

Ф.І. ОСТАШКО, В.Ф. ОСТАШКО

ДО МЕХАНІЗМУ ТЕМПЕРАТУРНОГО ШОКУ КЛІТИН

Завдяки відомим працям І.В. Смирнова, В.К. Милованова, І.І. Соколовської, С. Полджа, О. Сміт [1, 2] та інших, відкрито нові технологічні засади та створено біотехнічні методи і техніку низькотемпературного зберігання біологічних матеріалів, що широко використовуються у тваринництві, біології, а також у практиці гуманної та ветеринарної медицини. З того часу в усьому світі проводяться дослідження із створення фундаментальної теорії кріобіології, особливо в напрямках вивчення механізмів кріоушкодження і розробки методів кріопротекції біологічних клітин.

Серед причин ушкодження клітин при їхньому охолодженні та заморожуванні одним з найпоширеніших факторів є температурний шок, а тому його вивченню слід приділяти належну увагу. Тепер уже загально визнано, що явище температурного шоку клітин [3] пов'язане з ушкодженням цитоплазматичної мембрани потоком води, зумовленим урівноваженням осмотичного градієнта, що утворюється внаслідок раптового охолодження системи "клітина—середовище" [4]. Але сам механізм ушкодження цитоплазматичної мембрани поки що не одержав належного роз'яснення. Ще не створено конструктивної моделі руйнівної дії цього потоку і далеко не висвітлено характер та розмірність сил, що виникають при цьому, і на які структури біологічної системи вони діють. При вивченні цього питання необхідно уявити собі саму біологічну систему "клітина—середовище" і розглянути всі явища, перш за все фізико-хімічні процеси, що виникають при охолодженні та фазових переходах цієї системи.

Як уже зазначалось, біологічна система являє собою складний водний розчин найрізноманітніших компонентів — від

© Ф.І. Осташко, В.Ф. Осташко, 2001

звичайних електролітів та недисоціюючих органічних речовин (цукрів, алкоголів, амінів, мономерів) до високомолекулярних полісахаридів, ліпідів, нуклеїнових кислот, білків, ферментів та їхніх комплексів, що вкраплені у мембранні структури багатofункціональних органел живої клітини, — і виконує роль протоплазми, де безперервно відбуваються складні обмінні процеси з оточуючим середовищем.

У зв'язку з цим усі процеси та реакції біологічної системи на охолодження і фазові переходи слід розглядати з позиції колегативних властивостей протоплазми та оточуючого клітину середовища.

Охолодження та переохолодження розчину призводить до таких змін:

- ♦ зменшення концентрації розчинних компонентів, згідно із законом Вант-Гофа, на $1/273$ початкової величини на кожен градус унаслідок зниження швидкості руху молекул та іонів розчинених речовин, а відтак зниження осмолярності;

- ♦ зниження ступеня електролітичної дисоціації складових розчину і зменшення концентрації осмотично активних частинок та осмолярності;

- ♦ підвищення в'язкості розчину і зниження швидкості руху осмотично активних частинок і знов-таки зниження осмолярності розчину;

- ♦ збільшення ентропії системи у зв'язку з втратою енергії;

- ♦ зменшення електропровідності розчину;

- ♦ зниження тиску пари над поверхнею рідини;

- ♦ збільшення щільності (питомої ваги) води, яка сягає максимального значення при температурі $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$;

- ♦ об'ємне розширення рідини після охолодження нижче $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$;

- ♦ збільшення кількості структурних форм і полімерних асоціантів води — кластерів;

- ♦ відповідно до законів термодинаміки змінюються теплоємність, поверхневий натяг, теплопровідність, температуро-провідність, діелектрична проникність та інші фізико-хімічні параметри протоплазми.

Таким чином, при охолодженні системи, передусім, знижується осмолярність оточуючого клітину розчину, що зумовлює потік води в клітину, тобто у замкнений простір.

За повільного зниження осмолярності (концентрації) оточуючого розчину вода повільно входить в середину клітини. При цьому об'єм клітини збільшується, мембрана розтягується, а якщо рівень гіпотонії досягає критичної межі, то розривається, спричиняючи незворотні ушкодження і загибель. Якщо ж ступінь гіпотонії не перевищує критичного рівня, то в системі урівноважується градієнт без шкоди для клітини.

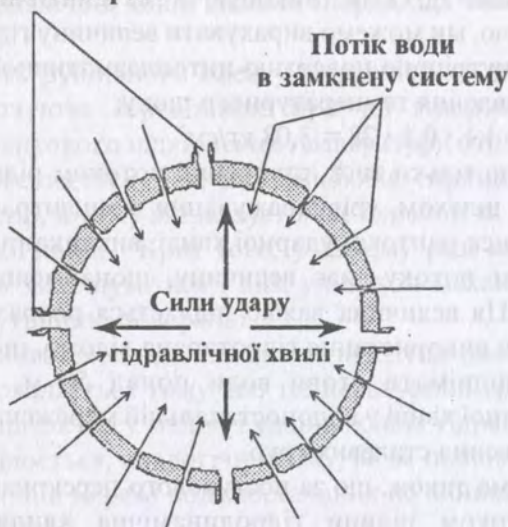
За раптового зниження тоничності оточуючого розчину вода раптово прориватиметься в середину клітини, зумовлюючи виникнення явища, подібного до гідравлічного удару, що характеризується раптовим підвищенням тиску рідини на внутрішню поверхню мембрани клітини, викликаним раптовою зміною швидкості її натікання в закриту систему або зупиненням. За тисячні секунди на внутрішню поверхню мембрани може раптово розвинути тиск високої енергії, здатний зруйнувати мембрану задовго до досягнення критичного рівня гіпотонії зовнішнього розчину. Теоретичні засади цього явища виклав Жуковський ще в 1898 р. [5] для руху рідини в замкненому трубопроводі при раптовому його перетинанні. Він довів, що за раптової зміни швидкості руху рідини або за раптового його зупинення у закритій системі виникають гідродинамічні напруги високих енергій, що можуть бути описані формулою:

$$\Delta p = \rho \cdot v_0 \cdot C, \quad (1)$$

де Δp — значення зміни тиску, кг/см^2 ; ρ — щільність рідини; v_0 — середня швидкість руху рідини до моменту раптового її зупинення чи раптової зміни швидкості її руху, м/с ; C — швидкість розповсюдження у рідині хвилі високого тиску, викликаної раптовою зміною швидкості руху рідини, або швидкість розповсюдження ударної хвилі в рідині, м/с .

Цю закономірність ми використали для розробки теоретичної моделі руйнування цитоплазматичної мембрани

Розриви мембрани



Руйнування мембрани клітини гідравлічним ударом при різкому падінні осмолярності або температури

внаслідок температурного (осмотичного) шоку клітини. Схематично для системи із замкненою напівпроникною мембранною поверхнею дане явище пояснюється на рисунку. Процес розвивається так: при раптовому падінні температури міжклітинного розчину, щільність якого дорівнює приблизно $1,1 \text{ г/см}^3$, вода через усі пори мембрани вривається в середину клітини і, не маючи виходу, розтягує її до критичного стану, коли мембрана вже втрачає здатність розтягуватися. При цьому потік розчину раптово зупиняється, що зумовлює виникнення ударної хвилі високого тиску, яка розповсюджується у тому ж напрямку з великою швидкістю і, наштовхуючись на напружену до критичного стану мембрану, розриває її.

М.Є. Жуковський у своїх розрахунках встановив, що швидкість розповсюдження ударної хвилі (величина "С") для металевих труб дорівнює приблизно 1200 м/с , а для еластичних (наприклад, гумових труб) ця величина лежить в межах $17 - 28 \text{ м/с}$. Остання величина найбільш вірогідна і для

біологічних об'єктів. Виконуючи математичну дію за цією формулою, ми можемо вирахувати величину гідравлічного тиску на внутрішню поверхню цитоплазматичної мембрани під час проявлення температурного шоку:

$$\Delta p = 1,1 \cdot 0,1 \cdot 28 = 3,08 \text{ кг/см}^2. \quad (2)$$

Але це тільки тиск, створений потоком рідини в середину клітини шляхом урівноважування концентраційного градієнта, а тиск раптової ударної хвилі, викликаний раптовим зупиненням потоку, має величину, щонайменше на порядок більшу. Ця величина важко піддається розрахунку. Однак з практики використання гідротарана відомо, що ударна хвиля здатна піднімати стовп води понад 50 м, а виникнення гідравлічної хвилі у водопостачальній мережі часто спричиняє пошкодження сталевих труб.

Відомо також, що за поступового перекирвання шляху перед потоком рідини гідродинамічна хвиля утворюється повільно і не набирає високої енергії, гідродинамічний удар пом'якшується і система не ушкоджується. Аналогічно температурний шок клітин пом'якшується або зовсім не проявляється за повільного зниження температури клітинної суспензії.

Отже, якщо донині вважалося, що ушкодження клітин унаслідок температурного шоку є результатом осмотичного процесу, який виникає при урівноважуванні концентраційного градієнта, описаним нами ще у 1963 р. [6], то тепер теоретичну модель механізму температурного шоку слід доповнити дією руйнівної сили удару гідродинамічної хвилі, яка з'являється унаслідок раптової зміни швидкості руху в закриті порожнину клітини потоку води або його раптовим зупиненням та напруженою до критичного рівня цитоплазматичною мембраною, яка втратила свою еластичність.

Висновки. 1. Механізм ушкодження мембранного апарату клітини при урівноважуванні гіпотонічного осмотичного градієнта, зумовленого раптовим зниженням температури і концентрації оточуючого середовища, пояснюється раптовим виникненням потоку води в клітину та раптовим його зупиненням у замкненій системі, розтягнутою до критичного рівня

цитоплазматичною мембраною, що індукує утворення раптової ударної гідравлічної хвилі високої енергії, здатної зруйнувати мембрану.

2. Відсутність руйнівного ефекту гідравлічного потоку із клітини в оточуюче середовище при дії гіпертонічного градієнта або раптового підвищення температури оточуючого середовища пояснюється тим, що цей потік спрямований у відкритий простір, а тому він не зустрічає перепон та не утворює гідравлічної хвилі. Крім того, у даному разі мембрана має можливість зморщуватися і цим уникнути механічної дії потоку на її внутрішню поверхню.

3. За повільного охолодження суспензії клітин температурний шок не проявляється тому, що температурний градієнт у відповідний відрізок часу малий і ударна хвиля гідравлічного потоку не утворюється, аналогічно тому, як за повільного перекривання крана в мережі водопостачання не виникає гідродинамічного удару.

1. *Смирнов И.В., Милованов В.К., Соколовская И.И.* Свойства живчиков млекопитающих сохранять биологическую полноценность после быстрого замораживания. Диплом СССР на открытие № 103 с приоритетом от июня 1947 г.

2. *C. Polge, A. Smith, A. Parkes.* Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (London)*, 1949, 164, 666.

3. *Кузнецова Н.А.* Первый опыт применения искусственного осеменения в каракулеводстве // Проблемы животноводства. — 1932. — № 6.

4. *Осташко Ф.И.* Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. — К., 1978.

5. *Жуковский Н.Е.* Гидравлический удар. — БСЭ. — Том 11. — С. 260.

6. *Осташко Ф.И.* О природе холодного удара живчиков // Искусственное осеменение с.-х. животных: Сб. работ НИИЖ Л. и П. УССР. — Харьков, 1963.

Харківський біотехнологічний центр УААН

Харківський державний медичний університет