожування-відтавання з вказівкою можливих засобів щодо їх кріозахисту на деяких етапах кріоконсервування.

Розанов Л.Ф. "Кинетика реакций клеток на действие факторов криоконсервирования". Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.22 - криобиология. Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии Наук Украины, Харьков, 1996.

Изучены закономерности явления набухания клеток разного типа с поврежденной и интактной мембраной в процессе замораживания клеточной суспензии и экспозиции клеток в средах различного состава. Получены экспериментальные и теоретические данные, не согласующиеся с классическими представлениями о механизмах и закономерностях криповреждения клеточных структур и свидетельствующие о том, что для их объяснения, анализа и трактовки необходимо привлекать не только положения мембранной теории проницаемости, но и положения фазовой теории строения клеток. Получены данные о динамике предгемолитических трансформаций и кинетике гемолиза эритроцитов в гипертонических растворах кріопротекторов и солей. Получены данные о зависимости кристаллизации в клеточных суспензиях от начального переохлаждения внеклеточного раствора и режима

схема развития криповреждения клеток при замораживании - оттаивании и указаны возможные способы их криозащиты. Методом численного моделирования получены новые данные о процессах массопереноса между клетками и окружающей их средой на различных этапах низкотемпературного консервирования, на основе которых сформулированы рекомендации по оптимизации методов криоконсервирования.

Rozanov L.F. Kinetics of cell responses to influence of cryopreservation factors. Manuscript. The dissertation for degree of doctor of biological science by speciality 03.00.22 - cryobiology, Institute for problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Ukrainian Academy of Science, Kharkov, 1995.

Partens of swelling phenomenon of various type cells with damaging and intact plasma membrane during freezing of cell suspensions and exposing of cells in solutions of various composition have been investigated. Experimental and theoretical data which are not agreed with conventional hypotheses on the mechanisms and partens of cellular compounds cryodamages have been obtained. These data confirm that not only principles of membrane permeability theory, but the principles of phase theory of cell organization must be used to explain, analyse and interpret our observations. The new data dealing with dynamics of preceding to hemolysis transformations and kinetics of erythrocyte hemolysis in the hypertonic solutions of cryoprotectants and salts have been received. The data concerning the dependence of crystallization in cell suspension from initial supercooling of extracellular solution and regims of cryopreservation have been obtained.

Using the obtained data the development scheme of cell cryodamages during freezing-thawing has been drawn up and possible paths of cell defend have been pointed up. By the method of numerical modelling the new data concerning the processes of mass transport between the cell and its surrounding medium during the various steps of low temperature cryopreservation cycle have been obtained. On the basis of these data the recommendations on optimization of cryopreservation methods have been formulated.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації

1. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Вишневский В.И., Иткин Ю.А., Розанов Л.Ф. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. / Киев: Наукова Думка, 1977. - 242 с.
2. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Биохимия мембран: Замораживание и криопротекция. / Москва: Высшая школа, 1987. - 76с.
3. Пушкарь Н.С., Бронштейн В.Л., Розанов Л.Ф. Механизм обезвоживания замороженных клеток при отогреве // Доклады АН СССР. - 1976. - т.230, N 1 - С.217-219.
4. Розанов Л.Ф. Микроскопическое исследование процессов замораживания и отогрева клеточных суспензий. // Проблемы гематологии и переливания крови. - 1977. - N 2. - С.22-27.
5. Бронштейн В.Л., Розанов Л.Ф. Начальное переохлаждение как фактор повреждения при замораживании клеточных суспензий // Криобиология и криомедицина. - 1977. - N 3. - С.26 -29.
6. Гордиенко Е.А., Ишков Г.С., Розанов Л.Ф. Обезвоживание и некоторые механизмы криоповреждения клеток при низкотемпературном консервировании суспензий // Криобиология и криомедицина - 1977. - N 3. - С.29-34.

криомедицина -1977. - Т. 3.- С.29-34.

7. Иткин Ю.А., Бронштейн В.Л., Розанов Л.Ф. Изучение влияния структуры льда на процесс обезвоживания и внутриклеточную кристаллизацию// Криобиология и криомедицина.- 1977. -Н 3.- С.35-41.

8. Новиков А.Н., Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Моделирование процесса внутриклеточной кристаллизации // Биофизика.- 1980.-Т.25, N 1.- С.129-133.

9. Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф., Лобасенко Н.П. Микроскопическое изучение кинетики изменения объема клеток в гипертонических средах// Проблемы гематологии и переливания крови.- 1980.- N 4.- С. 32-35.

10. Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Изучение кинетики взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами и солями// Криобиология и криомедицина.- 1980.- N 7.- С. 40-44.

11. Кулешова Л.Г., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Реакция клеток на гипертонические воздействия при криопротекции// Биофизика.-1982.-Т.27, N 4.-С.660-664.

12. Пушкарь Н.С., Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Физико-химические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий// Криобиология.-1985.-N 1.-С.23-29.

13. Некоз И.А., Розанов Л.Ф., Пичугин Ю.И. Влияние хлорида натрия на физико-химические свойства растворов ПЭО-1500// Криобиология.-1989.-N 2.- С.24-27.

14. Розанов Л.Ф., Розанова Е.Д., Некоз И.А. Кинетика взаимодействия эритроцитов человека с растворами глицерина и 1,2-пропандиола// Криобиология.-1989.-N 4.- С.30-34.

15. Розанов Л.Ф., Розанова Е.Д. Оценка внутриклеточной концентрации глицерина в эритроцитах человека методом пер-

турбационной дифференциальной спектрофотометрии // Проблемы криобиологии.-1992.-N 2.- С.55-57.

16. Розанов Л.Ф., Смольянинова Е.И. Осмотическое поведение яйцеклеток и эмбрионов мыши. Роль цитоскелета// Проблемы криобиологии.-1992.-N 4 -С.26-32.

17. Гордиенко Е.А., Коваленко И.Ф., Розанов Л.Ф., Смольянинова Е.И. Влияние концентрации хлористого натрия на проницаемость мембран яйцеклеток и эмбрионов мыши для молекул воды// Проблемы криобиологии.-1993.-N 4.- С. 25-28.

18. Гордиеко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф., Розанов Л.Ф. Экспериментальное изучение кинетики гипотонического и кислотного гемолиза эритроцитов человека методом малоуглового рассеяния// Проблемы криобиологии.- 1994.-N 1.- С.32-39.

19. Розанов Л.Ф., Розанова Е.Д. Гемолиз эритроцитов человека в растворах глицерина и 1,2-пропандиола при температурах 8 - 37°C// Проблемы криобиологии.-1994.- N2.- С.3-7.

20. Розанов Л.Ф., Смольянинова Е.И., Гордиенко О.И. К вопросу о роли мембраны и цитоматрикса в развитии криоповреждения клеток// Проблемы криобиологии.-1994.-N3.-С.12-18.

21. Розанов Л.Ф., Гордиенко Е.А., Кулешова Л.Г. Неспецифические реакции клеток на физико-химические факторы криоконсервирования// В сб.: Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем.- Харьков, 1989.-С.48-52.

22. Некоз И.А., Гордиенко Е.А., Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Особенности гемолиза эритроцитов в водных растворах глицерина// В сб.: Криоконсервирование клеток и тканей.- Харьков, 1989. - С.54-61.

23. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Розанов Л.Ф. Пассивная утечка ионов калия из эритроцитов в средах, содержа-

щих глицерин и 1,2-пропандиол// В сб.: Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов.- Харьков, 1990.- С.33-35.

24. Розанов Л.Ф., Розанова Е.Д. Взаимодействие эритроцитов человека с растворами димексида при температурах 5 - 37⁰С// В сб.: Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов.- Харьков, 1990.- С. 140-144.

25. Розанов Л.Ф., Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Кулешова Л.Г., Смольянинова Е.И. Фазовая теория строения клеток как основа для новой концепции криоповреждения и криозащиты клеточных структур// В сб.: Физико-химические процессы в криобиологических системах.- Харьков, 1991.- С. 134-140.

26. Gordienko E.A., Kovalenko I.F., Rozanov L.F., Smolyaninova E.I. Physico-mathematical analysis and experimental conformation of hypotonic lysis cell mechanism// Cryobiology.- v.30, N 6.- 1993.- P.620-621.

Ключові слова: чисельне моделювання, переохолодження, заморожування, осмотичні реакції, кінетика гемолізу, набухання, клітинна суспензія.

Відповідальний за випуск
академік НАН України В.І.Грищенко

Підписано до друку 26.12.95 р. Об'єм фіз.п.л. 2,2,
умов.л. 2,2. Замовлення № 48, тираж 100 прим.

Ротапринт ФТІНТ НАН України, Харків-164, пр. Леніна, 47

