

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

На правах рукопису

Зінченко Олександра Василівна

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ПРОЦЕСИ В КРІОБІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМАХ
ПРИ СКЛУВАННІ І В ТВЕРДІЙ ФАЗІ

03.00.22 - кріобіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Дисертація є рукописом

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Науковий консультант: д.б.н., проф. Мойсєєв В.О.

Офіційні опоненти: доктор.біол. наук., с.н.с. Гордієнко Є.О.
доктор.біол. наук., проф. ХДУ Перський Є.Ю.
доктор. фіз.-мат.наук, проф. Суходуб Л.Ф.

Провідна організація: Фізико-технічний інститут низьких температур НАН України, м. Харків

Захист відбудеться "24" червня 1997 р. о 13.30 години; на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 50.21.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 310015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Автореферат розісланий "23" травня 1997 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
доктор медичних наук, проф.



Гольцев А.М.

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00743041 (J)

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

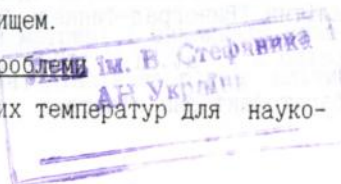
Вивчення реакції біологічних об'єктів різного рівня організації на зовнішні екстремальні впливи є одним з методичних підходів сучасної біофізики у дослідженні взаємодії живих систем з зовнішнім середовищем. Одним з таких видів екстремальних впливів є глибоке охолодження живих систем до температур, дії яких вони не піддаються в нормальних фізіологічних умовах. Глибоке охолодження біологічних об'єктів, являючись, з одного боку, інструментом у дослідженні даних об'єктів, з другого боку знаходить все більш широке застосування в різних областях діяльності людини. Цей аспект використання холоду в біології і медицині є предметом вивчення в сучасній кріобіології.

Дана робота присвячена вивченню фізичних явищ, які виникають в кріобіологічних системах під час їх охолодження до температури повного затвердіння і під час наступного нагрівання. Під кріобіологічними системами ми маємо на увазі середовища, що застосовуються окремо від біологічних об'єктів і з біологічними об'єктами різного рівня організації.

Досліджувались акустична емісія, електрична поляризація локальних участків зразків, що заморожуються і оптичне випромінювання під час заморожування - нагрівання кріобіологічних систем. Вивчалась дія переходу системи в твердофазний стан на біологічні об'єкти молекулярного, субклітинного і клітинного рівня організації. Одержані результати використовуються для більш глибокого розуміння схеми взаємодії біологічних об'єктів з зовнішнім середовищем.

Актуальність проблеми

Перспективи застосування низьких температур для науко-



вої розробки криогенних біотехнологій вимагають детального знання всього спектру дії холоду на живі системи.

В ланцюгу послідовних порушень функціонального стану живих систем під дією низьких температур дослідники традиційно приділяли головну увагу процесам, що протікають в діапазоні температур поблизу температури кристалізації льоду в об'єкті. Саме в цьому діапазоні температур розігруються найбільш драматичні події для об'єкта, що охолоджується. Для більшості фізико-хімічних факторів кріопшкодження - виникнення гіперконцентрованих розчинів, пошкодження мембран, порушення молекулярної структури і функції каталітичних білків і ряд інших факторів проявляються вище температури склування рідини.

Загальновідомими є уявлення про обезводжування клітин внаслідок кристалізації льоду і збільшення концентрації зовнішньоклітинного розчину, які лягли в основу двохфакторної теорії кріопшкодження Мазура [Mazur P., 1953, 1965]. Другим фактором пошкодження в цій теорії вважалась механічна дія кристалів льоду на клітини. Ця ідея має досить давню історію. Відомий цілий ряд експериментальних спостережень механічної дії льоду на клітини - кріомікроскопічні спостереження над клітинами в каналцях між кристалами льоду і аналіз впливу рекристалізації на руйнування заморожених клітин [Smernina J.K. 1962, Nei T. 1967, 1968, Ling G.R., Tien C.L. 1969, Иткин Ю.А., Гордиенко Е.А., Бронштейн В.Л. 1981], аналіз впливу росту кристалів льоду на руйнування заморожених клітин [Виноград-Финкель В.Ф. и др. 1963, Mazur P. 1970, Leibo S.P. et al., 1970, Gupta K.G. 1975]. Пізніше з'явилась багатофакторна гіпотеза кріопшкодження, в якій, однак,

розглядалось пошкодження клітин в діапазоні температур вище температури повного отвердіння рідини і не зачіпався діапазон нижче температури склування [Белоус А.М. и др. 1985].

В 1984 р. Степонкус висловив ідею і провів експериментальні дослідження дії електричного заряду кристалів льоду, що ростуть під час внутрішньоклітинної кристалізації на мембранах хлоропластів [Steponkus P.L. 1984]. За словами самого автора, його ідея електричного пробоя мембран носила характер гіпотези і потребувала додаткової експериментальної перевірки.

Дії інших фізичних факторів на заморожені системи при досягненні температури дослідники не приділяли достатньої уваги, роботи були нечисленні і носили епізодичний характер. Серед таких факторів в першу чергу слід сказати про дію механічного стресу. Ще в 1956 р Левітт звернув увагу на можливість пошкодження макромолекул в протоплазмі внаслідок "зрізаючих" зусиль під час внутрішньоклітинної кристалізації [Levitt J. 1956]. Дія такого механізму повинна, мабуть, виявлятися в широкому діапазоні нижче температури кристалізації внутрішньоклітинного розчину. Відомі в нинішній час результати вивчення фізичних властивостей льоду вказують на те, що такий механізм цілком можливий.

Кристали льоду виявляють здатність до пластичної деформації під дією механічних навантажень [Gold L.W. 1969, Barker R.N. 1978]. При повзучості льоду в ньому спостерігається виникнення мікротріщин, що реєструється по акустичній емісії [Gold L.W. 1969, 1972]. В ході криоконсервування такі явища можуть мати місце в льодовій матриці і викликати механічний стрес в заморожених в неї біоматеріалів на рівні клітин

або субклітинних структур.

Була висловлена гіпотеза про можливість розвитку високих тисків при утворенні в льодовій матриці замкнутих порожнин з незамерзлою рідиною [Исерович П.Г. 1986]. Біологічні об'єкти, що знаходяться в такій порожнині, виявляються під дією великих механічних напружень. Поки що ця гіпотеза не одержала експериментального підтвердження, однак нема підстав для її відхилення.

Для термомеханічних напружень набуває особливого значення при кріоконсервуванні органів. Теоретичні розрахунки показують, що термомеханічні напруження здатні викликати пошкодження замороженого органа [Rubinski V. 1980]. Експериментально це спостерігалось при заморожуванні нирки [Куракса В.М. 1983, 1987]. Таким чином, мається досить багато вказівок на те, що фізичні процеси, здатні служити причиною пошкодження кріоконсервованих об'єктів, розвиваються не лише при існуванні рідкої фази, але і при затвердінні матриці, хоча вивчені вони недостатньо.

Дана робота присвячена вивченню деяких закономірностей розвитку термомеханічних напружень і електричних явищ в кріобіологічних системах при температурі склування і нижче, а також їх можливого впливу на заморожені біологічні об'єкти.

Мета і основні завдання наукового дослідження

Метою даної роботи було дослідження закономірностей розвитку фізичних процесів, здатних служити причиною кріопошкодження заморожених біологічних систем при температурі склування рідини і нижче цієї температури і можливих наслідків їх дії на біологічні об'єкти.

У відповідності з **метою** були поставлені і розв'язува-

лись такі задачі:

1. Розробка методичних підходів і експериментальної апаратури для дослідження електричної поляризації (ЕП) оптичного випромінювання (ОВ), акустичної емісії (АЕ) і електропровідності при охолодженні об'єктів до 77 К і наступному їх нагріванні.

2. Дослідження закономірностей розвитку акустичної емісії, як індикатора термомеханічних руйнувань твердої матриці при заморожуванні найбільш широко застосовуваних криозахисних розчинів.

3. Кількісні оцінки інтенсивності оптичного випромінювання і електричної поляризації матриці при заморожуванні розчинів найбільш широко вживаних криозахисних речовин. Встановлення кореляції між явищами оптичного випромінювання і електричної поляризації і термомеханічних руйнувань твердої матриці. Дослідження схильності водних розчинів кріопротекторів до утворення метастабільних форм і впливу на ці процеси деяких сахарів.

4. Моделювання дії термомеханічних і електричних явищ в замороженій матриці на біологічні мембрани при температурі склування рідини і нижче цієї температури.

5. Експериментальна перевірка можливості пошкодження клітин і субклітинних структур в діапазоні температури склування криозахисних розчинів і нижче і оцінка ступеня пошкодження об'єктів тими факторами, які діють в даному температурному діапазоні.

Наукова новизна

В роботі вперше показано, що при заморожуванні водних систем виникає електрична поляризація матриці не лише в тем-

пературній зоні росту кристалів, але і при температурі склування і нижче, причому величини різниць потенціалів, що виникають в низькотемпературній зоні значно перебільшують потенціали, зумовлені ефектом Воркмана - Рейнольдса.

Вперше показано, що в присутності невеликих добавок речовини, яка склується, знижується акустична емісія водних розчинів, що заморожуються. Це вказує на зниження ступеня термомеханічних руйнувань твердої матриці. Запропонований механізм дії добавок, що склується.

Досліджено оптичне випромінювання (кріолюмінесценція) кріозахисних розчинів при охолодженні - нагріванні.

Вперше виявлена кореляція між оптичним випромінюванням при заморожуванні водних розчинів і електричною поляризацією матриці, що вказує на електричну природу ефектів кріолюмінесценції. Запропоновані механізми виникнення електричної поляризації і оптичного випромінювання розчинів при охолодженні - нагріванні.

На модельних і на реальних біологічних системах показано, що існують механізми кріопшкодження біологічних об'єктів, які розвиваються при температурі склування і нижче, що повинно враховуватись в практиці низькотемпературного консервування.

Практичне значення роботи.

Виявлені явища зниження акустичної емісії (а отже, і термомеханічних руйнувань) в присутності малих добавок речовин, які склується при заморожуванні водних систем може знайти безпосереднє практичне застосування при розробці кріозахисних середовищ.

Існування кореляції АЕ з процесами фазових перетворень

і склування в системі, що заморожується, може знайти практичне застосування при контролі температурних режимів заморожування біологічних систем, температурних зупинок в ході заморожування - відігрівання, тривалості експозиції при температурних зупинках. Виявлені ефекти електричної поляризації матриці і розвитку термомеханічних напружень в ній при температурі склування і нижче вказують на те, що режими швидкого досягнення температури рідкого азоту на кінцевій стадії заморожування біологічного об'єкта не є оптимальним з точки зору збереження кріоконсервованого матеріалу. Коректний вибір режиму проходження температурної зони склування може служити додатковим резервом підвищення збереження біологічних об'єктів при кріоконсервуванні.

На захист виносяться

1. Експериментальний довід існування електричної поляризації матриці при заморожуванні водних розчинів не лише в температурній зоні кристалізації, але і після припинення росту кристалів нижче температури склування.

2. Експериментальний довід існування кореляції між кріолюмінесценцією і електричною поляризацією водних розчинів при заморожуванні-нагріванні.

3. Існування кореляції між термомеханічними руйнуваннями матриці і співвідношенням кристалічної і аморфної фаз в замороженому розчині.

4. Існування пошкоджень кріоконсервованих об'єктів в температурній зоні склування і нижче внаслідок дії термомеханічних і електричних факторів.

5. Розроблені методичні підходи і експериментальне обладнання для дослідження фізичних явищ при отвердінні розчи-

нів і в процесі кріоконсервування біологічних об'єктів.

Апробація і публікації результатів досліджень.

Основні положення дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на: Міжнародному симпозиумі з біокалориметрії, Тбілісі, 1981; на 2-й міжнародній конференції "Вода і іони в біологічних системах", Румунія, 1982; на 1 Всесоюзному біофізичному з'їзді, Москва, 1982; на 2 Всесоюзній конференції "Механізми криозащити биологических объектов", Харків, 1984; на Міжнародній конференції "Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины", Харків, 1988; на IV Всесоюзній конференції з хімії низьких температур, Москва 1988; на 10-й і 11-й конференціях IUPAC з хімічної термодинаміки, Чехословаччина, 1988, Італія 1990; на Всесоюзній школі-семінарі "Био-термо-хеми-люминесценция", Москва-Суздаль, 1988; на VII конференції з спектроскопії біополімерів, Харків, 1991; на Міжнародній конференції "Успехи современной криобиологии", Харків, 1992; на 1-му з'їзді Українського біофізичного товариства, Харків, 1994; на 3-й Європейській конференції "Хранение и клиническое использование тканей для пересадки", Австрія, 1994; на 31-й щорічній нараді товариства кріобіологів, Японія, 1994; на Міжнародній нараді товариства низькотемпературної біології, Бельгія, 1994; на першому з'їзді Українського товариства кріобіології і кріомедицини, Харків, 1995.

По темі дисертації опубліковано 57 наукових робіт, в тому числі 3 авторських свідоцтва.

Структура дисертації.

Матеріали дисертації викладені на 300 сторінках, який містить 203 сторінки машинописного тексту, 69 рисунків, 10 таблиць

і список літератури, що включає 308 робіт.

Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження і їх обговорення, закінчення, висновку і списку літератури.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Установка і метод реєстрації електричних полів і електромагнітного випромінювання

Для реєстрації електромагнітного випромінювання в оптичному діапазоні і електричної поляризації в ході затвердіння і розм'якнення розчинів була створена установка, яка дозволяє реєструвати ці явища в умовах швидкого охолодження - нагрівання в різних розчинах і об'єктах біологічного походження. На рис.1 подана блок-схема установки. Стакан 1 з нержавіючої сталі з товщиною стінок 0.1 мм, діаметром 28 мм і довжиною 70 мм призначений для заливання досліджуваного матеріалу 2. Для охолодження зразка стакан занурюють в посудину 3 з рідким азотом. На стакані 1 мається насадка 9, в якій розміщений термометр опору 10 і нагрівач 11, з'єднані з блоком регулювання температури 12. Фотоелектронний помножувач 15 типу ФЭУ-136 призначений для реєстрації оптичного випромінювання. В досліджуваній матеріал занурений ізольований зонд 4, який є чутливим елементом (або первинним датчиком) при реєстрації електричної поляризації речовини. Зондом служить відрізок провідника в фторопластовій ізоляції, як показано на рис.1. Провідник занурений у зразок ізольованою частиною, а кінці провідника знаходяться над поверхнею рідини. Таким чином забезпечується ізоляція зонда від рідини по

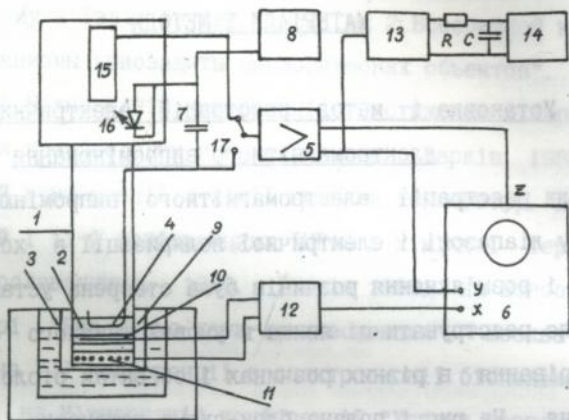


Рис.1. Блок-схема установки для реєстрації електричної поляризації і електромагнітного випромінювання зразка при охолодженні-нагріванні. Пояснення в тексті.

постійному струмові і реєструються лише короточасні сплески напруги в момент виникнення або швидкого спаду різниці потенціалів між локальними участками зразка.

Зонд 4 або вихід фотоелектронного помножувача 15 через перемикач 17 можуть бути з'єднані з підсилювачем імпульсів 5, який зібраний на мікросхемі К 284 УЕ1А. Підсилені сигнали подаються на осцилограф 6 типу С1-65А, на вхід У і на

вхід Z (підсвіт), що дозволяє реєструвати на екрані поодинокі імпульси. Розгортка по осі X осцилографа виконана по температурі зразка. Для цього напруга, пропорційна температурі зразка, подається на X-вхід осцилографа. Імпульсні сигнали можна спостерігати на екрані візуально або фотографувати.

Мається ще один канал реєстрації для запису огинаючої імпульсних сигналів, який складається з підсилювача імпульсів 13 типу УЗ-29, інтегруючого RC-ланцюжка і самопишучого потенціометра 13 типу КСП-4.

В установці мається система калібровки каналу реєстрації, яка дозволяє приводити всі записи імпульсних сигналів до одного масштабу з метою їх кількісного аналізу. Для калібровки служить імпульсний генератор 8 типу Г5-56. Для калібровки системи оптичного випромінювання калібровочні імпульси подаються від генератора 8 на світлодіод 16, розташований перед фотокатодом ФЕП. Для калібровки в режимі запису ЕП імпульси від генератора 8 подаються безпосередньо на вхід підсилювача 5 через конденсатор 7. Калібровку системи реєстрації проводили перед кожним експериментом, записи сигналів калібровки використовували потім для нормування одержаних експериментальних кривих.

Установка для реєстрації акустичної емісії. Принцип реєстрації АЕ заснований на використанні пьезоелектричного перетворювача з LiNbO_3 , акустичні коливання до якого від досліджуваного зразка передаються через звукопровід з нержавіючої сталі. Діапазон частот АЕ, які реєструються розробленим приладом, лежить в межах 10 Гц - 1 МГц. Маса зразка досліджуваної рідини складає 500 мг, середня швидкість охолодження при зануренні в рідкий азот $1.67 \text{ K} \cdot \text{c}^{-1}$, середня швид-

кість нагрівання $1.17 \text{ K} \cdot \text{с}^{-1}$.

Установка і метод реєстрації електропровідності в об'єктах при охолодженні і нагріванні

Установка призначена для реєстрації пошкоджень штучних мембран при охолодженні їх до температури повного отвердіння і наступного нагрівання. Принцип реєстрації пошкоджень мембран заснований на вимірюванні електропровідності. Вимірювання здійснюється на частоті 30 Гц, напруга на мембрані 20 мВ. Електропровідність, як функція температури, реєструється на двохкоординатному самописці.

Установка для циклювання об'єктів по температурі призначена для того, щоб досліджуваний зразок багатократно піддавати умовам, при яких в ньому розвиваються термомеханічні напруження і електрична поляризація і накопичувати пошкодження, що викликаються цими факторами. Принцип роботи установки заснований на багатократному зануренні контейнера з зразком у рідкий азот. Система автоматичного регулювання керує опусканням зразка в рідкий азот, його підніманням і нагріванням таким чином, щоб температура зразка змінювалась періодично в заданих межах. Верхню і нижню границі циклювання температури можна встановлювати в діапазоні $273 - 77 \text{ K}$, точність автоматичного відсліджування встановлених границь температури складає $\pm 2 \text{ K}$.

Для приготування зразків криозахисних середовищ використовували бідистиллят і реактиви фірм "Merck" і "Fluka" кваліфікації "purum", а також вітчизняні реактиви кваліфікації "ХЧ".

Суспензії клітин для кріоконсервування і режими охолодження - нагрівання були такими, які рекомендуються в відомих

методичних вказівок і прописах по кріоконсервуванню. Досліджували розчини таких кріозахисних речовин: гліцерину, 1.2-пропандіолу, етиленгліколю, поліетиленгліколів молекулярних мас 300 - 3000, полівінілпірролідону, сахарози, глюкози, мальтози. Експерименти по кріоконсервуванню проводили на еритроцитах, гепатоцитах, мітохондріях. Кріозахисні середовища: середовище ЦНИИГПК 11₅, пропандіосахароль, середовище на основі ПЕГ-1500, середовище на основі гліцерину і середовище на основі ДМСО для кріоконсервування гепатоцитів і мітохондрій. Штучні мембрани готували з еквімолярної суміші лецитину і холестерину в диоксані. Для досліджень використовували бичий сироватковий альбумін (БСА) фірми "Merck" і ДНК фірми "Calbiochem".

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Дослідження електроактивності і електромагнітного випромінювання водних розчинів кріопротекторів при охолодженні і нагріванні.

В кріобіології до недавнього часу не проводились детальні дослідження електричних явищ при охолодженні зразків до 77 К і наступному нагріванні. Між тим відомо, що в багатьох речовинах при фазовому переході рідина-кристал утворюється подвійний електричний шар і кристал росте об'ємно заряджений (ефект Коста-Рібейро і Воркмана-Рейнольдса).

Використовуючи традиційний електродний метод, ми виміряли кристалізаційну різницю потенціалів фізіологічного розчину в режимі повільного охолодження (зниження температури

від 273 К до 272,5 К на протязі 20 хв). Кристалізаційна різниця потенціалів в такому режимі виявилась рівною 0,7 В. Однак нами було виявлено, що в режимі більш швидкого зниження температури (від 273 К до 120 К за 12 хв) між електродами виникають різкі скачки напруги, значно більші, ніж в попередньому режимі охолодження. Вони реєструються при температурах нижче температури кристалізації розчину. Це явище не було описане раніше в літературі. Розвиток цього явища в кріозахисних системах і в біологічних об'єктах досліджувався в даній роботі за допомогою обладнання, що було описане вище.

Електромагнітне випромінювання розчинів в оптичному діапазоні (кріолюлюмінесценція, КЛ), як було встановлено нами, реєструється при досить швидкій зміні температури зразка, в якому має місце згадана вище серія скачків електричної поляризації зразка.

Нами були проаналізовані криві висвічування розчинів кріозахисних речовин при охолодженні і нагріванні, які являють собою заниси огинаючої сигналів ФЕП або ємнісного зонда, як функцію температури після інтегрування імпульсних сигналів на RC-ланцюжку. Як міру інтегральної інтенсивності досліджуваних ефектів ми використовували сумарну площу під імпульсними сигналами, одержаними на протязі одного циклу охолодження або нагрівання. На рис. 2 і рис. 3 подані залежності інтегральних інтенсивностей кріолюлюмінесценції і електроактивності в системі вода-гліцерин від концентрації під час охолодження і нагрівання. Як міру інтенсивності використовували також кількість імпульсів ЕП. Видно, що обидва ефекти мають симбатну залежність від концентрації. Інтенсивність ефектів зростає із збільшенням вмісту гліцерину в області

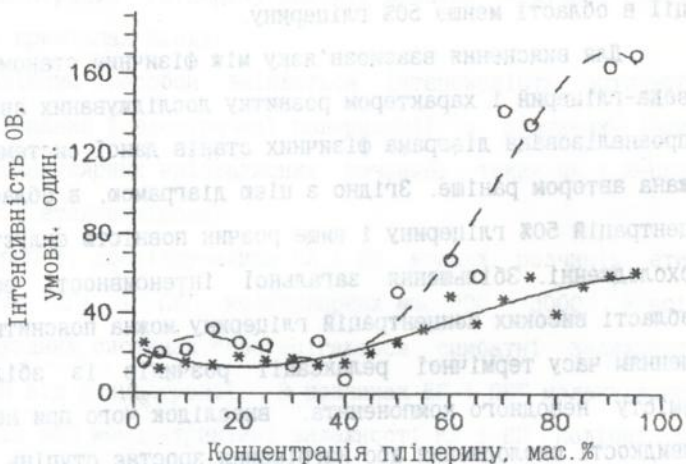


Рис.2. Залежність інтенсивності кріолюмінесценції від складу системи вода-гліцерин:
* - охолодження, о - нагрівання.

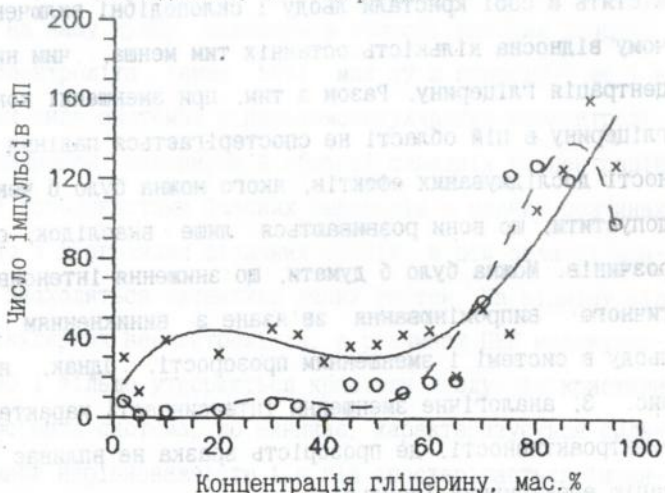


Рис.3. Залежність кількості електричних імпульсів, що реєструються ємнісного зондом, від складу системи вода-гліцерин: х - охолодження; о - нагрівання.

Його концентрації більше 50% і слабо залежить від концентрації в області менше 50% гліцерину.

Для в'яснення взаємозв'язку між фізичним станом системи вода-гліцерин і характером розвитку досліджуваних явищ була проаналізована діаграма фізичних станів даної системи, одержана автором раніше. Згідно з цією діаграмою, в області концентрацій 50% гліцерину і вище розчин повністю склується при охолодженні. Збільшення загальної інтенсивності ефектів в області високих концентрацій гліцерину можна пояснити збільшенням часу термічної релаксації розчинів із збільшенням вмісту неводного компонента, внаслідок чого при незмінній швидкості охолодження або нагрівання зростає ступінь термічної нерівноважності системи після швидкої зміни температури.

Відомо, що в області малих концентрацій гліцерину заморожені розчини гетерогенні [Зинченко А. В. 1982, 1983]. Вони містять в собі кристали льоду і склоподібні включення, причому відносна кількість останніх тим менша, чим нижча концентрація гліцерину. Разом з тим, при зменшенні концентрації гліцерину в цій області не спостерігається падіння інтенсивності досліджуваних ефектів, якого можна було б чекати, якщо допустити, що вони розвиваються лише внаслідок склування розчинів. Можна було б думати, що зниження інтенсивності оптичного випромінювання зв'язане з виникненням кристалів льоду в системі і зменшенням прозорості. Однак, як видно з рис. 3, аналогічне зменшення інтенсивності характерне і для електроактивності, де прозорість зразка не впливає на реєстрацію електричних імпульсів.

На основі цих фактів можна допустити, що основний вклад в явища криолюмінесценції і електроактивності в області ма-

лих концентрацій гліцерину вносять процеси термічної релаксації в кристалах льоду.

Подібним способом змінюється інтенсивність оптичного випромінювання і електричної поляризації в розчинах інших низькомолекулярних кризоахісних речовин, таких як 1,2-пропандіол і етиленгліколь.

В роботі досліджувались КЛ і ЕП водних розчинів етиленглікю (ЕГ) і ПЕГ молекулярних мас 300 - 3000. У всіх досліджуваних системах спостерігаються симбатні залежності КЛ і ЕП від концентрації. В розчинах ЕГ і ПЕГ молекулярних мас менше 600 концентраційні залежності КЛ і ЕП подібні до описаних вище систем з низькомолекулярними неелектролітами. Це видно з поданих на рис 4 і рис 5. В розчинах ПЕГ молекулярних мас 600 і більше спостерігаються два максимуми на залежностях інтенсивності КЛ і ЕП від концентрації (рис. 6, рис. 7). На нашу думку, максимум в області високих концентрацій неелектроліта (вище 50%) має ту ж природу, що і в розглянутих вище системах з низькомолекулярними неелектролітами. Виникнення максимуму в області середніх концентрацій зв'язане з особливостями фазових переходів в водних розчинах ПЕГ. Згідно з діаграмами фізичних станів, в цій області концентрацій знаходяться евтектики даних систем. На відміну від низькомолекулярних неелектролітів, в розчинах ПЕГ молекулярних мас 600 і більше утворюються кристали льоду і кристали ПЕГ. Гетерогенна система, що виникає, характеризується сильною термічною нерівноважністю і в ній спостерігається інтенсивна КЛ і ЕП.

Було показано, що зниження швидкості охолодження приводить до зменшення КЛ і ЕП. Звідси витікає, що механізм КЛ і

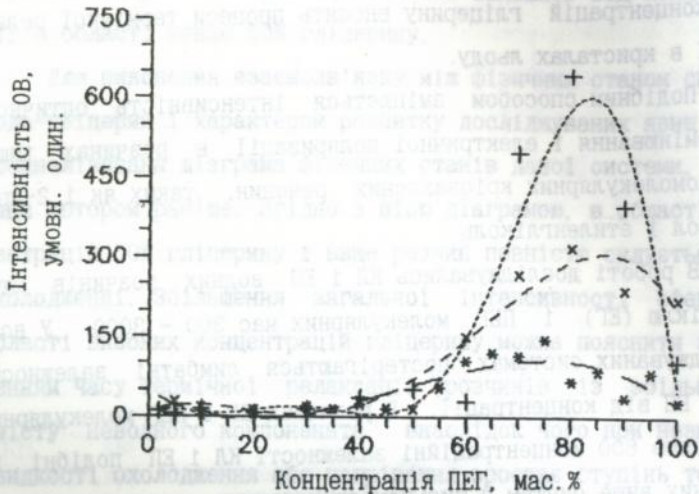


Рис. 4. Залежності інтенсивності ОВ від концентрації в водних розчинах ПЕГ-300, ПЕГ-400 і ПЕГ-600 (охолодження);
+ - вода - ПЕГ-300, x - вода - ПЕГ-400, * - вода - ПЕГ-600.

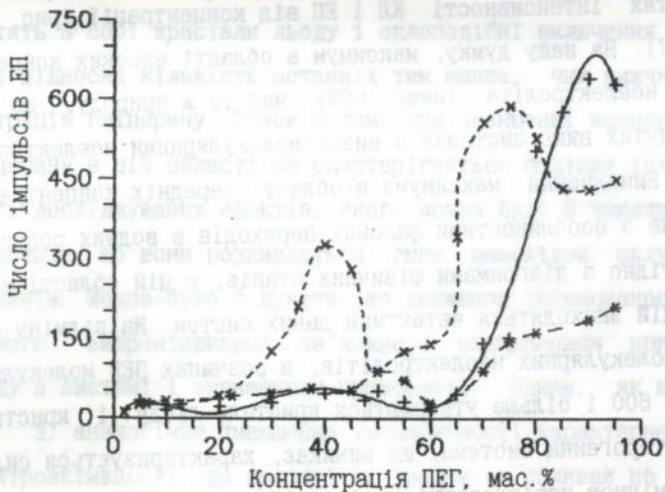


Рис. 5. Залежності числа імпульсів ЕП від концентрації в водних розчинах ПЕГ-300, ПЕГ-400 і ПЕГ-600 (охолодження);
* - вода - ПЕГ-300, + - вода - ПЕГ-400, x - вода - ПЕГ-600.

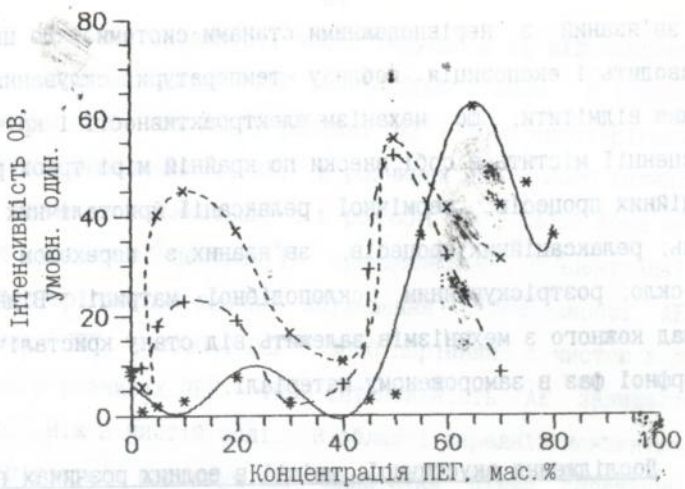


Рис. 6. Залежності інтенсивності ОВ від концентрації в водних розчинах ПЕГ-1000, ПЕГ-2000 і ПЕГ-3000 (охолодження) * - вода-ПЕГ-1000, + - вода-ПЕГ-2000, x - вода - ПЕГ-3000.

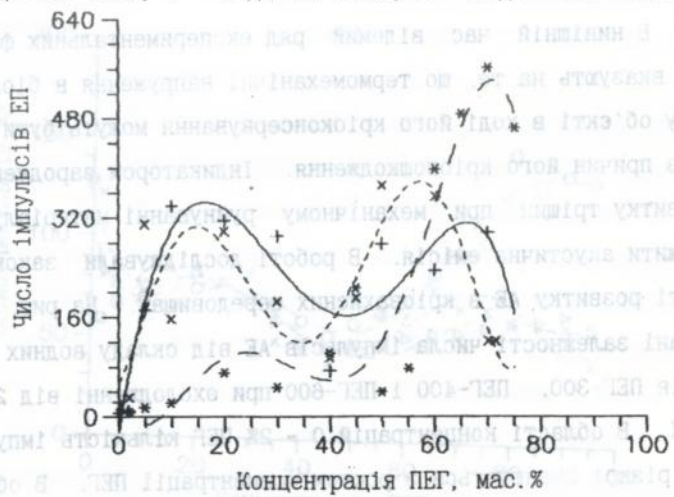


Рис. 7. Залежності числа імпульсів ЕП від концентрації в водних розчинах ПЕГ-1000, ПЕГ-2000 і ПЕГ-3000 (охолодження); * - вода-ПЕГ-1000, + - вода - ПЕГ-2000, x - вода-ПЕГ-3000.

ЕП зв'язаний з нерівноважними станами системи. До цього ж приводить і експозиція поблизу температури склування T_g . Можна відмітити, що механізм електроактивності і криолюмінесценції містить в собі внески по крайній мірі трьох релаксаційних процесів: термічної релаксації кристалічних утворень; релаксаційних процесів, зв'язаних з переходом рідина-скло; розтріскуванням склоподібної матриці. Відносний вклад кожного з механізмів залежить від стану кристалічної і аморфної фаз в замороженому матеріалі.

Дослідження акустичної емісії в водних розчинах гліцерину, 1,2-ПД і ПЕГ молекулярних мас 300 - 3000 при охолодженні-нагріванні.

В нинішній час відомий ряд експериментальних фактів, які вказують на те, що термомеханічні напруження в біологічному об'єкті в ході його криоконсервування можуть бути однією з причин його крипошкодження. Індикатором зародження і розвитку тріщин при механічному руйнуванні матеріалу може служити акустична емісія. В роботі досліджували закономірності розвитку АЕ в криозахисних середовищах. На рис. 8 показані залежності числа імпульсів АЕ від складу водних розчинів ПЕГ-300, ПЕГ-400 і ПЕГ-600 при охолодженні від 273 до 77 К. В області концентрацій 0 - 2% ПЕГ кількість імпульсів АЕ різко зменшується з ростом концентрації ПЕГ. В області середніх концентрацій спостерігається слабкий мінімум інтенсивності АЕ. При концентраціях вище 50% ПЕГ інтенсивність АЕ зростає з ростом концентрації ПЕГ в розчинах ПЕГ-600 і слабо залежить від концентрації в розчинах ПЕГ-300 і ПЕГ-400. На

рис. 9 показані залежності числа імпульсів АЕ від концентрації в системах вода - ПЕГ 1000, 2000 і 3000. В діапазоні концентрацій 0 - 2% ПЕГ в розчині ПЕГ - 1000 спостерігається зменшення інтенсивності АЕ, в розчинах ПЕГ - 2000 інтенсивність майже не змінюється, а в розчині ПЕГ - 3000 вона зростає з ростом концентрації. При досягненні концентрації 5% ПЕГ спостерігається значне збільшення інтенсивності АЕ в розчинах ПЕГ - 2000 і ПЕГ - 3000 порівняно з чистою водою, тоді як в розчинах ПЕГ - 1000 інтенсивність АЕ залишається нижчою, ніж в чистій воді. В області середніх концентрацій спостерігається максимум АЕ, який стає більш вираженим з ростом молекулярної маси ПЕГ.

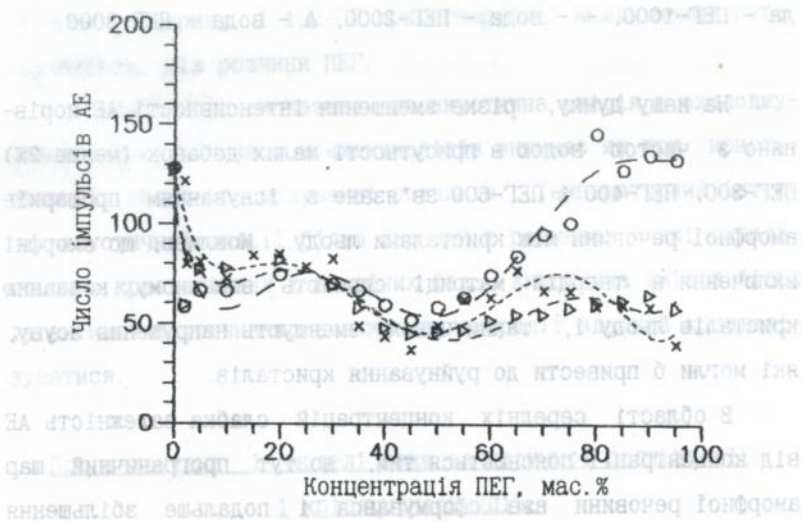


Рис. 8. Залежність числа імпульсів АЕ, зареєстрованих при охолодженні в системах вода - ПЕГ від концентрації: Δ - вода - ПЕГ-300, x - вода - ПЕГ-400, o - вода - ПЕГ-600

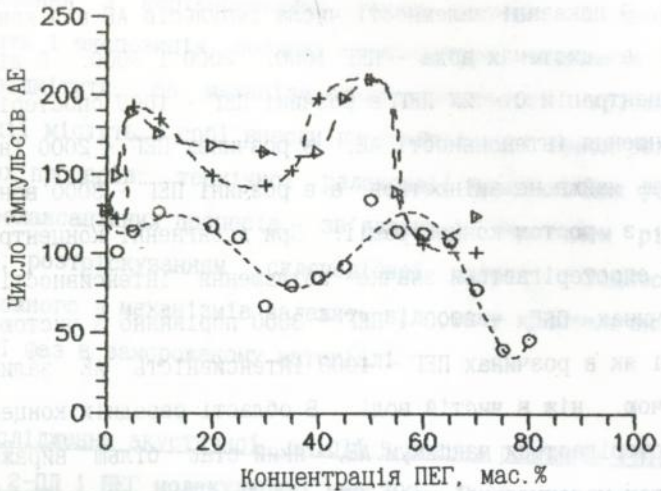


Рис. 9. Залежність числа імпульсів АЕ, зареєстрованих при охолодженні системи вода - ПЕГ від концентрації, о - вода - ПЕГ-1000, + - вода - ПЕГ-2000, Δ - вода - ПЕГ-3000

На нашу думку, різке зменшення інтенсивності АЕ порівняно з чистою водою в присутності малих добавок (менше 2%) ПЕГ-300, ПЕГ-400 і ПЕГ-600 зв'язане з існуванням прошарків аморфної речовини між кристалами льоду. Можливо, що аморфні вclusions в твердій матриці сприяють взаємному ковзанню кристалів льоду і, таким чином, зменшують напруження зсуву, які могли б привести до руйнування кристалів.

В області середніх концентрацій слабка залежність АЕ від концентрації пояснюється тим, що тут програничний шар аморфної речовини вже сформувався і подальше збільшення кількості аморфної речовини вже слабо впливає на взаємне ковзання кристалів.

З ростом молекулярної маси ПЕГ в заморожених розчинах

утворюються не лише кристали льоду, але і кристали ПЕГ. Останні вже не можуть виконувати роль компенсатора напружень зсуву для кристалів льоду і не сприяють їх взаємному ковзанню. Крім того, різниця коефіцієнтів термічного розширення кристалів льоду і ПЕГ служить причиною термомеханічних напружень. Тому інтенсивність АЕ в розчинах ПЕГ-2000 і ПЕГ-3000 більш висока, ніж в чистій воді в області малих концентрацій ПЕГ.

Акустичну емісію досліджували також в водних розчинах гліцерину і 1,2-ПД. Невеликі добавки гліцерину і 1,2-ПД приводять до значного зменшення загальної кількості акустичних імпульсів порівняно з чистою водою. Спостерігається також істотно менша генерація АЕ в розчинах гліцерину і 1,2-ПД, ніж в розчинах ПЕГ. Цей факт зумовлений, мабуть, тим, що розчини гліцерину і 1,2-ПД при отвердінні мають меншу гетерогенність, ніж розчини ПЕГ.

Таким чином, показано, що акустична емісія в охолоджуваних водних розчинах неелектролітів виникає як при кристалізації, так і при склуванні розчинів. Температурний інтервал акустичної емісії більш широкий в розчинах, які складаються з кристалічних і аморфних фаз. Акустична емісія більш інтенсивна в розчинах, в яких неелектроліт здатний кристалізуватися.

Про механізми і моделі явищ електричної поляризації і криолюмінесценції.

Потенціал замерзання Воркмана-Рейнольдса. Виникнення потенціалу замерзання відноситься до одного з тих явищ фізи-

ки твердого тіла, якому дано поки що лише умоглядне пояснення. Суть його полягає в тому, що при кристалізації в кристалічну ґратку включаються чужерідні іони різних знаків в нееквівалентних кількостях і кристал росте об'ємно зарядженим. При цьому не зрозуміло, як іони долають кулонівські сили відштовхування на границі розподілу рідина-кристал. В роботі розглядається схема перенесення чужерідних іонів через границю розподілу в вигляді короткоживучих комплексів з іонами H_3O^+ або OH^- , завдяки чому кулонівські сили в момент переходу через границю розподілу не діють. Експериментальне вимірювання потенціалу замерзання показало, що його величина складає 0,7 В в фізіологічному розчині, що недостатньо для виникнення люмінесценції.

Акустоелектричний ефект. Одним з механізмів поляризації при розтріскуванні матриці, на нашу думку, може бути акустоелектричний ефект. Фізична суть його полягає в тому, що зміщення атомів, викликане ультразвуковою хвилею, відбивається на розподілі і характері руху носіїв заряду. Це призводить до виникнення електрорушійної сили в зразку. Оцінки чисельних значень електроакустичного потенціалу, виконані в роботі на основі теорії Вайнрайха дають величину потенціалу в декілька десятків вольтів, що достатньо для збудження газового розряду і оптичного випромінювання.

Виникнення зізнці потенціалів між новими поверхнями при утворенні тріщин. Виникнення зарядів при розтріскуванні може відбутися в тому випадку, коли утворення тріщини призводить до розділення неоднакових за своїми електричними властивостями поверхонь. В склоподібному стані, на нашу дум-

ку, такими неоднорідностями можуть служити ліквіації, тобто неоднакові за своїм складом включення з неоднорідним розподілом концентрацій розчинених речовин.

Згідно з теорією Генрі [Henry P.S.H., 1953] при контакті неоднакових за своїми електричними властивостями поверхонь між ними виникає різниця потенціалів, яка по порядку величини близька до різниці робіт виходу носіїв заряду з цих поверхонь. Якщо між такими поверхнями утворюється тріщина, то утворені нові поверхні можна розглядати як обкладки конденсатора, відстань між якими збільшується. Тому за рахунок зменшення ємності при незмінному заряді різниця потенціалів зростає і може досягти сотень вольт, що достатньо для утворення газового розряду.

Про можливі механізми генерації оптичного випромінювання при заморожуванні-нагріванні розчинів.

Закономірності генерації оптичного випромінювання при заморожуванні - нагріванні розчинів багато в чому подібні до тих, що спостерігаються при відшаруванні полімерів від різних підкладок і при механічних руйнуваннях твердих тіл. Оскільки існує симбатність криолюмінесценції і оптичного випромінювання, то звідси можна зробити висновок, що одним з механізмів оптичного випромінювання є газовий розряд по закону Пашена. Крім того, тут можливі ті ж механізми, які діють при руйнуванні твердих тіл: виникнення вимушених коливань атомів ґратки, рекомбінація розірваних хімічних зв'язків (хемілюмінесценція). Ще одним механізмом оптичного випромінювання може бути виникнення високої температури в верхній тріщині. Ми вважаємо, що всі ці механізми діють одно-

часно.

Теплофізичні дослідження водних розчинів кріопротекторів.

Як було показано вище, виникнення термомеханічних напружень і електричної поляризації в заморожених біологічних об'єктах тісно пов'язане з особливостями фазових переходів в цих системах. Оскільки фазові переходи при кріоконсервуванні живих систем багато в чому визначаються кріозахисними речовинами, то аналіз особливостей фазових переходів в розчинах кріозахисних речовин дуже важливий для розуміння особливостей виникнення термомеханічних напружень і електричної поляризації в кріоконсервованих біологічних системах.

Досліджувались низькотемпературні фазові переходи в водних розчинах ПЕГ-1000, в середовищі для кріоконсервування гепатоцитів на основі ДМСО, в потрійній системі вода - 1,2-ПД - полівінілпірролідон.

ПЕГ-1000 займає в гомологічному ряду поліетиленгліколів "пограничне" положення. В цьому діапазоні молекулярних мас молекули ПЕГ переходять від лінійної форми, характерної для низькомолекулярних ПЕГ, до більш компактної, клубкоподібної. Це супроводжується зміною фізичних характеристик ПЕГ. На підставі аналізу діаграм фізичного стану системи вода - ПЕГ-1000 встановлено, що система найбільш схильна до утворення метастабільних стекол при такому співвідношенні компонентів, яке відповідає числу гідратації ПЕГ (2 молекули води на одну оксиетильну ланку ПЕГ). При цьому молекули води і ПЕГ максимально втягнуті в міжмолекулярні водневі зв'язки. Саме в цьому діапазоні концентрацій спостерігаються екстре-

муми ЕП, КЛ і АЕ.

Дослідження потрійної системи вода - 1,2-полівінілпірролідон дають підстави говорити про те, що має місце вплив високомолекулярного компонента (ПВП) на стабільність аморфного стану водних розчинів 1,2-ПД.

Для інших досліджуваних систем були знайдені температури склування, кристалізації з переохолодженого стану і плавлення. Ці результати використовувались в роботі для пояснення особливостей електричної поляризації і виникнення термомеханічних напружень.

Добавки сахарів входять в склад багатокomпонентних криозахисних речовин, які були підібрані кріобіологами емпірично. В роботі досліджувались закономірності розвитку нерівноважних кристалічних і склоподібних утворень в водних розчинах сахарози, глюкози, лактози і мальтози в межах розчинності. На основі аналізу низькотемпературних фазових переходів встановлено, що добавки сахарів зменшують схильність водних розчинів інших неелектролітів до утворення кристалічних форм на стадії нагрівання. Цей факт лежить в основі зменшення пошкоджень заморожених біологічних об'єктів за рахунок росту кристалів льоду.

Дослідження пошкодження мембран в твердій матриці.

Дослідження модельних мембран проводились з метою виявлення можливих наслідків, що виникають в результаті заморожування - нагрівання і перебування мембрани в твердій фазі. Спостерігали за порушенням цілості модельної мембрани після заморожування-нагрівання в різних середовищах на осно-

ві аналізу електропровідності модельної мембрани.

На рис. 10 показана температурна залежність електропровідності системи з лецитинхолестериною (ЛХ) плівкою в фізіологічному розчині і в криозахисному розчині. Гістерезисний характер одержаної залежності пояснюється тим, що при охолодженні і нагріванні існують значні температурні градієнти між центральними і периферичними частинами стакана з мембраною. Температура на рис. 10 відповідає показанню температури в центрі стакана. Як видно з рис. 10 А, електропровідність системи після завершення циклу охолодження-нагрівання приблизно в два рази перебільшує початкове значення електропровідності. Якщо зразок після відтанення витримати 20 - 30 хв при температурі 295 К, то електропровідність повертається до початкового значення. Цей факт вказує на виникнення дефектів в ЛХ плівці і "заліковування" їх під час експозиції при температурі вище 273 К. На рис. 10 (Б, В) показані аналогічні залежності для системи з ЛХ плівкою в розчинах ПЕГ-300 і ПЕГ-1500. Як і в розглянутому вище випадку, значення електропровідності після відігрівання більш високе, ніж перед заморожуванням і спостерігається поступове зменшення провідності в відігрітих зразках (заліковування дефектів).

На основі одержаних результатів можна запропонувати модель розвитку пошкоджень мембран в твердофазному замороженому стані. Згідно з сформульованою нами гіпотезою, пошкодження може носити електричну природу внаслідок розвитку електричних явищ на границі розподілу фаз. Крім того, тут можуть діяти механічні напруження внаслідок неоднакових коефіцієнтів теплового розширення матеріалів. Ці фактори діють одно-

часно, причому саме в твердофазному стані.

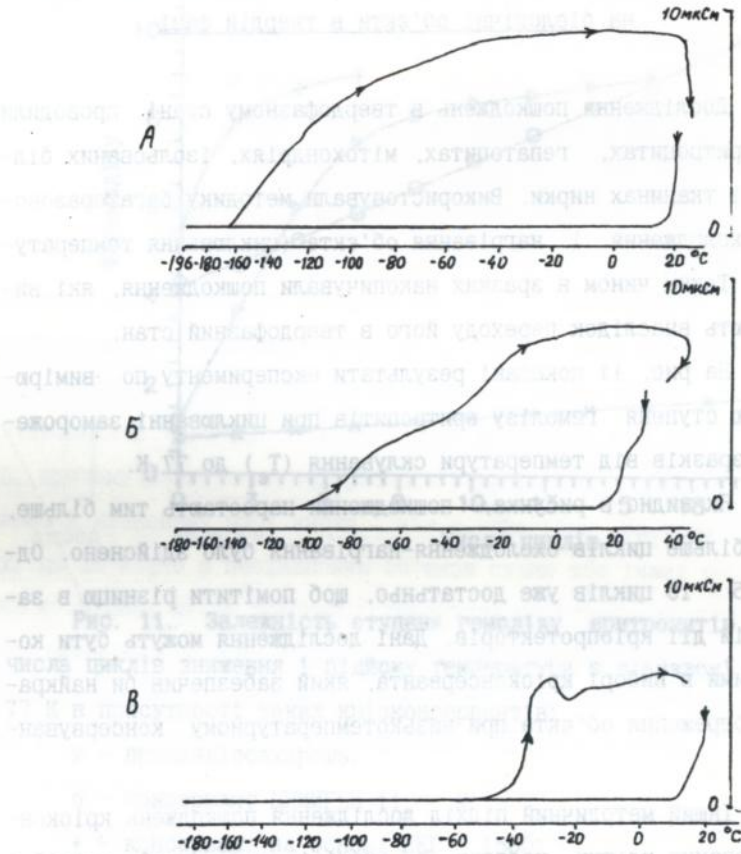


Рис. 10. Залежності електропровідності модельної мембранної системи з ЛХ плівкою від температури в різних середовищах при охолодженні і нагріванні:

А - в фізіологічному розчині;

Б - в 15% розчині ПЕГ - 300;

В - в 15% розчині ПЕГ - 1000.

Дослідження дії термомеханічних і електричних факторів
на біологічні об'єкти в твердій фазі

Дослідження пошкоджень в твердофазному стані проводили на еритроцитах, гепатоцитах, мітохондріях, ізольованих білках і тканинах нирки. Використовували методику багаторазового охолодження і нагрівання об'єкта (циклювання температури). Таким чином в зразках накопичували пошкодження, які виникають внаслідок переходу його в твердофазний стан.

На рис. 11 показані результати експерименту по вимірюванню ступеня гемолізу еритроцитів при циклюванні заморожених зразків від температури склування (T_g) до 77 К.

Як видно з рисунка, пошкодження наростають тим більше, чим більше циклів охолодження-нагрівання було здійснено. Однак 5 - 15 циклів уже достатньо, щоб помітити різницю в захисній дії криопротекторів. Дані дослідження можуть бути корисними в виборі криоконсерванта, який забезпечив би найкраще збереження об'єкта при низькотемпературному консервуванні.

Інший методичний підхід дослідження пошкоджень криоконсервованих клітин полягав в аналізі акустичної емісії і електроактивності охолоджуваних систем і аналізі ступеня пошкодження клітин. Для долідження використовували гепатоцити з печінки щура, консервовані під захистом розчину на основі ДМСО в режимах швидкого одноетапного охолодження або двохетапного охолодження з експозицією при 243 К.

На рис. 12 показані записи акустичної емісії і сигналів на ємнісному зонді при одноетапному і двохетапному охолод-

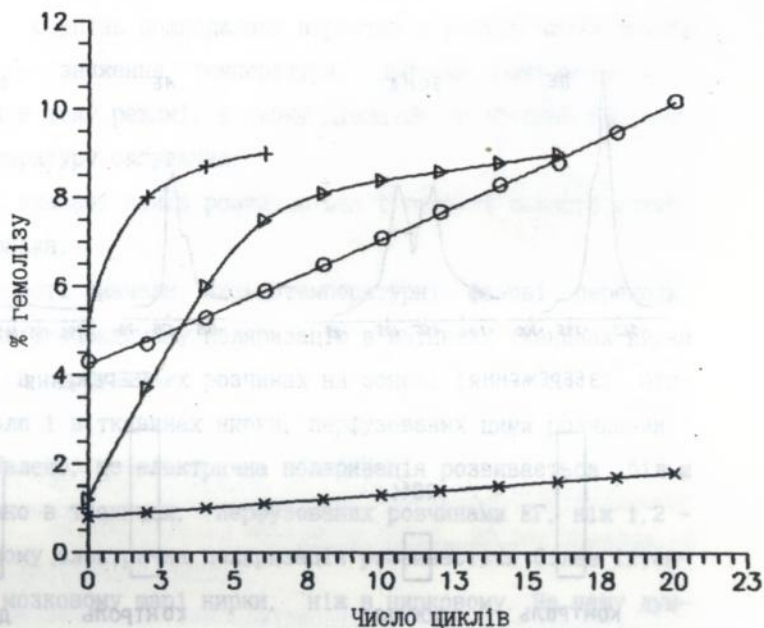


Рис. 11. Залежність ступеня гемолізу еритроцитів від числа циклів зниження і підйому температури в діапазоні $T_g + 77$ К в присутності таких кріоконсервантів:

x - пропандіосахароль;

o - консервант ЦНИИГПК 11₅ - М;

+ - консервант на основі ПЕГ - 1500;

Δ - консервант на основі гліцерину.

женні гепатоцитів. Тут же подані результати про збереження гепатоцитів після нагрівання. Видно, що після одноетапного заморожування збереження клітин значно нижче, ніж після двоетапного. При цьому інтенсивність АЕ і ЕП в першому випадку значно вища, ніж в другому. Оскільки всі інші умови дослідження були однаковими в обох випадках, то більш високе збереження

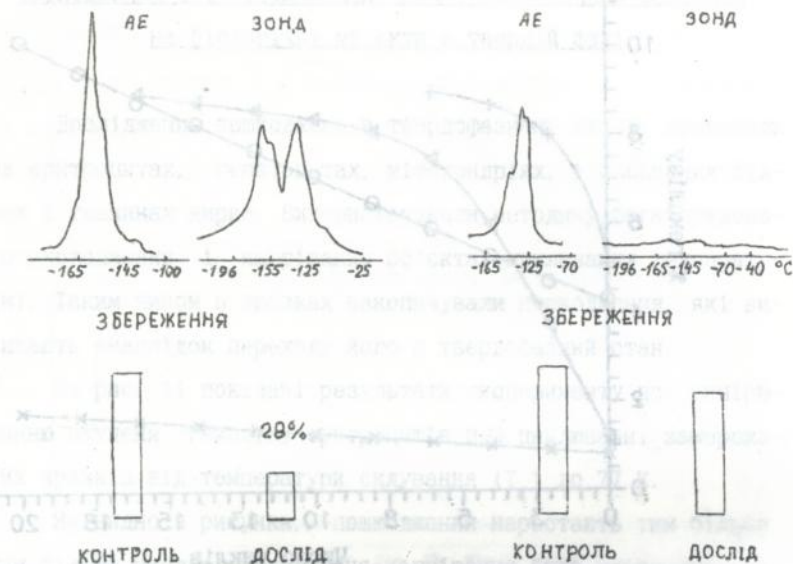


Рис. 12. Записи проінтегрованих акустичних сигналів (а) і електричних імпульсів на зонді (б) при одноетапному (1) і двоетапному (2) охолодженні гепатоцитів.

клітин можна пояснити саме зняттям термомеханічних напружень під час експозиції при 243 К і ослабленням зв'язаних з ними електричних явищ.

В якості біологічного об'єкта субклітинного рівня організації в роботі використовували мітохондрії з печінки щурів. Досліджували функціональний стан мітохондрій після температурного циклювання. Температурний діапазон циклювання лежав або нижче температури склування, або верхня границя його включала температуру склування. Спостерігалось погіршення

параметрів дихального контролю і відношення АДФ/С після циклювання. Ступінь пошкодження наростав з ростом числа циклів підйому - зниження температури, причому пошкодження були сильніші в тому режимі, в якому діапазон циклювання захоплював температуру склування.

Всі вказані явища розвиваються і процесі повного отвердіння зразка.

В роботі вивчали низькотемпературні фазові переходи, склування і електричну поляризацію в нативних тканинах нирки кролика, в перфузійних розчинах на основі 1,2 - ПД і етиленгліколю і в тканинах нирки, перфузованих цими розчинами.

Виявлено, що електрична поляризація розвивається більш інтенсивно в тканинах, перфузованих розчинами ЕГ, ніж 1,2 - ПД, причому електрична поляризація розвивається більш інтенсивно в мозковому шарі нирки, ніж в нирковому. На нашу думку, це зв'язано з неоднаковим об'ємом судин або інших порожнин в різних видах тканини. Наявність ниркових канальців у мозковому шарі призводить до неоднакової концентрації криопротектора в різних частинах тканини і до виникнення градієнтів фізичних властивостей замороженого зразка в силу його гетерогенності.

Встановлені факти дозволяють думати, що гетерогенність перфузованого органа являє собою фактор, що обмежує діапазон можливих швидкостей охолодження і нагрівання, оскільки веде до механічних порушень і пошкоджень тканини.

Дію термомеханічних напружень і електричної поляризації на об'єкти молекулярного рівня організації досліджували на розчинах ДНК і сироваткового альбуміну бика (САБ). Було виявлено, що багатократне циклювання температури призводить до

зниження в'язкості розчинів ДНК, що може пояснюватись двох-нитковими розривами ДНК.

В розчинах САБ досліджували теплову денатурацію без заморожування, після однократного і багатократного охолодження-нагрівання в області T_g . Згідно з одержаними результатами, спостерігаються зміни структурної організації молекул САБ, які полягають в тому, що відносна кількість термостабільних доменів зростає тим більше, чим більше циклів охолодження-нагрівання було проведено в області T_g .

Вся сукупність одержаних результатів вказує на те, що перебування заморожених біологічних об'єктів в умовах, коли в них розвиваються термомеханічні напруження і електрична поляризація, призводять до пошкодження на молекулярному, клітинному і тканинному рівнях.

ВИСНОВКИ

1. Експериментально доведено, що в основі явища електричної поляризації водних систем при охолодженні і нагріванні в температурному діапазоні нижче 273 К лежать нерівноважні стани речовини, зв'язані з утворенням не лише кристалічних, але і аморфних фаз.

2. Виявлено існування взаємозв'язку між виникненням електромагнітного випромінювання водних систем в ході їх охолодження - нагрівання і електричною поляризацією матриці. Якісно розглянуті механізми і моделі явищ електричної поляризації і криолюмінісценції.

3. Електрична поляризація і криолюмінісценція при охолодженні - нагріванні водних систем криопротекторів тим більш інтенсивні, чим більше система схильна до утворення

метастабільних фаз.

4. Водні розчини неелектролітів більш всього схильні до утворення метастабільних фаз при такому співвідношенні компонентів, при якому вміст води відповідає числу гідратації неелектроліта і розчин характеризується найбільшим втягненням компонентів у міжмолекулярні водневі зв'язки. Добавки сахарів знижують схильність водних розчинів неелектролітів до кристалізації.

5. Акустична емісія, являючись індикатором термомеханічних напружень, характеризується більш високою інтенсивністю в системах, схильних до кристалізації, ніж в таких, які склуться. При наявності аморфних фаз між кристалами вони діють, як компенсатор напружень зсуву, що реєструється по зниженню акустичної емісії.

6. Встановлені закономірності утворення кристалічних і аморфних фаз в системах: вода - ПЕГ-1000, вода - 1.2-ПД-ПВП при різних співвідношеннях 1.2-ПД/ПВП; в водних системах сахарів: сахарози, глюкози, мальтози.

7. На прикладі еритроцитів и гепатоцитів показано, що кріоконсервовані клітини пошкоджуються тим в більшій мірі, чим більше циклів охолодження - нагрівання і переходів в твердофазний стан витримала клітина.

8. В кріоконсервованих мітохондріях під впливом термомеханічних і електричних факторів погіршуються параметри дихального контролю і АДФ/0.

9. В заморожених розчинах біополімерів при проходженні температури склування спостерігаються зміни молекулярної структури і розриви макромолекул.

10. На модельних мембранах за допомогою спеціально роз-

робленої методики показано, що мембрани пошкоджуються при заморожуванні в тому випадку, коли вони піддаються дії термомеханічних і електричних факторів заморожування в твердофазному стані.

11. Кріопшкодження органів при температурах нижче точки кристалізації основної маси розчинника зв'язане з гетерогенністю будови органа і може бути ослаблене створенням умов затвердіння розчинника в аморфному стані.

12. Розроблені методичні підходи і виготовлено обладнання для багатократного циклювання температури заморожених біологічних об'єктів в твердофазному стані з метою експериментальної перевірки дії термомеханічних і електричних факторів на заморожені об'єкти.

13. Розроблені методичні підходи і експериментальна апаратура для дослідження електричної поляризації, оптичного випромінювання, акустичної емісії і електропровідності в процесі охолодження до 77 К і нагрівання кріобіологічних систем.

Перелік робіт, опублікованих за темою дисертації

1. Зинченко А.В., Моисеев В.А. Исследование низкотемпературных фазовых переходов в водных растворах ПЭГ-400 калориметрическим методом// Криобиология и криомедицина. - 1979. - в. 5. - С. 27-30.

2. Зинченко А.В. Манк В.В., Овчаренко Ф.Д., Репин Н.В., Скорняков Б.А. Строение и фазовые состояния водно - глицериновых растворов// Докл. АН УССР, сер Б.-1982. - № 8. - С. 38-42.

3. Зинченко А.В., Манк В.В., Моисеев В.А., Овчаренко Ф.Д., Прохвятилов А.И. О фазовых переходах и физических сос-

- тояниях системы вода - пропандиол// Докл. АН СССР. - 1983. - 269, N1. - С.144-146.
4. Зинченко А.В., Моисеев В.А. Физическое состояние системы вода-этиленгликоль по данным дифференциальной сканирующей калориметрии// Криобиология. - 1986. - N4. - С. 25-28.
5. Зинченко А.В., Гулевский А.К., Михалев О.И., Рязанцев В.В., Волков В.Я. О физических состояниях и криозащитных свойствах холинхлорида// Криобиология. - 1987. - N1. - С. 17-21.
6. Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Моисеев В.А. О низкотемпературных фазовых переходах в водных растворах полиэтиленгликолей// Рук. деп. в ВИНТИ 29.04.87 N3021-B87.
7. Воротилин А.М., Зинченко А.В., Моисеев В.А., Аненко В.И. Влияние механоэлектрического фактора на повреждение клеток при нагреве// Криобиология. - 1988. - N3. - С.31-35.
8. Грищенко В.И., Моисеев В.А., Зинченко А.В. О диэлектрическом пробое мембран при криоконсервировании биологических объектов// Докл. АН СССР. - 1989. - т.308, N1. - С.215-217.
9. Зинченко А.В., Воротилин А.М., Моисеев В.А. Повреждение эритроцитов при низких температурах// Криобиология. - 1990. - N4. - С.48-49.
10. Зинченко А.В., Воротилин А.В., Моисеев В.А., Подопригора Л.И. Механизмы повреждения эритроцитов при замораживании// Криобиология. - 1990. - N3. - С.23-27.
11. Vorotilin A.M., Zinchenko A.V., Moiseyev V.A. Cell crioinjury at the state of thawing// Cryo-Letters, 1991. - 12. - С. 77-86.

12. Терентьев А.Н., Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Щетинский М.И., Мусатов В.И. Влияние некоторых криопротекторов на состояние воды в клетках *Y.Pestis*. Проблемы криобиологии. - 1993. - №1. - С. 20-26.
13. Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Моисеев В.А. Моделирование повреждения мембран в твердой матрице// Проблемы криобиологии. - 1993. - № 2. - С.17-22.
14. Зинченко А.В., Мусатова И.Б. Электрические явления в водных растворах низкомолекулярных полиэтиленгликолей при охлаждении - нагреве// Проблемы криобиологии. - 1993. - № 3. - С. 40-43.
15. Зинченко А.В., Мусатова И.Б. Оптическое излучение водных растворов ПЭГ-300, ПЭГ-400 и ПЭГ-600 при термическом воздействии// Докл. НАН Украины. - 1994. - №4. - С. 132-136.
16. Зинченко А.В., Петренко А.Ю., Моисеев В.А., член-корр. НАН Украины Белоус, академик НАН Украины Грищенко В.И. Термомеханические и электрические явления в суспензиях клеток печени при охлаждении// Докл. Академии Наук Украины. - 1994. - №2. - С. 75-78.
17. Зинченко О.В., Грищенко В.И., Мойсеев В.О. Електричні явища і оптична емісія у водних розчинах гліцерину під час охолодження - нагрівання// Український фізичний журнал. - 1994. - 39, № 3-4, С. 439-442.
18. Зинченко А.В., Дворцовой В.К., Диалло М. О влиянии сахарозы на низкотемпературные фазовые переходы в растворах некоторых криозащитных веществ// Проблемы криобиологии. - 1995. - №2. - С. 52-53.
19. Зинченко А.В. О некоторых механизмах электрической поляризации растворов при замерзании// Проблемы криобиоло-

гии. - 1996. - №4. - С.55-56.

20. Зинченко А.В. Экспериментальная регистрация оптического излучения, электрической поляризации и акустической эмиссии при криоконсервировании биологических объектов// Вестник проблем биологии и медицины. - 1997. - №5. - С. 120-124.

21. Зинченко А.В. Исследование термомеханических и электрических явлений при низкотемпературной консервации почки кролика// Вестник проблемы биологии и медицины. - 1997. - №5. - С.125-130.

22. Зинченко А.В. Влияние термомеханических и электрических факторов на функциональное состояние митохондрий печени крыс при криоконсервации// Вестник проблемы биологии и медицины. - 1997. - №5. - С.131 - 138.

23. Зинченко А.В. Об электрической поляризации и оптическом излучении водных растворов полиэтиленгликолей при охлаждении - нагреве// Проблемы криобиологии. - №1. - С.78-81.

24. Зинченко А.В., Моисеев В.А. О явлениях электроактивности в криобиологических системах при охлаждении до -196° С и нагреве / Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем: Сб. научных трудов ИПКИК АН УССР. - Харьков, 1989. - С.42 - 47

25. Зинченко А.В., Моисеев В.А. Механоэлектрические явления в растворах криопротекторов при замораживании - нагреве / Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов: Сб. научных трудов ИПК и К АН УССР. - Харьков. - 1990. - С.50-56.

26. Зинченко А.В., Моисеев В.А. Электрические явления в твердофазных ассоциированных системах при низких температу-

рах/ Химия низких температур и криохимическая технология: Сб. науч. тр. - М.: Изд-во МГУ, 1990 г. - С.97-105.

27. Примак А.И., Морозова Т.Ф., Зинченко А.В., Щетинский М.И. О состоянии воды в растворах миозин-соль-глицерин при температурах ниже 0°C / Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов: Сб. научн. тр. ИПКИК АН УССР, г; Харьков, 1990. - С. 50-56.

28. Зинченко А.В., Петренко А.Ю. Низкотемпературные фазовые переходы в среде для криоконсервирования гепатоцитов на основе ДМСО/ Физико-химические процессы в криобиологических системах: Сб. научн. тр. ИПКИК АН Украины, г. Харьков, 1991. - С. 56 - 59.

29. Зинченко А.В., Морозова Т.Ф. О молекулярных взаимодействиях в системе миозин - КС1 - глицерин/ Физико - химические процессы в криобиологических системах. Сб. науч. трудов ИПКИК АН Украины, г. Харьков, 1991. - С. 92-95.

30. Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Подопригора Л.П. Устройство дифференциального термического анализа А.с. СССР, Опубл. 30.10.88, БИ 1988, N40, С.203.

31. Зинченко А.В., Моисеев В.А. Способ определения криозащитных свойств для длительного хранения эритроцитов. А.с. СССР, N 4754035/14. Опубл. Б.И. N21, 1992.

32. Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Моисеев В.А. Способ определения механических повреждений криоконсервированных клеток. Патент России N 1827626. опубл. БИ, 1993, N26.

33. Зинченко А.В., Воротилин А.М. Вклад физических факторов в повреждение клеток в процессе замораживания-отогрева/ 2 Всесоюзная конференция "Механизмы криозащиты биологических объектов" Тез. докл., 1984. - т.1. - С.19.

34. Зинченко А.В., Воротилин А.М. Влияние фазовых переходов и механических напряжений на сохранность криоконсервированных эритроцитов/ Тез. докл. Международной конференции "Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины": Харьков, 1988. - С.

35. Зинченко А.В., Подопригора Л.П., Моисеев В.А. О метастабильных состояниях системы вода - 1.2-ПД - ПВП в диапазоне температур 77 - 273 К. / IV Всесоюзная конференция по химии низких температур, М., 1988, 21-23 дек. Тез. докл. С.172-173.

36. Зинченко А.В., Моисеев В.А. Метод криолюминесценции в исследовании физико - химических процессов при охлаждении - нагреве/ IV Всесоюзная конференция по химии низких температур, М., 1988, 21-23 дек. Тез. докл. С.174-175.

37. Зинченко А.В. О явлениях электроактивности в криобиологических системах при охлаждении до -196°C и нагреве/ 11th IUPAC Conference on Chemical Thermodynamics, Como, Italy, August 26-31, 1990.

38. Зинченко А.В., Воротилин А.М. О метастабильных состояниях в суспензиях эритроцитов при криоконсервировании/ 11th IUPAC Conference on Chemical Thermodynamics, Como, Italy, August 26-31, 1990.

39. Зинченко А.В., Моисеев В.А. О механизме криолюминесценции/ Всес. школа-семинар "Био-термо-хеми-люминесценция": Москва - Суздаль, Методические указания, ч.2. - С.56-57

40. Зинченко А.В., Моисеев В.А. Электромагнитное излучение в жидкостях при стекловании/ V11 конференция по спектроскопии биополимеров. 1-4 октября 1991г. г. Харьков. -

Тез. докл. - 1991 С.109-110.

41. Зинченко А.В., Моисеев В.А. Физические явления в твердофазной матрице и их возможная роль при криоконсервировании/ Успехи современной криобиологии. Международная конференция. 21-25 апреля 1992 г., Украина, Харьков. - Тезисы докладов, С. 71-72.

42. Зінченко А.В., Мусатова І.Б. Деякі фізичні механізми кріпошкоджень мітохондрій в твердофазній матриці/ Матеріали 1-го з'їзду Українського біофізичного товариства. - 20-24 червня 1994, Київ. - С.106-107.

43. Зинченко А.В., Юхник А.С., Жарова Т.С. Низкотемпературные фазовые переходы и стеклование в растворах некоторых сахаров/ 1 з'їзд товариства криобіології і кріомедицини. Харків, 1995, 18-20 жовтня. - Тези доповідей. - 1995. - С. 79-80.

44. Zinchenko A.V., Moiseyev V.A., Vorotilin V.A The use of differential scanning calorimetry in the study of erythrocyte suspension freezing and thawing/ In abstracts: Internatinal simposium in biocalorimetry". Tbilisi, 1981. P. 60

45. Zinchenko A.V., Vorotilin A.M., Moiseyev V.A. Effect of depth of cooling on erythrocyte membrans integrity in solutions of ethylene glycol and propilene glycol /In abstracts: "Second International Conference of Water and Ions in Biological Systems" Busharest, Romania, September, 6-11, 1982. P. 270 - 271

46. Zinchenko A.V., Moiseyev V.A. The study of water binding in biological system by means of thermophysical methods/ 10th IUPAC Conference on Chemical Thermodynamics. August 29 - Sept. 2, 1988, Prague, Czechoslovakia, Тез. докл.

G-28.

47. Zinchenko A.V. Phase equilibrium and metastable states in aqueous solution of some multiatomic alcohols and choline chloride at temperature below 273 K/ 10th IUPAC Conference in Chemical Thermodynamics. August 20 - sept.2, 1988, Prague, Czechoslovakia. - Тез. докл. G-20.

48. Zinchenko A.V., Dvortsevov V.K Kiroshka V.V. Markovsky A.L. Role of Thermomechanical Tensions on Survival of Red Blood Cells in vitrified Solutions of Cryoprotectants/ Proceeding the Society for low temperature biology International meeting university of Leuven 19 - 23 July 1994. K.U.Leuven

49. Zinchenko A.V., Dvortsevov V.K., Borodina O.V., Zinchenko V.D., Koptelov V.A. On the thermomechanical and electric events during low temperature preservation of rabbit kidney P.196 / Society for Cryobiology 31st Annual Meeting Program and Abstracts. August 21-26, 1994, Kyoto, Research, Kyoto, Japan, P.196

50. Zinchenko A.V., Kuleshova L.L. Crystalline and glass-like forms in water- 1,2-propanediol - polyvinylpyrrolidone system under various cooling and heating rates/ Society for Cryobiology 31st Annual Meeting Program and Abstracts. August 21-26, 1994, Kyoto, Research, Kyoto, Japan, P.26.

51. Zinchenko A.V., Moiseyev V.A. On the possible mechanism of increasing lethality of biological systems during low temperature storage/ Society for Cryobiology 31st Annual Meeting Program and Abstracts. August 21-26, 1994, Kyoto, Research, Kyoto, Japan, P.134

Зинченко А. В. "Физико-химические процессы в криобиологических системах при стекловании и в твердой фазе". рукопись диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.22 - "Криобиология". Защита диссертации состоится в ИПКиК НАН Украины, г. Харьков.

Показано, что в ходе низкотемпературного консервирования биологических объектов возникает комплекс взаимосвязанных физических явлений: электрическая поляризация, оптическое излучение, акустическая эмиссия, установлена их взаимосвязь с фазовыми переходами и стеклованием. Установлена корреляция между оптическим излучением и электрической поляризацией, что указывает на общность их природы, причем интенсивность этих явлений определяется степенью гетерогенности системы. Акустическая эмиссия, являясь индикатором термомеханических напряжений и разрушений образцы более интенсивна в системах, склонных к кристаллизации. На модельных системах и на реальных замороженных объектах показано, что в твердофазном состоянии механизмами криповреждения служат термомеханические напряжения и электрическая поляризация в замороженной матрице.

SUMMARY

Zinchenko A.V. "Physical and Chemical Processes in Cryobiological Systems under Glass Transition and in Solid Phase". Manuscript of thesis for a doctor's degree of biology according to the speciality 03.00.22 - "Cryobiology". Thesis defence will take place at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine. Kharkov. 1997.

It was shown that a complex of relative physical phenomena appeared in the course of low temperature preservation of biological objects: electrical polarization, optical irradiation, acoustic emission and their relationship with phase and glass transition has been established. Correlation between optical irradiation and electrical polarization has been established, which points to the common character of their nature, the intensity of these phenomena being determined by the system's heterogeneity extent. Acoustic emission, being samples thermomechanic tension and destruction indicator, is more intensive in systems inclined to crystallization. It was shown that thermomechanic tension and electrical polarization in the frozen matrix are cryoinjury mechanisms in solid-phase state in model systems and objects really frozen.

Ключові слова: криозахисні середовища, фазові переходи, склування, електромагнітне випромінювання, електрична поляризація, акустична емісія, крипошкодження, низькотемпературне консервування.



800.888A

Відповідальний за випуск - ГРИЩЕНКО В. І.

Підпис. до друку 16.05.97 Формат 60 x 84 1/16
Папір тип. Друк офсетний. Усл. др. арк. 2. 0.
Тираж 100 екз. Зам. 16,
безкоштовно

Ротапринт ФТІНТ НАН України, Харків, 310164,
пр-т Леніна, 47

432425

