

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ
НАН УКРАЇНИ**

СТРІХА ОКСАНА АНАТОЛІЇВНА

УДК 547.569.2:57.043:577.352.5

**ВПЛИВ КРІОПРОТЕКТОРІВ І ЗАМОРОЖУВАННЯ НА
ЕЛЕКТРОІЗОЛЯЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН
ООЦИТІВ І ДВОКЛІТИННИХ ЕМБРІОНІВ МИШІ**

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Науковий керівник: член–кореспондент НАН України, доктор біологічних наук, професор

Гордієнко Євген Олександрович,

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, завідувач відділу низькотемпературного консервування, м. Харків

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Шкорбатов Юрій Георгійович,

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, завідувач відділу генетики НДІ біології, м. Харків

кандидат біологічних наук, доцент

Денисова Ольга Миколаївна,

Харківська державна зооветеринарна академія МАП України, доцент кафедри хімії та біології, м. Харків

Захист відбудеться «27» жовтня 2015 р. о 13–30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м.Харків, вул.Переяславська, 23

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул.Переяславська, 23

Автореферат розісланий «25» вересня 2015 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Д64.242.01

доктор біологічних наук, професор

Л. Ф. Розанов

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Однією з актуальних задач сучасної кріобіології є розробка способів тривалого кріоконсервування біологічних об'єктів шляхом їх глибокого заморожування. На збереженість кріоконсервованих клітин впливає велика кількість факторів, дії яких вони зазнають як на етапах підготовки до заморожування, так і на етапах заморожування та подальшого відігрівання. В процесі низькотемпературного консервування біологічних об'єктів суттєво порушується іонний і водний гомеостаз клітин. Такі порушення можуть відбуватися на різних етапах низькотемпературного консервування і обумовлені виходом із цитоплазми клітин основних іонів, що забезпечують іонний баланс клітин, під дією гіпертонічних кріозахисних розчинів, зміни концентрацій поза- та внутрішньоклітинних іонів. Ці процеси можуть позначатися на значеннях мембранного потенціалу клітин. Останнім часом показано, що порушення іонного цитоплазматичного балансу клітин може призвести до метаболічних відхилень, які суттєво знижують життєздатність клітин після кріоконсервування (Trimarchi J. R., 2000; Pogorelov A.G., 2006).

Переважає більшість факторів, що викликають пошкодження клітин на етапі заморожування безпосередньо або опосередковано пов'язані з утворенням в клітинній суспензії кристалів льоду (Гордиенко Е. А., 1994). Впродовж заморожування все більша частина води перетворюється в лід і концентрація розчинених речовин в міжкристалічному розчині відповідно зростає. Це призводить до значного зневоднення клітин, які витискаються кристалами льоду в рідку фазу, а також до зміни концентрацій поза- та внутрішньоклітинних іонів і, як наслідок, до зміни мембранного потенціалу клітин. Можна припустити, що явище електропорації біомембран може бути одним із механізмів кріопошкодження клітин на етапі кристалізації і плавлення клітинної суспензії. Як відзначалось раніше, однією з причин дестабілізації мембран при заморожуванні може бути виникнення електричного поля з напруженістю, достатньою для гіперполяризації мембран, що призводить до необоротного електричного пробоя (Steponkus P. L., 1985). Як значне зневоднення клітин, так і надмірне збільшення (за абсолютною величиною) мембранного потенціалу призводить до пошкодження клітин в процесі кріоконсервування. Пошкодження, які спостерігаються після відігрівання, такі як набухання та лізис клітин, що свідчать про порушення напівпроникливих властивостей плазматичних мембран, багато в чому подібні до явищ, які спостерігаються при дії електричного поля на клітини (Zimmermann U., 1982; Golberg A., 2013). Отримати безпосередній експериментальний доказ або спростування цієї гіпотези дуже важко. Навпаки, порівняно не складно зробити це шляхом фізико-математичного моделювання процесів трансмембранного переносу речовин, які відбуваються при заморожуванні та відтаюванні клітин. У кріобіологічній літературі є лише кілька робіт, присвячених такому моделюванню (Toner M., 1990). Крім того, є доцільним експериментальне вивчення умов, за яких має місце необоротний електричний пробій мембран клітин.

Загалом, можна стверджувати, що подальше теоретичне та експериментальне вивчення явища електричного пробоя клітинних мембран є актуальним та перспективним для вирішення загальнобіологічних проблем, створення нових

біомедичних технологій, а також для з'ясування пов'язаних з електропорацією механізмів пошкодження клітин в процесі їх низькотемпературного консервування та способів запобігання цим пошкодженням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана у відділі низькотемпературного консервування Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України в межах відомчих НДР: «Теоретичний аналіз та експериментальне дослідження специфічних механізмів кріопшкодження та кріозахисту клітин, зумовлених особливостями їх функціонування» (2006–2010 рр., № державної реєстрації 0106U002164) і «Теоретичне обґрунтування та експериментальне підтвердження способів підвищення адгезійної здатності клітин до і після кріоконсервування шляхом модифікації фізико–хімічних характеристик підкладки та поверхні клітинних мембран» (2011–2015 рр., № державної реєстрації 0111U001198).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – з'ясування умов порушення електроізоляційних властивостей цитоплазматичних мембран (електричного пробою) ооцитів і двоклітинних ембріонів миші в процесі низькотемпературного консервування.

Задачі дослідження:

- Створити оригінальну фізико–математичну модель процесів трансмембранного переносу речовин між клітинами та оточуючим їх середовищем у процесі низькотемпературного консервування, яка дозволяє оцінити зміни об'єму та мембранного потенціалу клітин.
- Теоретично оцінити вплив сил гідратаційного відштовхування між ліпідами у стінці гідрофільної пори на мембранний потенціал, який призводить до електричного пробою мембран ооцитів і двоклітинних ембріонів миші.
- За допомогою створеної моделі проаналізувати вплив розчинів етиленгліколю, диметилсульфоксиду та заморожування на мембранний потенціал ооцитів і двоклітинних ембріонів миші.
- Експериментально вивчити умови виникнення оборотного та необоротного електричного пробою двоклітинних ембріонів миші.

Об'єкт дослідження – зміна мембранного потенціалу клітин при дії розчинів етиленгліколю, диметилсульфоксиду та заморожування.

Предмет дослідження – електричний пробій як фактор кріопшкодження цитоплазматичних мембран ооцитів і двоклітинних ембріонів миші при дії розчинів етиленгліколю, диметилсульфоксиду та заморожування.

Методи дослідження. В роботі використані наступні теоретичні та експериментальні методи дослідження: фізико–математичне та комп'ютерне моделювання – для розрахунку залежностей складу поза– та внутрішньоклітинного середовищ, мембранного потенціалу та об'єму клітин при низькотемпературному консервуванні; метод імпульсної кондуктометрії – для вивчення електропровідності ембріонів миші під впливом кріопротекторів і після охолодження; метод гормональної суперовуляції – для отримання достатньої кількості ембріонів миші; метод оптичної мікроскопії – для візуальної оцінки морфологічного стану ембріонів та при маніпуляціях з окремими клітинами.

Наукова новизна одержаних результатів. Створено оригінальну модель для розрахунку змінення мембранного потенціалу, об'єму клітин і складу поза- і внутрішньоклітинного середовищ впродовж експозиції клітин у кріозахисному розчині та при їх заморожуванні. Вперше теоретично обґрунтовано можливість пошкодження клітин в процесі їх заморожування шляхом електричного прободу клітинних мембран. Експериментально встановлені умови, за яких відбувається електричний пробій ембріонів миші. Показано, що електропровідність мембран ембріонів миші може служити тестом для виявлення їх латентних пошкоджень.

Практичне значення отриманих результатів. Теоретично обґрунтовано механізм виникнення пори критичного радіуса при дії підвищеної напруженості поля. Результати, які були отримані можуть бути використані при удосконаленні існуючих і розробці нових способів низькотемпературного консервування ембріонів ссавців та інших типів клітин, а також для діагностики функціональної повноцінності клітин при реалізації різних клітинних біотехнологій. Фізико-математична модель, яка запропонована, дозволяє суттєво звузити область пошуку оптимальних умов кріоконсервування біологічних об'єктів.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійним науковим дослідженням. Автором роботи проведено аналіз літератури за темою дисертації, особисто отримано та статистично оброблено експериментальні дані, виконано чисельні розрахунки та сформульовано висновки.

В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає в наступному: у роботах [1, 5, 7, 8, 10, 11] – в отриманні клітин заданої стадії розвитку, проведенні експериментів, обробці та аналізі отриманих результатів; у роботах [2, 12, 16] – у вивченні електричних параметрів ооцитів та 2-клітинних ембріонів до та після повного циклу кріоконсервування методом вітрифікації, у обробці та аналізі результатів; у статтях [3, 6] – у побудові теоретичної моделі трансмембранного переносу речовин при заморожуванні клітинних суспензій; у статі [4] – у підготовці аналітичного огляду за темою дисертації; у роботах [9, 13, 17] – у побудові фізико-математичної моделі електропорації сферичної бішарової ліпідної мембрани; у роботі [14] – в участі у плануванні та виконанні експериментів та в обговоренні результатів і висновків; у роботі [15] – в моделюванні явища електропорації яйцеклітин миші; у роботі [18] – в узагальненні літературних даних за темою дисертації і обґрунтуванні актуальності теми дисертації; у роботі [19] – в обґрунтуванні можливості використання електропровідності мембран ооцитів та ембріонів ссавців для діагностики їх функціональної повноцінності.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на X Всеукраїнській науковій конференції студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих вчених в Україні» (м.Київ, 2010); V З'їзді українського біофізичного товариства (м.Луцьк, 2011); 8th EBSA European Biophysics Congress (м.Будапешт, Угорщина, 2011); міжнародних науково-технічних конференціях «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» (м.Севастополь 2011, 2012); конференціях молодих вчених ІПКіК спільно з кафедрою UNESCO «Холод в биологии и медицине» (м.Харків 2011, 2012, 2014); The international conference of the society for low temperature biology (м.Ганновер, Німеччина, 2013); міжнародній заочній науково-практичній конференції «Теоретические и практические аспекты

современной криобиологии» (м.Сиктивкар, Росія, 2014); міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми біофізики» (м.Львів, 2014); міжнародній конференції «Консервация генетических ресурсов» (м.Пушіно, Росія, 2014).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 19 робіт, в тому числі 5 статей у вітчизняних наукових фахових виданнях, 2 статті у зарубіжних наукових виданнях, 12 тез доповідей – у збірниках наукових робіт науково–практичних конференцій та симпозіумів.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, 3 розділів оригінальних досліджень, висновків, списку використаних джерел. Вона містить 132 сторінки із них 111 сторінок основного тексту, 34 рис., 3 фото, 2 табл., 1 схема, список використаних джерел з 199 найменувань на 21 сторінці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі подано сучасні уявлення щодо електричного пробою клітин, обґрунтовано актуальність теми, зв'язок роботи з науковими програмами і темами, сформульовано мету і задачі дослідження, показано новизну і практичну значимість одержаних результатів та особистий внесок здобувача в опублікованих із співавторами роботах, наведено відомості про апробацію результатів.

У розділі 1 представлено аналітичний огляд експериментальних і теоретичних даних літератури, які стосуються сучасних уявлень про закономірності процесу електропорації клітинних мембран при дії зовнішнього електричного поля на клітини, а також внаслідок електропорації мембран власним мембранним потенціалом. Висвітлено основні теоретичні підходи, які наразі використовуються для аналізу цього явища, і дані, спираючись на які у подальших розділах дисертації будується удосконалена фізико–математична модель електричного пробою клітин при кристалізації клітинної суспензії.

У розділі 2 дано загальну характеристику об'єктів, методів і матеріалів досліджень. Для теоретичного аналізу явища електричного пробою клітинних мембран, індукованого прикладеним до клітинної суспензії зовнішнім електричним полем або власним мембранним потенціалом, в якості одного з основних методичних принципів в роботі використано відомий в рівноважній термодинаміці принцип мінімуму вільної енергії. При моделюванні та аналізі процесів трансмембранного переносу при заморожуванні клітин були використані деякі положення термодинаміки необоротних процесів, електродинаміки, теорії пружності та асимптотичний метод рішення сингулярно збуджених систем.

Розрахунок часових і температурних залежностей об'єму клітин, концентрацій поза– і внутрішньоклітинного розчинів та мембранного потенціалу клітин при фазовому перетворенні позаклітинного розчину з рідкого в твердий стан здійснювали шляхом чисельного рішення системи звичайних нелінійних диференціальних рівнянь, отриманих на основі фундаментальних положень теорії процесів активаційного типу. Для вирішення системи диференціальних рівнянь використано стандартний метод Рунге–Кута 4–го порядку.

В роботі використані наступні реактиви: гонадотропін сироватки жеребих кобил (ГСЖК) («Folligon», Нідерланди); хоріонічний гонадотропін людини (ЛХГ) («Chorulon», Нідерланди), фетальна теляча сироватка («Sigma», США), сахароза

(«Sigma», США), етиленгліколь (ЕГ) («Реахим»), середовище Дюльбеко («Sigma», США). Всі реактиви марки «х.ч.» або «ч.д.а».

Двоклітинні ембріони отримували від гібридних самок миші лінії F₁(СВА×С57ВІ) 8–12 тижневого віку після контрольованої гіперстимуляції яєчників тварин. Самкам здійснювали внутрішньочеревну ін'єкцію 5 у.о. ГСЖК і 7,5 у.о. ЛХГ з інтервалом між ін'єкціями 46–48 годин. Самок для одержання ембріонів підсаджували до самців для запліднення. Двоклітинні ембріони отримували за стандартною методикою (Манк М., 1990) через 46–48 годин після ін'єкції ЛХГ.

В експериментах використовували тільки морфологічно повноцінні ембріони без ознак фрагментації (рис. 1). Експерименти на тваринах виконувались у відповідності до «Спільних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених І–ІІІ Національними конгресами з біоетики (м. Київ, Україна, 2001–2007 рр.) та узгоджених з положеннями «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, Франція, 1986 р.).

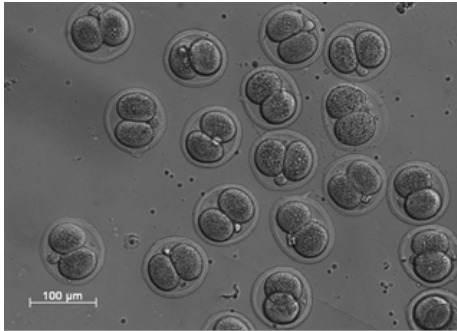


Рис. 1. Двоклітинні ембріони миші після гормональної стимуляції тварин.

При заморожуванні двоклітинних ембріонів миші в якості кріопротектора використовували ЕГ. Розчини готували в об'ємному співвідношенні 1:1 на 0,7 М розчині сахарози в середовищі Дюльбеко. Кріоконсервування ембріонів здійснювали методом вітрифікації шляхом прямого занурення в рідкий азот у пластикових соломинках (об'єм 100 мкл) (Исаченко В.В. и др., 1994). Швидкість охолодження за вказаною процедурою заморожування складає біля 1000 К/хв. Ембріони у рідкому азоті зберігали протягом 7 діб.

Електричну провідність ембріонів миші до та після дії розчину кріопротектора та циклу кріоконсервування визначали методом імпульсної кондуктометрії на електропораторі, розробленому і виготовленому в Інституті тваринництва НААН України (Shigimaga V.A., 2013). Двічі відмиті фізіологічним розчином клітини фіксували між електродами для визначення електропровідності (рис. 2).

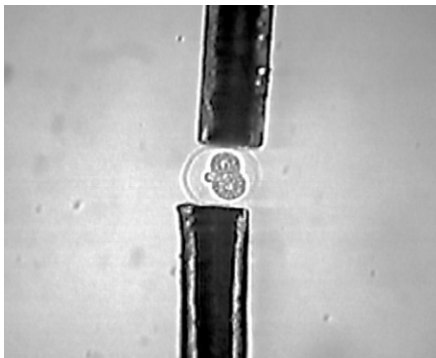


Рис. 2. Двоклітинний ембріон миші між мікроелектродами.

Електричну провідність клітин визначали за алгоритмом, описаним у роботі (Шигимага В.А., 2003), за формулою

$$G_{emb} = U_R / R_R (U_{in} - U_R),$$

де G_{emb} – шукана електропровідність зразка, R_R – опір каліброваного резистора, U_R – стрибок напруги на каліброваному резисторі, U_{in} – амплітуда прямокутного імпульсу напруги на виході генератора. Таким чином, вимірюючи стрибки напруги U_R на резисторі з відомим опором R_R при подачі на вхід системи прямокутного імпульсу з

заданою амплітудою U_{in} , отримували залежності питомої електричної провідності окремих ембріонів від напруги електричного поля між електродами $E_{el} = U_{el} / L$, де U_{el} – амплітуда імпульсу напруженості, який подається на електроди, L – відстань між електродами. Статистичну обробку експериментальних даних виконували за пакетом параметричного аналізу даних програми Microsoft Office Excel 2010 і за методом Ст'юдента (Закс Л., 1976). Дані надано у вигляді $M \pm SE$.

У розділі 3 представлено фізико–математичну модель трансмембранного переносу речовин та електропорації клітин при заморожуванні клітинної суспензії.

Як відомо, навіть у нормі клітини можуть функціонувати за достатньо високих значень мембранного потенціалу. Напевно, життєдіяльність клітин у таких ризикованих умовах обумовлюється тим, що енергія, яку клітина запасає у вигляді мембранного потенціалу, використовується клітиною для реалізації таких життєво важливих функцій, як передача інформації, клітинне дихання, рецепція та механічна робота. Оскільки в процесі низькотемпературного консервування клітин суттєво порушується їх іонний гомеостаз, слушно допустити, що при заморожуванні руйнування мембран може відбуватися в результаті їх електричного пробою. Ця гіпотеза є тим більш прийнятною, якщо взяти до уваги сучасні уявлення щодо ролі електричного пробою мембран у некрозі клітин при різних патологіях (Антонов В.Ф., 2000; Владимиров Ю.А., 2002).

Ефективність фізико–математичного моделювання для вирішення фундаментальних і прикладних задач кріобіології переконливо продемонстрована в класичних наукових працях Р. Mazur, S.P. Leibo та інших кріобіологів (Leibo S.P., 1974; Mazur P., 1984). Створені ними кількісні моделі трансмембранного переносу речовин при заморожуванні клітинних суспензій спираються на рівняння лінійної термодинаміки необоротних процесів, область застосування яких обмежується малими мембранними потенціалами: $\Delta\varphi_m \ll RT / F = 25,4$ мВ при 295 К, де R – універсальна газова стала, T – абсолютна температура, F – число Фарадея. Проте ця умова, як правило, не виконується навіть у нормальному фізіологічному середовищі. Тому на першому етапі роботи ми відмовились від звичайного підходу та сформулювали кількісну модель трансмембранного переносу речовин при заморожуванні клітин, яка не підлягає вказаному обмеженню.

Створена нами модель переносу речовин, у тому числі іонів, між клітинами та оточуючим їх середовищем при заморожуванні спирається на загальні положення теорії процесів активаційного типу. В рамках цієї теорії при нульовому мембранному потенціалі клітинна мембрана розглядається як симетричний енергетичний бар'єр, який повинні подолати молекули або іони, що переносяться крізь мембрану (рис. 3). Якщо між зовнішньою та внутрішньою поверхнями клітинної мембрани створюється різниця електричного потенціалу, то для іонів (на відміну від електронейтральних молекул) симетрія енергетичного бар'єру порушується, оскільки електричне поле, яке створюється всередині мембрани, сприяє трансмембранному переносу іонів одного знаку, утруднюючи трансмембранний перенос іонів протилежного знаку у тому ж напрямку.

Швидкість змінення кількості молів k -го компонента у внутрішньоклітинному розчині визначається рівнянням (Лев А.А., 1975):

$$\frac{d}{dt} N_k^{in} = Sp_k \left[c_k^{out} \exp\left(+\frac{1}{2} z_k \frac{F}{RT} \Delta\varphi_m\right) - c_k^{in} \exp\left(-\frac{1}{2} z_k \frac{F}{RT} \Delta\varphi_m\right) \right], k=1, \dots, n$$

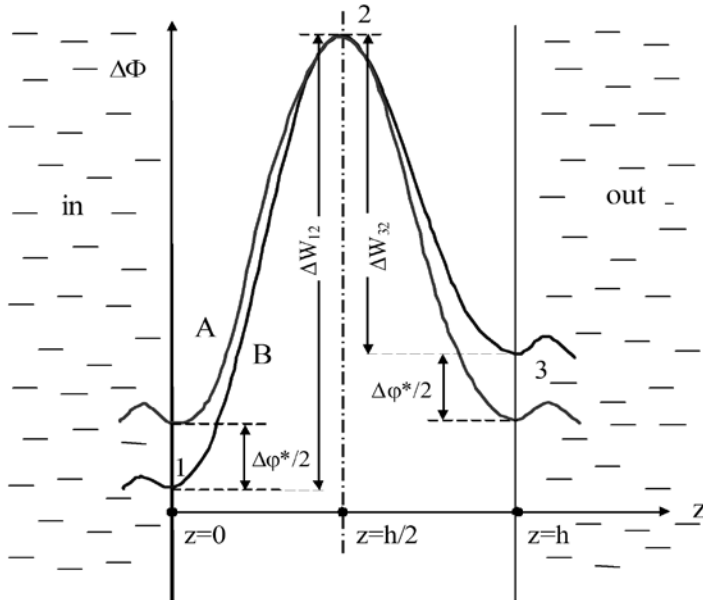


Рис. 3. Профіль енергетичного бар'єру, який долає іон у мембрані у відсутності (А) та за наявності (В) мембранного потенціалу.

$\Delta\varphi_m = (\varphi^{in} - \varphi^{out})$ – перепад електричного потенціалу між внутрішньою та зовнішньою поверхнями мембрани, n – кількість речовин, які містяться в поза- та внутрішньоклітинному розчинах.

З урахуванням законів збереження кількості розчинених в клітинній суспензії речовин у процесі заморожування отримуємо наступну систему рівнянь (1)–(3), які кількісно описують змінення об'єму та мембранного потенціалу клітин, а також змінення складу позаклітинного середовища та цитоплазми в процесі заморожування в залежності від порівняно невеликої кількості транспортних, геометричних та електричних властивостей клітин. При цьому врахована та обставина, що криву плавлення позаклітинного розчину можна представити у вигляді $T_0 = T_0(c_{cr})$, де T_0 – температура плавлення, c_{cr} – концентрація кріопротектора у позаклітинному розчині.

$$\frac{d}{dx} g_{Cl^-} = \frac{T_0}{\beta\tau_w(T_0)} \exp\left[\frac{U_w}{RT_0}\left(1 - \frac{1}{x}\right)\right] \frac{p_{Cl^-}}{p_w} \times \left(f_{Cl^-} \frac{1}{[f_{Cl^-}(y - \alpha/g_{Cl^-})]^{\frac{1}{2}}} - \frac{g_{Cl^-}}{y - \alpha} \left[f_{Cl^-} (y - \alpha/g_{Cl^-})^{\frac{1}{2}} \right] \right) \quad (1)$$

де t – час, N_k^{in} – кількість молів k -го компонента у внутрішньоклітинному розчині (під k -м компонентом маємо на увазі основні за вмістом іони, а саме K^+ , Na^+ , Cl^- ; w – молекули води; cr – молекули кріопротектора; s – непроникаючі через клітинну мембрану речовини), S – площа поверхні клітинної мембрани, p_k – коефіцієнт проникності клітинної мембрани для k -го компонента, c_k^{out} (c_k^{in}) – концентрація k -го компонента поза клітиною та в цитоплазмі, z_k – валентність k -го компонента розчину,

$$\frac{d}{dx} g_{cr} = \frac{T_0}{\beta \tau_w(T_0)} \exp\left[\frac{U_w}{RT_0}\left(1 - \frac{1}{x}\right)\right] \frac{p_{cr}}{p_w} \left(\tilde{c}_{cr}(T) - \frac{g_{cr}}{y - \alpha}\right) \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} y = & -\frac{T_0}{\beta \tau_w(T_0)} \exp\left[\frac{U_w}{RT_0}\left(1 - \frac{1}{x}\right)\right] \left\{ \tilde{v}_{Cl^-} \left(f_{Cl^-} - \frac{g_{Cl^-}}{y - \alpha}\right) + \tilde{v}_{cr} \left(\tilde{c}_{cr}(T) - \frac{g_{cr}}{y - \alpha}\right) + \right. \\ & \left. + \frac{(1-H) \times [\tilde{v}_{K^+} \tilde{c}_{K^+}^{out}(0) + \tilde{v}_{Na^+} \tilde{c}_{Na^+}^{out}(0) + \tilde{v}_s \tilde{c}_s^{out}(0)]}{1 - yH} + \right. \\ & \left. + [\tilde{v}_{K^+} \tilde{c}_{K^+}^{in}(0) + \tilde{v}_{Na^+} \tilde{c}_{Na^+}^{in}(0) + \tilde{v}_s \tilde{c}_s^{in}(0)] \times \left(\frac{1 - \alpha}{y - \alpha}\right) \right\} + \frac{p_{Cl^-} \tilde{v}_{Cl^-}}{p_w} \times \\ & \times \left(f_{Cl^-} \frac{1}{[f_{Cl^-}(y - \alpha) / g_{Cl^-}]^{\frac{1}{2}}} - \frac{g_{Cl^-}}{y - \alpha} [f_{Cl^-}(y - \alpha) / g_{Cl^-}]^{\frac{1}{2}} \right) + \\ & + \frac{p_{cr} \tilde{v}_{cr}}{p_w} \left(\tilde{c}_{cr}(T) - \frac{g_{cr}}{y - \alpha}\right) \quad (3) \end{aligned}$$

де введені наступні позначення: $g_{Cl^-} = (y - \alpha) \cdot \tilde{c}_{Cl^-}^{in}$; $\tilde{c}_k^{in} = c_k^{in} / b$, b – коефіцієнт (1 моль/м³); β – швидкість зміни температури клітинної суспензії, що охолоджується; $\tau_w(T_0) = S / V_0 p_w$, V_0 – початковий об'єм клітини, U_w – енергія активації трансмембранного переносу молекул води; $x = T / T_0$; $f_{Cl^-} = ((1 - H) \cdot \tilde{c}_{Cl^-}^{out}(0) + H(1 - \alpha) \cdot \tilde{c}_{Cl^-}^{in}(0) - H) / (1 - Hy)$, y – відносний об'єм клітини, α – об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин; $H = xV^{in}(0) / (V^{out}(0) + xV^{in}(0))$, $\tilde{v}_k = v_k b$, v_k – молярний об'єм k -ї речовини розчиненої поза та всередині клітини.

Система рівнянь (1)–(3) стає замкненою, якщо її доповнити рівнянням Гольдмана – Ходжкіна – Катца (Ильина В.А., 2004)

$$\Delta \varphi^* = \ln \left[\left(\sum^c p_k c_k^{in} + \sum^a p_k c_k^{out} \right) / \left(\sum^c p_k c_k^{out} + \sum^a p_k c_k^{in} \right) \right], \quad (4)$$

що описує квазістаціонарний потенціал мембрани, яка розглядається як конденсатор, обкладками якого є цитоплазма і зовнішньоклітинний розчин, з паралельно підключеним опором витоку.

Побудована модель є універсальною та може застосовуватися для теоретичного аналізу процесу заморожування будь-яких клітин.

Для конкретних розрахунків в якості моделі кріозахисного середовища ми використали розчини «ДМСО – 0,15М NaCl – H₂O» і «ЕГ – 0,15М NaCl – H₂O». В якості клітинних параметрів використовували транспортні та геометричні характеристики ооцитів і двоклітинних ембріонів миші, значення яких відомі з літературних джерел.

Систему рівнянь (1)–(4) вирішували чисельно за стандартним методом Рунге–Кутта 4-го порядку. Результати розрахунків представлені на рис. 4 – 8. На рис. 4 показана кінетика зневоднення двоклітинних ембріонів миші на етапі експозиції клітин в криозахисному середовищі при $T = 297\text{ K}$.

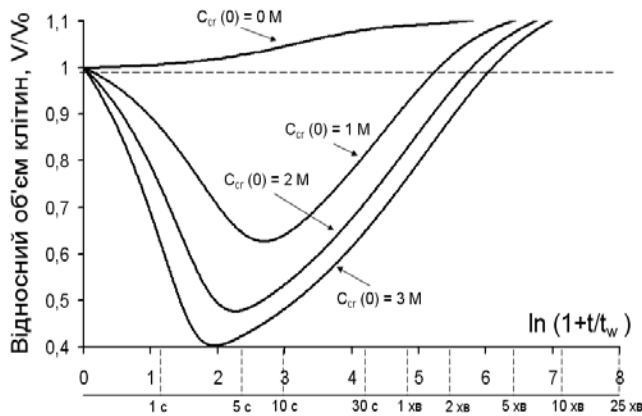


Рис. 4. Залежність відносного об'єму бластомерів від часу при експозиції двоклітинних ембріонів в криозахисному розчині «ДМСО – хлорид натрію – вода».

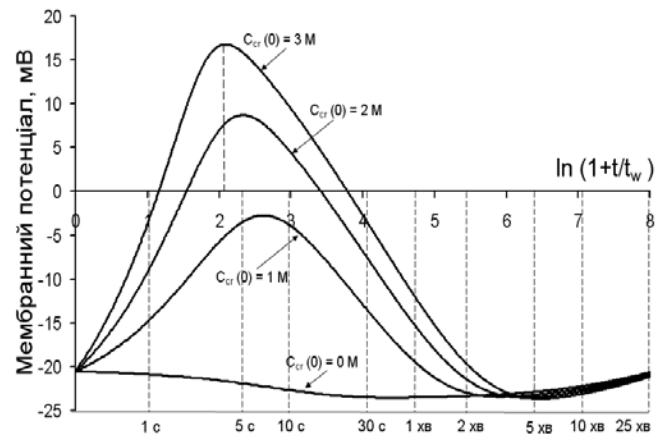


Рис. 5. Залежність мембранного потенціалу бластомерів від часу експозиції двоклітинних ембріонів миші в криозахисному розчині «ДМСО – хлорид натрію – вода».

Максимальне зневоднення відбувається протягом перших декількох секунд. Після цього об'єм відновлюється, по мірі насичення клітин криопротектором, досягаючи початкового значення через 2–5 хв. Ступінь зневоднення клітин, як і очікувалось, збільшується з ростом концентрації криопротектора. Аналогічна кінетика зневоднення двоклітинних ембріонів миші отримана і при експозиції ембріонів в криозахисному розчині «ЕГ – хлорид натрію – вода».

Як видно з результатів чисельного моделювання (рис. 5), мембранний потенціал бластомерів після переміщення ембріона до криозахисного розчину швидко (за декілька секунд) змінюється від нормального значення (-20 мВ) до максимального значення $+17\text{ мВ}$ в 3 М розчині ДМСО, $+9\text{ мВ}$ в 2 М розчині, до $-2,91\text{ мВ}$ в 1 М розчині. Приблизно через 5 хвилин мембранний потенціал клітин повертається до початкового значення і надалі залишається практично незмінним.

Для з'ясування залежностей об'єму клітин та їх мембранного потенціалу від швидкості охолодження були проведені відповідні розрахунки. На рис. 6 представлені залежності об'єму ооцита миші в процесі охолодження зі швидкостями 1, 5, 10, 100 K/хв в 1 М розчині ЕГ. В процесі охолодження зі швидкістю 100 K/хв відносний об'єм клітин залишається практично незмінним, в той час як при більш повільному охолодженні відбувається дегідратація клітин.

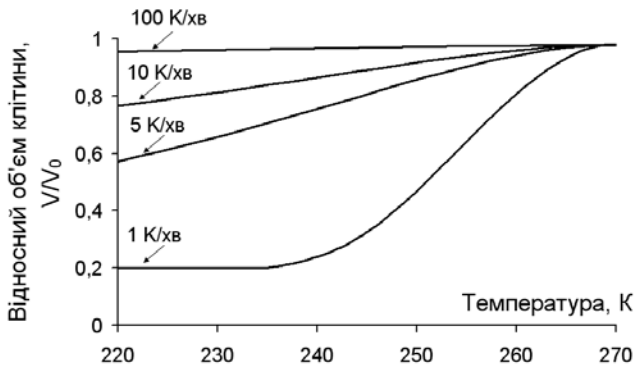


Рис. 6. Змінення об'єму ооцита миші в процесі охолодження з різними швидкостями в 1 М розчині ЕГ.

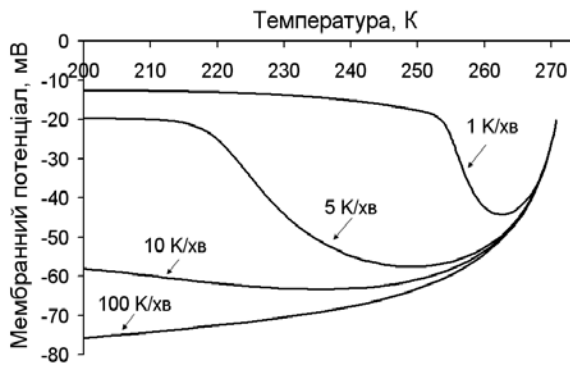


Рис. 7. Залежність мембранного потенціалу ооцита миші від температури при охолодженні з різними швидкостями в 1 М розчині ЕГ.

Також зі збільшенням (рис. 7) швидкості охолодження спостерігається зростання негативного мембранного потенціалу (гіперполяризація), значення якого знаходяться в інтервалі $-50 \div -80$ мВ, що відповідає зростанню напруженості поля на мембрані $\sim 10^7$ В/м. За розрахованими залежностями мембранного потенціалу клітин від температури легко визначити, який саме час клітинна мембрана знаходиться під дією того або іншого перепаду електричного потенціалу. Відповідні дані наведені на рис. 8.

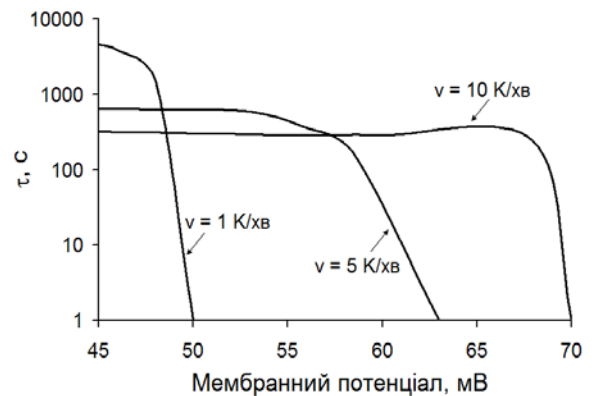


Рис. 8. Залежність середнього часу утворення пори від електричного потенціалу на мембрані двоклітинного ембріона миші при охолодженні з різними швидкостями в 1 М ДМСО.

Створена модель описує трансмембранний перенос речовин між клітинами та оточуючим їх середовищем у процесі низькотемпературного консервування клітинної суспензії і враховує вплив на ці процеси екпозиції клітин в розчинах кріопротекторів, швидкості охолодження, геометричних та транспортних характеристик клітин. На другому етапі дослідження, щоб відповісти на питання, чи можуть зміни мембранного потенціалу при заморожуванні бути відповідальними за пошкодження клітин, розглянуті сучасні теоретичні уявлення щодо зміни електроізоляційних властивостей цитоплазматичних мембран.

У підрозділі 3.2. теоретично обґрунтовано механізм виникнення у клітинній мембрані пори критичного радіуса.

Основні положення теорії електричного пробою бішарових ліпідних мембран сформульовані Ю.А. Чизмаджевим зі співавторами в серії наукових праць (Чизмаджев Ю.А. зі співавт., 1979 р.). Сформульована ними теорія спирається на розрахунок залежності вільної енергії мембрани $F(a)$ від радіуса a гідрофільної

циліндричної пори, яка пронизує ліпідний бішар. За теорією Ю.А. Чизмаджева ця вільна енергія дорівнює

$$F(a) = 2\pi ah\sigma_m - \frac{\pi a^2}{h} \varepsilon_0 (\varepsilon_w - \varepsilon_m) \Delta\varphi_m^2, \quad (5)$$

де h – товщина клітинної мембрани, σ_m – питома поверхнева енергія бішару, ε_0 – електрична стала, ε_w і ε_m – відповідно діелектрична проникність води та ліпідного бішару, $\Delta\varphi_m$ – мембранний потенціал.

Наявність першого доданку у правій частині рівняння (5) зумовлена пропорційним радіусу пори збільшенням поверхні контакту ліпідного бішару з водним розчином, який заповнює пору, внаслідок чого поверхнева енергія системи підвищується. Другий доданок рівняння (5) відбиває той факт, що на бокову поверхню мембранної пори при наявності мембранного потенціалу діє електрична пондеромоторна сила, яка намагається розширити пору. Внаслідок протилежної дії цих ефектів графік залежності $F = F(a)$ має вигляд, представлений на рис. 9, 1.

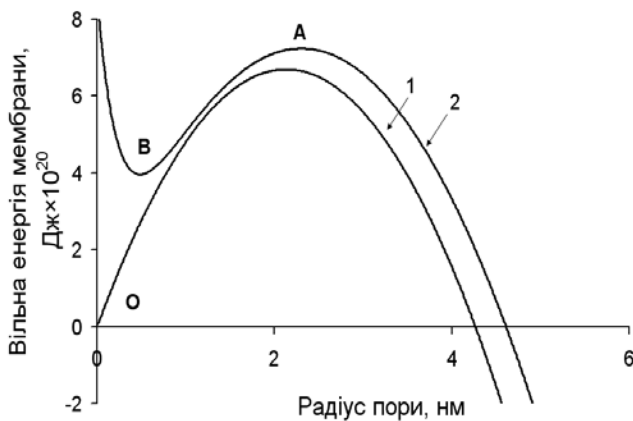


Рис. 9. Залежність вільної енергії мембрани від розміру мембранної пори: 1 – без урахування гідратаційного відштовхування; 2 – з урахуванням гідратаційного відштовхування.

Як видно, ці залежності сягають максимуму при деякому (критичному) радіусі пори $a_c = 2\gamma h / \varepsilon_0 (\varepsilon_w - \varepsilon_m) \varphi_m^2$, де γ – лінійна щільність вільної енергії кромки мембранної пори, після чого зі збільшенням радіуса пори вільна енергія мембрани монотонно зменшується. Згідно з принципом мінімуму вільної енергії за відсутності трансмембранного перепаду потенціалу електричного поля термодинамічно стабільним є стан з нульовим радіусом пори. При наявності мембранного потенціалу стан з нульовим радіусом пори стає метастабільним. Відповідно до принципу мінімуму вільної енергії, якщо за рахунок теплових

флуктуацій радіус пори сягає більшого, ніж критичне, значення ($a > a_c$), відбувається спонтанний розрив мембрани, тобто виникає її електричний пробій. Для того, щоб електричний пробій відбувся, мембрана як термодинамічна система повинна подолати енергетичний бар'єр $\Delta F_{\max} = 2\pi\gamma^2 / \varepsilon_0 (\varepsilon_w - \varepsilon_m) \varphi_m^2$. Як видно, висота цього бар'єру зменшується по мірі збільшення величини мембранного потенціалу. Разом зі зменшенням висоти бар'єру OA і збільшенням (за абсолютною величиною) мембранного потенціалу, час, за який відбувається розрив мембрани під дією внутрішньомембранної напруги електричного поля, також зменшується. Розрахунок цього часу на основі теорії процесів активаційного типу здійснюється за загальновідомим алгоритмом (Ланда С.П., 1980).

Теорія електричного пробою біомембран Ю.А. Чизмадзева зі співавт. не враховує існування дуже сильних короткодійних гідратаційних сил відштовхування між ліпідними бішарами (Israelachvili J.N., 2011), яким відповідає збільшення вільної енергії бішарів, що наближаються один до одного, за експоненціальним законом $\Delta F = A \exp(-l/\delta)$, де A – робота по зближенню ліпідних бішарів, l – відстань між ліпідними бішарами, δ – максимальна відстань взаємодії сил відштовхування ($\approx 0,25$ нм). Фізичною причиною гідратаційного відштовхування є необхідність затрати порівняно великої роботи на відрив молекул води, які гідратують полярні головки ліпідів для досягання безпосереднього контакту між ліпідними бішарами. Гідратаційна сила перешкоджає зменшенню радіуса гідрофільної мембранної пори до нуля навіть за відсутності мембранного потенціалу. З урахуванням сили гідратаційного відштовхування залежність вільної енергії мембрани від радіуса гідрофільної мембранної пори визначається функцією, графік якої представлено на рис. 9, 2.

Таким чином, навіть за відсутності мембранного потенціалу стабільною є мембранна пора з відмінним від нуля радіусом пори a_0 . За даними робіт (Solomon A.K., 1983; Гордиенко О.И., 2004) $a_0 \approx 0,5$ нм, що веде до значення $A \approx 8,6 \times 10^{-20}$ Дж. Існування гідрофільних пор з розміром $\approx 0,5$ нм у цитоплазматичних мембранах клітин узгоджується з експериментальними даними щодо більшої електропровідності клітинних мембран у порівнянні з електропровідністю штучних бішарових ліпідних мембран і пояснює можливість переміщення мембранних компонентів з одного моношару в інший моношар по крайці пори, а також високу проникність молекул ДМСО, ЕГ, 1,2-пропандіола у порівнянні з кріопротекторами, ефективний розмір молекул яких перевищує 0,5 нм.

Одним з найбільш суттєвих наслідків існування сил гідратаційного відштовхування між ліпідами, розташованими у стінці гідрофільної пори, є зниження висоти бар'єру, який система повинна подолати, щоб мембрана розірвалась: $OA > BA$ (рис. 9). Обчислена з урахуванням цього ефекту залежність часу, за який відбувається розрив мембрани, від величини власного мембранного потенціалу клітини, має вигляд

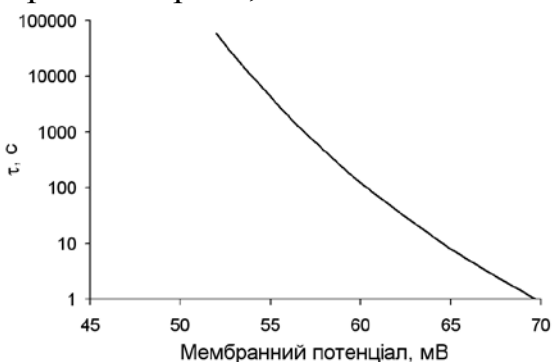


Рис. 10. Залежність середнього часу утворення пори від прикладеного до клітинної мембрани потенціалу.

як на рис. 10. Важливою особливістю цієї залежності є те, що розрив мембрани настає не тільки при великих, а і при порівняно невеликих значеннях мембранного потенціалу, якщо він зберігається достатньо тривалий проміжок часу. Наведена на рис. 10 крива розділяє площину рисунка на дві області: область вище цієї кривої відповідає умовам, за яких електричний пробій мембран в процесі заморожування відбувається, а якщо часова залежність мембранного потенціалу лежить нижче цієї кривої – не відбувається. Слушно підкреслити, що експериментальні дані про електричний пробій біомембран у переважній більшості отримані при дії на мембрану дуже коротких (до кількох мс) прямокутних імпульсів зовнішнього електричного поля, при

яких напруга електричного пробою біомембран слабо залежить від тривалості існування на мембрані аномально високих значень мембранного потенціалу.

Накладемо отримані у підрозділі 3.1 залежності тривалості експозиції клітин при різних значеннях мембранного потенціалу в процесі їх заморожування (рис. 8) на залежність, представлену на рис. 10. Зрозуміло, що критерієм пошкодження клітин при заморожуванні шляхом електричного пробою їх мембран є перетинання суцільних кривих зі штриховою кривою (рис. 11). Очевидно, якщо при

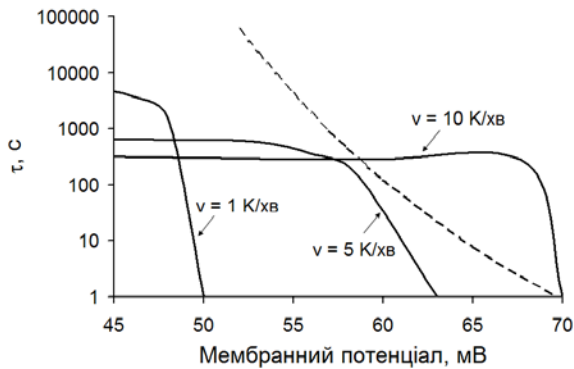


Рис. 11. Залежність середнього часу утворення пори від прикладеного до клітинної мембрани потенціалу при охолодженні двоклітинного ембріона миші з урахуванням сил гідратаційного відштовхування.

охолодженні двоклітинного ембріона миші під захистом 1 М розчину ДМСО швидкість охолодження перевищує значення 5 К/хв., його мембрана пошкоджується шляхом її електричного пробою, тоді як при менших швидкостях охолодження електричний пробій мембрани не відбувається. Як видно з графіку при швидкості охолодження 10 К/хв електричний пробій мембрани в середньому виникає через 320 с. Таким чином, використання створеної моделі для аналізу явищ, які відбуваються в результаті низькотемпературного консервування, дозволяє з'ясувати причини впливу швидкості охолодження на електричний пробій клітинних мембран.

У підрозділі 3.3 представлено експериментальні результати дослідження електричного пробою двоклітинних ембріонів миші до та після експозиції клітин в кріозахисному розчині та після глибокого охолодження – відігріву методом вітрифікації. На рис. 12 представлені визначені нами методом електрокондуктометрії залежності питомої електричної провідності окремих двоклітинних ембріонів миші контрольної групи від напруженості електричного поля. Як видно, електрична провідність ембріонів монотонно збільшується по мірі збільшення амплітуди прямокутного імпульсу електричного поля. При цьому спостерігаються флуктуації величини провідності, які свідчать про незначні спонтанні коливання радіусу мембранних пор біля значення, яке відповідає локальному мінімуму вільної енергії плазматичних мембран бластомерів. Зі збільшенням амплітуди імпульсів зовнішнього електричного поля локальний мінімум вільної енергії зміщується в бік більших радіусів пори приблизно пропорційно абсолютній величині напруженості внутрішньомембранного електричного поля. Як видно з представлених даних, в області напруженостей поля $0,2-3 \times 10^5$ В/м середнє значення електропровідності цієї групи змінюється в діапазоні $((1,4 \pm 0,7) \div (6,5 \pm 1,4)) \times 10^{-3}$ См/м. Оборотна електропорація двоклітинних ембріонів реалізується в інтервалі напруженостей електричного поля $0,5-3 \times 10^5$ В/м (рис. 12а), а необоротна електропорація при напруженостях поля більших $3,5 \times 10^5$ В/м (рис. 12б). Під напругою зовнішнього поля

на рис. 12 і далі мається на увазі величина $\Delta\varphi/L$, де $\Delta\varphi$ – різниця електричного потенціалу між електродами електропоратора, L – відстань між електродами.

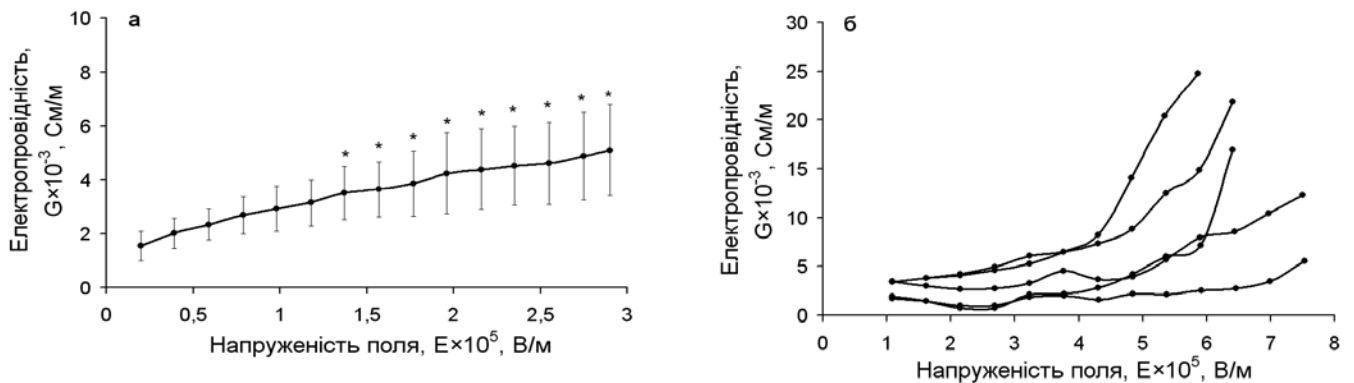


Рис. 12. Залежність питомої електропровідності двоклітинних ембріонів миші контрольної групи від напруженості електричного поля: а – в діапазоні напруженостей $0,2-3 \times 10^5$ В/м; б – характерні залежності в діапазоні напруженостей $1-8 \times 10^5$ В/м. Примітка: * – відмінності достовірні по відношенню до електропровідності при напруженості поля $0,2 \times 10^5$ В/м, $p \leq 0,05$

На рис. 13 показані залежності електричної провідності двоклітинних ембріонів І-ї та ІІ-ї експериментальних груп, для яких час експозиції в етиленгліколь-сахарозному середовищі при $T = 297$ К дорівнював 1,5 і 3 хвилини відповідно.

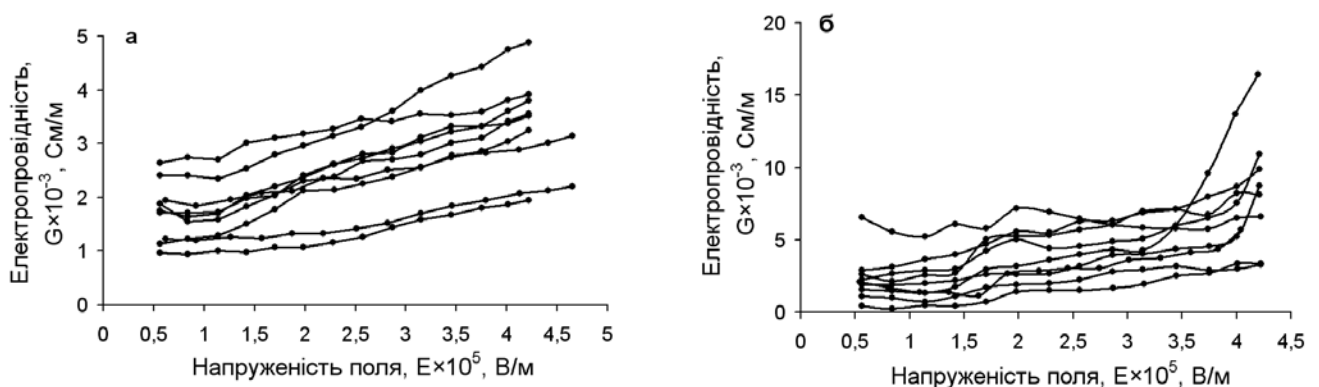


Рис. 13. Характерні залежності питомої електропровідності двоклітинних ембріонів І-ї (а) і ІІ-ї (б) експериментальних груп від напруженості електричного поля.

Значення питомої електропровідності двоклітинних ембріонів миші І-ї групи в діапазоні напруженостей поля $0,5-3 \times 10^5$ См/м практично співпадають зі значеннями електропровідності ембріонів контрольної групи і змінюються в діапазоні $((1,7 \pm 0,6) \div (3,4 \pm 0,9)) \times 10^{-3}$ См/м (рис. 13а). Чисельні значення провідності ембріонів ІІ-ї групи (рис. 13б) є вищими на рівні тенденції значень електропровідності ембріонів контрольної групи та в діапазоні $0,5-3 \times 10^5$ В/м змінюються у межах $((1,9 \pm 0,4) \div (5,0 \pm 1,7)) \times 10^{-3}$ См/м. Крім того, коли напруженості міжелектродного електричного поля перевищують значення $3,5 \times 10^5$ В/м, спостерігається різке зростання електропровідності ембріонів, яке супроводжується лізисом значної кількості бластомерів, тобто настає необоротний електричний пробій їх мембран (рис. 13б).

У другій серії експериментів визначалась електрична провідність та стійкість двоклітинних ембріонів миші до дії імпульсів електричного поля які після 1,5-хвилинної (III група) і 3-хвилинної (IV група) експозиції в етиленгліколь-сахарозному середовищі, охолоджували, зберігали при температурі рідкого азоту протягом 7 днів, а потім відігрівали на водяній бані при 311 K та відмивали від кріопротектора. Питома електрична провідність ембріонів III-ї та IV-ї груп змінювались у межах $((2,1\pm 0,7)\div(3,9\pm 0,7))\times 10^{-3}$ См/м (рис. 14а) та $((2,3\pm 0,9)\div(3,4\pm 1,2))\times 10^{-3}$ См/м (рис. 14б) відповідно.

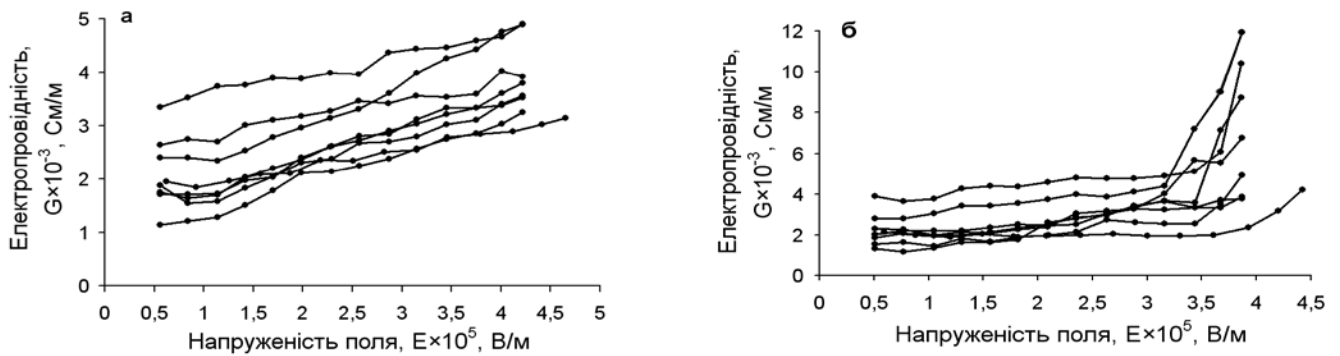


Рис. 14. Характерні залежності питомої електричної провідності двоклітинних ембріонів миші від напруженості електричного поля III-ї (а) та IV-ї (б) груп.

Необоротний електричний пробій та лізис бластомерів для ембріонів III-ї групи не спостерігався, тоді як ембріони IV-ї групи руйнувались внаслідок необоротного електричного пробію. Початкові значення електропровідності ембріонів (при $0,5\times 10^5$ В/м) цих груп є достовірно вищими ($p\leq 0,05$) по відношенню до електропровідності ембріонів контрольної групи, що свідчить про структурні порушення мембран ембріонів, які виникають під впливом кріозахисного середовища за цих умов.

Таким чином, на підставі отриманих у цьому розділі роботи результатів, можна стверджувати, що електричний пробій ембріонів є чутливим до відхилення стану мембрани від норми і може використовуватися як діагностичний тест для оцінки стійкості клітин до дії несприятливих факторів, наприклад, для відбраковування ембріонів в репродуктивних технологіях.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, спрямоване на визначення умов порушення електроізоляційних властивостей цитоплазматичних мембран при низькотемпературному консервуванні клітин. Шляхом комп'ютерного моделювання показано, що такі порушення можуть бути викликані зростанням мембранного потенціалу внаслідок росту позаклітинної концентрації сольового розчину. Збільшення концентрації внутрішньоклітинного розчину призводить до зменшення мембранного потенціалу, що сприяє захисту клітин.

1. Створено оригінальну фізико-математичну модель трансмембранного переносу речовин між клітинами та оточуючим їх середовищем у процесі заморожування

клітинної суспензії, яка враховує швидкість охолодження, геометричні та транспортні характеристики клітин і склад кріозахисного середовища та дозволяє оцінити зміни мембранного потенціалу клітин.

2. Теоретично доведено, що врахування сил гідратаційного відштовхування між ліпідами у стінці гідрофільної пори, призводить до зменшення значень мембранного потенціалу клітин, за яких відбувається порушення електроізоляційних властивостей їх цитоплазматичних мембран.

3. Теоретично встановлено, що при експозиції ооцитів і двоклітинних ембріонів миші в розчинах ЕГ і ДМСО спостерігається оборотна деполаризація мембран, тим більш виражена, чим вище концентрація кріопротекторів.

4. Теоретичні розрахунки показали, що при повільному охолодженні ооцитів і двоклітинних ембріонів миші (<5 К/хв) після гіперполаризації мембран спостерігається їх деполаризація, в той час як при швидкому охолодженні мембранний потенціал досягає значень в інтервалі -50 – -80 мВ, що може стати причиною електричного пробоя мембран.

5. Встановлено, що теоретично розрахована величина напруженості електричного поля на мембранах клітин при заморожуванні досягає рівня (10^7 В/м), що перевищує експериментально встановлений критичний поріг напруженості поля (4×10^5 В/м), за якого відбувається порушення електроізоляційних властивостей цитоплазматичних мембран.

6. Показано, що експозиція двоклітинних ембріонів в етиленгліколь–сахарозному середовищі упродовж 1,5 хвилин не призводить до необоротного електричного пробоя та лізису бластомерів як до, так і після охолодження клітин до 77 К. Електроізоляційні властивості ембріонів порушуються після 3–хвилинної експозиції в етиленгліколь–сахарозному середовищі.

7. Експериментально встановлено, що оборотна електропорація двоклітинних ембріонів реалізується в інтервалі напруженостей електричного поля $0,5$ – 3×10^5 В/м, а необоротна електропорація при напруженостях поля більших $3,5 \times 10^5$ В/м.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ

1. Смольянінова Є.І. Електрична провідність ембріонів мишей доімплантаційних стадій розвитку після гормональної стимуляції яєчників тварин / Є.І. Смольянінова, О.А. Стріха, В.О. Шигимага, А.О. Колеснікова, Є.О. Гордієнко // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – V. 6, №1. – Р. 105–112.

2. Смольянінова Е.И. Влияние этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль–сахарозной среде на электрическую проводимость 2–клеточных эмбрионов мыши / Е.И. Смольянінова, В.А. Шигимага, О.А. Стріха, Л.И. Попивненко, Е.Г. Лисина // *Пробл. криобиологии и криомедицины*. – 2013. – Т. 23, №3. – С. 228–239.

3. Стріха О.А. Теоретическая модель трансмембранного переноса веществ при замораживании клеточной суспензии / О.А. Стріха, Е.И. Смольянінова, Е.А. Гордиенко // *Біофізичний вісник*. – 2013. – Т.30, №2. – С. 66–73.

4. Стріха О.А. Сучасні уявлення про закономірності та механізми електричного пробоя клітин / О.А. Стріха, Є.І. Смольянінова, Є.О. Гордієнко // *Вісник Львівського університету*. – 2014. – Вип. 68. – С. 311 – 325.

5. Смольянинова Е.И. Электрическая проводимость как диагностический параметр оценки качества ооцитов и эмбрионов млекопитающих в биотехнологических операциях / Е.И. Смольянинова, В.А. Шигимага, О.А. Стриха, Л.И. Попивненко, Е.А. Гордиенко // Биофизика живой клетки. – 2014. – Т. 10. – С. 193 – 195.
6. Стриха О.А. Количественная оценка оптимальной скорости охлаждения при замораживании клеточных суспензий / О.А. Стриха, А.Ю. Артуянц, О.И. Гордиенко, Е.А. Гордиенко // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии: Межд. научно–практическая конф. – Сыктывкар, 2014. – С. 64 – 68.
7. Смольянинова Є.І. Вплив ступеня зрілості на електричну провідність ооцитів мишей / Є.І. Смольянинова, В.О. Шигимага, А.О. Колесникова, О.А. Стриха, Л.І. Попівненко, Є.О. Гордієнко // Біологія тварин. – 2015. – Т. 17, №1. – С. 118 – 125.
8. Стриха О.А. Вплив гормональної стимуляції та стадії розвитку на електропровідність ооцитів та ранніх ембріонів миші / О.А. Стриха, Є.І. Смольянинова, В.О. Шигимага // Біологічні дослідження молодих вчених в Україні: X Всеукр. наук. конф. студентів та молодих науковців: матеріали конф. – Київ, 2010. – С. 85–86.
9. Стриха О.А. Теоретическая модель электропорации сферической липидной везикулы / О.А. Стриха, Е.И. Смольянинова, Е.А. Гордиенко // Актуальні питання біологічної фізики та хімії: VII Міжн. науково–технічна конф.: матеріали конф. – Севастополь, 2011. – С. 29.
10. Смольянинова Е.И. Влияние гормональной стимуляции яичников на удельную электропроводность ооцитов лабораторных мышей / Е.И. Смольянинова, В.А. Шигимага, А.А. Колесникова, О.А. Стриха // Актуальні питання біологічної фізики та хімії: VII Міжн. науково–технічна конф.: мат. конф. – Севастополь, 2011. – С. 37–38.
11. Смольянинова Е.И. Влияние гиперстимуляции яичников и стадии развития на электрическую проводимость эмбрионов мыши доимплантационных стадий развития / Е.И. Смольянинова, В.А. Шигимага, А.А. Колесникова, О.А. Стриха, Е.А. Гордиенко // Актуальні питання біологічної фізики та хімії: VII Міжн. науково–технічна конф.: матеріали конф. – Севастополь, 2011. – С. 36–37.
12. Стриха О.А. Определение удельной электрической проводимости ооцитов мыши в растворах сахарозы и проникающих криопротекторов методом импульсной кондуктометрии / О.А. Стриха, Е.И. Смольянинова // Пробл. криобиологии. – 2011. – Т. – 21, №2. – С. 206.
13. Стриха О.А. Удосконалена модель електропорації клітинної мембрани / О.А. Стриха, Є.О. Гордієнко // V з'їзд українського біофізичного товариства: тези доповідей. – Луцьк, 2011. – С. 123.
14. Strikha O.A. The effect of ovary hormone stimulation on mouse oocyte and early embryo electric conductivity / O.A. Strikha, E.I. Smolyaninova, E.O. Gordienko, V.A. Shigimaga, A.A. Kolesnikova // 8–th EBSA European Biophysics Congress: Theses. – Budapest, Hungary, 2011. – V. 40. – S240.
15. Стриха О.А. Аналіз особливостей електричного пробую клітин на основі моделі в'язкопружкої поведінки клітинних мембран / О.А. Стриха, Є.О. Гордієнко // Актуальні питання біологічної фізики та хімії: VII Міжн. науково–технічна конф.: матеріали конф. – Севастополь, 2012. – С. 77.
16. Смольянинова Е.И. Влияние различных этапов криоконсервирования методом витрификации на морфофункциональные и электрические параметры ранних

эмбрионов мыши / Е.И. Смольянинова, О.А. Стриха, В.А. Шигимага, Е.Г. Лисина, Л.И. Попивненко // Пробл. криобиологии. – 2012. – Т. 22, №3. – С. 275.

17. Гордиенко Е.А. Электрический пробой клетки: теоретический анализ и практическое применение / Е.А. Гордиенко, Е.И. Смольянинова, О.А. Стриха // Пробл. криобиологии. – 2012. – Т. 22, №3. – С. 237.

18. Gordienko E.A. Electroporation as possible mechanism of cryodamage / E.A. Gordienko, O.A. Strikha // The international conference of the society for low temperature biology: Theses. – Hannover, Germany, 2013. – P. 49.

19. Стриха О.А. Импульсная кондуктометрия как экспресс–тест для оценки состояния 2–клеточных эмбрионов мыши / О.А. Стриха // Пробл. криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №2. – С. 174.

АНОТАЦІЯ

Стриха О.А. Вплив кріопротекторів і заморожування на електроізоляційні властивості цитоплазматичних мембран ооцитів та двоклітинних ембріонів миші. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – криобіологія. – Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, Харків. – 2015.

Дисертаційна робота присвячена вивченню впливу кріопротекторів і заморожування на електроізоляційні властивості цитоплазматичних мембран ооцитів та двоклітинних ембріонів миші.

Створено оригінальну фізико–математичну модель трансмембранного переносу речовин між клітинами та оточуючим їх середовищем у процесі заморожування клітинної суспензії, яка враховує швидкість охолодження, геометричні та транспортні характеристики клітин і склад кріозахисного середовища та дозволяє оцінити зміни мембранного потенціалу клітин.

Теоретичні розрахунки показали, що при повільному охолодженні ооцитів і двоклітинних ембріонів миші (<5 К/хв) після гіперполяризації мембран спостерігається їх деполаризація, в той час як при швидкому охолодженні мембранний потенціал досягає значень в інтервалі –50÷–80 мВ, що може стати причиною електричного пробоя мембран.

Теоретично розрахована величина напруженості електричного поля на мембранах клітин (10^7 В/м) при заморожуванні, перевищує експериментально встановлений критичний поріг напруженості поля (4×10^5 В/м), за якого відбувається порушення електроізоляційних властивостей цитоплазматичних мембран, що підтверджує ймовірність пошкодження ембріонів миші шляхом електричного пробоя.

Показано, що експозиція двоклітинних ембріонів в етиленгліколь–сахарозному середовищі упродовж 1,5 хвилини не призводять до необоротного електричного пробоя та лізису бластомерів як до, так і після охолодження клітин до 77 К. Електроізоляційні властивості ембріонів порушуються після 3–хвилинної експозиції в етиленгліколь–сахарозному середовищі.

Ключові слова: заморожування, швидкість охолодження, вітрифікація, кріопротектори, електричний пробій біомембран, ооцити та ембріони миші.

АННОТАЦИЯ

Стриха О.А. Влияние криопротекторов и замораживания на электроизоляционные свойства цитоплазматических мембран ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков. – 2015.

Диссертационная работа посвящена изучению влияния криопротекторов и замораживания на электроизоляционные свойства цитоплазматических мембран ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши.

Создана оригинальная физико–математическая модель трансмембранного переноса веществ между клетками и окружающей их средой в процессе замораживания клеточной суспензии, которая учитывает скорость охлаждения, геометрические и транспортные характеристики клеток и состав криозащитной среды и позволяет оценить изменение мембранного потенциала клеток.

Использование этой модели позволяет прогнозировать, какие протоколы консервирования являются более эффективными, по сравнению с другими, и тем самым заменить часть реальных экспериментов теоретическими расчетами.

В модели учитывается существование сильных короткодействующих сил гидратационного отталкивания между головками полярных липидов, которые выстилают стенку гидрофильной мембранной поры. Учет этого эффекта приводит к уменьшению значений мембранного потенциала клеток, при которых происходит электрический пробой их мембран.

Предложенная физико–математическая модель позволяет существенно сузить область поиска оптимальных условий криоконсервирования биологических объектов.

Теоретически установлено, что при экспозиции ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши в растворах ЭГ и ДМСО наблюдается обратимая деполяризация мембран, тем более выражена, чем выше концентрация криопротекторов.

На основе модели электрического пробоя клеточных мембран в работе теоретически рассчитано время, за которое происходит электрический пробой мембран при том или ином мембранном потенциале. Теоретически доказано, что при медленном охлаждении ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши (<5 К/мин) после гиперполяризации мембран наблюдается их деполяризация, в то время как при быстром охлаждении мембранный потенциал достигает значений в интервале –50÷–80 мВ, что может стать причиной электрического пробоя мембран.

Теоретически рассчитанная величина напряженности электрического поля на мембранах клеток (10^7 В/м) при замораживании, превышает экспериментально установленный критический порог напряженности поля (4×10^5 В/м), при котором происходит нарушение электроизоляционных свойств цитоплазматических мембран, что подтверждает вероятность повреждения эмбрионов мыши путем электрического пробоя.

Экспериментально установлено, что экспозиция двухклеточных эмбрионов мыши в этиленгликоль–сахарозной среде на протяжении 1,5 минут не приводит к необратимому электрическому пробую и лизису бластомеров как до, так и после

охлаждения клеток до 77 К. Электроизоляционные свойства эмбрионов нарушаются после 3–минутной экспозиции в этиленгликоль–сахарозной среде.

Обратимая электропорация двухклеточных эмбрионов реализуется в интервале напряженностей электрического поля $0,5\text{--}3\times 10^5$ В/м, а необратимая электропорация при напряженностях поля больших $3,5\times 10^5$ В/м.

Полученные результаты показывают, что метод электропорации может быть использован как экспресс–тест для оценки сохранности барьерной функции биомембран после действия на них экстремальных факторов.

Полученные в диссертации результаты могут использоваться для усовершенствования существующих и разработки новых способов низкотемпературного консервирования ооцитов и эмбрионов млекопитающих, а также других типов клеток.

Ключевые слова: замораживание, скорость охлаждения, витрификация, криопротекторы, электрический пробой биомембран, ооциты и эмбрионы мыши.

ANNOTATION

Strikha O.A. Effect of cryoprotectants and cryopreservation on electrical insulating properties of mouse oocytes and 2-cell embryos cytoplasmic membranes. – A manuscript.

Dissertation for the candidate of biological science degree in specialty 03.00.19 – cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov. – 2015.

The thesis is devoted to the study of effect of cryoprotectants and cryopreservation on the electrical insulating properties of mouse oocytes and two–cell embryos cytoplasmic membranes.

The original physical and mathematical model of transmembrane mass transfer between cells and surrounding cell solution during freezing cell suspension has been proposed. This model takes into account optimal cooling rates, geometrical and transport characteristics of cells, composition of cryoprotective medium and estimates the changes of cell membrane potential.

The reversible membrane depolarization has been theoretically established to be observed when exposing mouse oocytes and two–cell embryos into ethylene glycol and dimethyl sulfoxide solutions. It was the more marked the higher was the concentration of cryoprotectants.

It has been shown that cells can be damaged by electrical breakdown during low–temperature preservation by a cooling rate of 5 K/min.

Theoretically calculated electric field intensity on cell membranes (10^7 V/m) exceeds the experimentally established critical threshold of field intensity (4×10^5 V/m). These conditions may cause electrical breakdown.

It has been established that 1,5 min duration of exposure in the ethylene glycol and sucrose medium do not lead to an irreversible electrical breakdown and blastomere lysis before and after cooling of cells till 77 K. Exposure of 3 min in ethylene glycol and sucrose medium reduced an embryo resistance to electrical breakdown and cryopreservation.

Key words: freezing: cryopreservation, cooling rate, vitrification, cryoprotectants, electrical breakdown of biological membranes, mouse oocytes and embryos.

Відповідальний за випуск д.б.н. Г. О. Бабійчук

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 0,9. Тир. 100 прим. Зам. 332-15.

Підписано до друку 22.09.15. Папір офсетний.

Надруковано з макету замовника у СПД ФО Бровін О.В.

61022, м. Харків, вул. Трінклера, 2, корп. 1, к. 19. Т. (057) 758-01-08, (066) 822-71-30

Свідотство про внесення суб'єкта до Державного реєстру
видавців та виготовників виробничої продукції серія ДК № 3587 від 23.09.09 р.