

НАЦИОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

На правах рукописи

СТРИХА Оксана Анатольевна

УДК 547.569.2:57.043:577.352.5

**ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ И ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА
ЭЛЕКТРОИЗОЛЯЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ
МЕМБРАН ООЦИТОВ И ДВУКЛЕТОЧНЫХ ЭМБРИОНОВ МЫШИ**

03.00.19 – криобиология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
член–корреспондент НАН Украины,
доктор биологических наук, профессор
Евгений Александрович Гордиенко

Харьков – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРИЧИНАХ, МЕХАНИЗМАХ И ЗАКОНОМЕРНОСТЯХ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПРОБОЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН.....	18
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Физико–математическое моделирование процессов трансмембранного переноса вещества при замораживании клеток.....	43
2.2. Получение двухклеточных эмбрионов мыши.....	44
2.3. Криоконсервирование двухклеточных эмбрионов мыши.....	45
2.4. Определение электрической проводимости двухклеточных эмбрионов.....	47
2.5. Химические реагенты.....	50
2.6. Приготовление растворов.....	50
2.7. Методы анализа и статистической обработки результатов	51
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПРОБОЯ КЛЕТОК ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ.....	52
3.1. Физико–математическая модель трансмембранного переноса веществ и электропорации клеток при замораживании клеточной суспензии.....	52
3.2. Усовершенствованная модель электрического пробоя клеточных мембран.....	85
3.3. Экспериментальное изучение электрического пробоя двухклеточных эмбрионов мыши до и после экспозиции в криозащитных растворах и после полного цикла криоконсервирования методом витрификации.....	94

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	108
ВЫВОДЫ.....	110
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	112

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

a	радиус мембранной поры
Cl^-	ион хлора
$[Cl^-]^{in}$	концентрация ионов хлора во внутриклеточном растворе
$[Cl^-]^{out}$	концентрация ионов хлора во внеклеточном растворе
ε_0	электрическая постоянная
ε_m	относительная диэлектрическая проницаемость воды
F	число Фарадея
$\Delta\varphi_m$	трансмембранный потенциал
h	толщина клеточной мембраны
k	постоянная Больцмана
K^+	ион калия
$[K^+]^{in}$	концентрация ионов калия во внутриклеточном растворе
$[K^+]^{out}$	концентрация ионов калия во внеклеточном растворе
Na^+	ион натрия
$[Na^+]^{in}$	концентрация ионов натрия во внутриклеточном растворе
$[Na^+]^{out}$	концентрация ионов натрия во внеклеточном растворе
r_b	радиус бластомера в двухклеточном эмбрионе
r_c	радиус клетки
r_o	радиус ооцита мыши
R	универсальная газовая постоянная
T	абсолютная температура

U_w	энергия активации трансмембранного переноса молекул воды
V	объем клетки
БЛМ	бислойные липидные мембраны
ГСЖК	гонадотропин сыворотки жеребых кобыл
ДМСО	диметилсульфоксид
ИЭП	импульсное электрическое поле
чХГ	человеческий хорионический гонадотропин
ЭГ	этиленгликоль

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Одной из актуальных задач современной криобиологии является разработка способов длительного консервирования биологических объектов путем их глубокого замораживания. На сохранность криоконсервируемых клеток влияет большое количество факторов, действию которых они подвергаются как на этапах подготовки к замораживанию, так и на этапах замораживания и последующего отогрева. В процессе низкотемпературного консервирования биологических объектов существенно нарушается ионный и водный гомеостаз клеток. Такие нарушения могут иметь место на различных этапах низкотемпературного консервирования, и обусловлены дегидратацией и регидратацией клеток, выходом из цитоплазмы клеток или поступлением в нее основных ионов, обеспечивающих ионный баланс клетки, изменения концентраций вне- и внутриклеточных ионов. Эти процессы могут отражаться на значениях мембранного потенциала клеток. В последнее время показано, что нарушение ионного цитоплазматического баланса клеток может привести к метаболическим нарушениям, существенно снижающим жизнеспособность клеток после криоконсервирования [1, 2].

Большинство факторов, вызывающих повреждение клеток на этапе замораживания непосредственно или косвенно связаны с образованием в клеточной суспензии кристаллов льда [3]. По мере замораживания все большая часть воды превращается в лед и концентрация растворенных веществ в межкристаллическом растворе соответственно возрастает. Это приводит к значительному обезвоживанию клеток, которые вытесняются кристаллами льда в жидкую фазу, а также к перераспределению растворенных в клеточной суспензии электролитов между клетками и окружающей их жидкой фазой и, как следствие, к изменению мембранного потенциала клеток. Можно предположить, что электропорация биомембран может быть одним из механизмов криоповреждения клеток на этапе кристаллизации и плавления клеточной суспензии. Как отмечалось ранее, одной из причин дестабилизации

мембран при замораживании может быть возникновение электрического поля с напряженностью, достаточной для гиперполяризации мембран, приводящей к необратимому электрическому пробоя [4]. Как значительное обезвоживание клеток, так и чрезмерное увеличение (по абсолютной величине) мембранного потенциала может приводить к повреждению клеток в процессе криоконсервирования. Наблюдаемые после отогрева повреждения, такие как набухание и лизис клеток, свидетельствующие о нарушении полупроницаемых свойств плазматических мембран во многом похожи на явления, наблюдаемые при действии электрического поля на клетки [5 – 7].

Получить непосредственное экспериментальное подтверждение или же опровержение этой гипотезы сложно. Напротив относительно несложно сделать это путем физико – математического моделирования процессов трансмембранного переноса веществ, которые происходят при замораживании и отогреве клеток. В криобиологической литературе есть всего несколько работ посвященных такому моделированию [8, 9]. Кроме того, целесообразным является и экспериментальное изучение условий, при которых возникает необратимый электрический пробой мембран клеток.

Как известно, при нормальных для жизнедеятельности клеток условиях клеточные мембраны проявляют уникальные электроизолирующие свойства. Их электропроводность имеет значения около 5×10^{-7} См/м и на несколько порядков меньше электропроводности окружающих мембраны водных растворов электролитов [10, 11]. Типичное значение трансмембранного напряжения, при котором происходит электрический пробой биологических мембран, как правило, превышает напряжение пробоя применяемых в технике жидких изоляторов, в частности, жидких углеводородных пленок, толщина которых равна толщине мембранных бислоев [12]. Поскольку наличие примеси воды и электролитов в углеводородной пленке существенно снижает напряжение ее пробоя, можно утверждать, что биомембраны в живых клетках даже при типичных нормальных значениях мембранного потенциала функционируют на грани условий, которые ведут к их электрическому пробоя.

Например, в норме на внутренних мембранах энергизированных митохондрий перепад электрического потенциала составляет около 175 мВ и сопоставим с потенциалом электрического пробоя этих мембран, который равен примерно 200 мВ [13]. Такой риск, по-видимому, оправдан тем, что энергия, которую клетка запасает в виде мембранного потенциала, используется клеткой для реализации таких жизненно важных функций, как передача информации, клеточное дыхание, рецепция и механическая работа.

Электрический пробой биомембраны можно вызвать искусственно, действуя на клетки внешним электрическим полем [7, 14–16]. При этом внешнее поле индуцирует дополнительный трансмембранный перепад потенциала электрического поля, который суммируется с обычным мембранным потенциалом и может привести к электрическому пробоем мембраны. Экспериментально установлено, что электрический пробой клеточных мембран осуществляется путем образования в них сквозных гидрофильных пор [17–22], через которые в клетку могут проникать довольно крупные молекулы, такие, как ДНК [23–26], РНК [27, 28], антитела [29, 30], флуоресцентные зонды [31] и молекулы лекарственных веществ [32]. В связи с этим процесс электрического пробоя клеточных мембран имеет эквивалентное название – электропорация. Очевидно, в результате образования в мембране сравнительно крупных сквозных пор, заполненных растворами электролитов, которые окружают мембрану, электропроводность мембраны значительно увеличивается, то есть происходит электрический пробой мембраны.

В зависимости от условий осуществления электропорации она может оказаться обратимой или необратимой. При обратимой электропорации возникающие в мембране поры после отключения внешнего электрического поля со временем самопроизвольно заживают, а электропроводность и проницаемость мембран восстанавливаются до исходных значений [33–36]. Если же напряженность приложенного к клеткам внешнего электрического поля является достаточно большой и электрическое поле действует на клетки достаточно долго, то электрический пробой клеток становится необратимым и

клетки погибают [37]. Явление необратимого электрического пробоя клеток широко используется на практике для стерилизации пищевых продуктов, питательных сред для культивирования клеток и тканей и других растворов [38–47].

С другой стороны, обратимое электропорообразование в импульсном электрическом поле все шире применяется не как способ деструкции клеток, а как составной элемент прогрессивных биологических и медицинских технологий, например, в генной терапии [23, 48, 49], для целенаправленной блокировки определенных внутриклеточных эпителиальных высокоспецифическими антителами, попадающими внутрь клеток в результате их электропорации [29, 30, 37, 49], для трансдермального переноса лекарственных веществ в организм человека [50–52], для обработки клеток *ex vivo* в процессе операции, в частности, для нагружения эритроцитов молекулами веществ, которые изменяют сродство кислорода к гемоглобину путем их электропорации в проточной системе с последующим возвращением обработанной крови в организм [53].

Еще одним эффектом, который возникает при действии импульсов электрического поля на клетки, является слияние клеток (так называемое электрослияние) [54, 55]. В настоящее время метод электрослияния считается наиболее приемлемым при проведении исследований в области клеточной инженерии [56–64]. В основе процесса электрослияния двух клеточных мембран в области их контакта лежит электропорация этой области мембран под воздействием импульсов внешнего электрического поля [65, 66], что является существенным доводом в пользу актуальности и перспективности дальнейшего, более глубокого теоретического и экспериментального изучения собственно процесса электропорации.

Реконструированные путем электрослияния клетки, созданные из ядра и цитоплазмы различного происхождения, могут использоваться для решения таких важнейших общебиологических проблем, как выяснение механизмов реализации генетической информации и роли внеядерной наследственности для

развития, взаимодействия ядра с цитоплазмой и мембранными рецепторами, тотипотентность генома клеток на разных уровнях их дифференцировки, репрограммирование генома, клонирование ценных для сельского хозяйства особей и растений, получение гибридных животных и межвидовых химер путем формирования реконструированных зигот и ранних эмбрионов [63, 67, 68]. Создание межлинейных и межвидовых химер путем замены ядра в одной из клеток на стадии двух бластомеров может содействовать преодолению несовместимости реципиента и донора при межвидовой трансплантации эмбрионов [56], в том числе с использованием генетической информации криоконсервированных геномов. При этом следует подчеркнуть, что, как показано, например, в работах [56, 69–71], при электрослиянии клеток геном не повреждается. Поскольку хромосомы, как правило, более устойчивы к процедуре замораживания-отогрева, чем клеточные мембраны [72], перспективной с точки зрения сохранения генетических ресурсов Земли может оказаться пересадка хромосом из криоконсервированных клеток в энуклеированные зиготы другого близкого вида.

Электрический пробой мембраны может наблюдаться не только под действием напряжения, подаваемого на мембрану от внешнего источника, но и под действием собственного мембранного потенциала. Некоторые ученые считают, что электрический пробой мембран является универсальным механизмом нарушения их барьерной функции при различных патологиях или стрессовых состояниях живой клетки [13, 73]. При этом пробой мембраны осуществляется не в результате воздействия на нее внешнего электрического поля, а собственным мембранным потенциалом, когда диэлектрическая проницаемость и стабильность липидного бислоя уменьшаются, например, вследствие перекисного окисления мембранных липидов, охлаждения, изменения концентрации ионов хлора во внеклеточной среде и pH внутриклеточного раствора [13, 74]. Все эти факторы уменьшают электрическую прочность мембран, то есть снижают потенциал их пробоя.

Поскольку в процессе низкотемпературного консервирования биологических объектов существенно нарушается ионный и водный гомеостаз клеток, можно предположить, что явление электропорации биомембран может быть одним из механизмов их криповреждения на этапе кристаллизации и плавления клеточной суспензии. В работе [8] с помощью простой термодинамической модели количественно описано изменение трансмембранного потенциала и содержания воды в клетке при замораживании ооцитов мышцы в изотоническом фосфатно – буферном соляном растворе. В результате компьютерного моделирования авторы этой работы показали, что в начале замораживания происходит быстрый рост кристаллов льда во внеклеточном растворе, который вызывает резкое (до -90 мВ) увеличение мембранного потенциала.

Авторы работы [75] экспериментально изучили электрические свойства клеточных мембран одно– и двухклеточных эмбрионов мышцы после действия на них различных криопротекторов (диметилсульфоксид (ДМСО), формамид, этиленгликоль (ЭГ)) в концентрациях до 5 М и после процедуры замораживания, описанной в работе. Они показали, что при экспозиции клеток с криопротекторами значение мембранного потенциала эмбрионов плавно понижается с ростом их концентрации, а величина электропроводности их мембран сильно увеличивается. После возвращения в физиологический раствор электрические характеристики мембран сохраняли пониженные значения. На основе результатов измерения электрических параметров клеток после их замораживания авторы [75] пришли к следующему выводу: чем сильнее криопротектор уменьшает электропроводность клеточной мембраны, тем он более эффективен при криоконсервации.

Предположение о том, что электрический пробой клеточных мембран является одним из факторов криповреждения, подтверждается следующими соображениями. Как показано в работе [76], фазовый переход липидных бислоев из жидкокристаллического в твердое гелеобразное состояние сопровождается увеличением их поверхностного натяжения и способствует

повышению вероятности их электропорации. По данным рентгеноструктурного анализа при фазовом переходе мембраны из жидкокристаллического состояния в гель, происходит изменение толщины бислоя и площади на молекулу липида. Поэтому молекулы в жидкокристаллических доменах будут изотропно растянуты, и в мембране возникнет упругое натяжение, способствующее образованию пор в мембране [76].

Содержание ионов в окружающем клетки растворе резко повышается при образовании кристаллов льда в переохлажденном водном растворе. При этом мембранный потенциал цитоплазматических мембран клеток может превысить уровень, необходимый для осуществления электропорации клеток, расположенных между кристаллами льда. По-видимому, этот эффект объясняет негативное действие чрезмерного переохлаждения клеточной суспензии при замораживании на жизнеспособность клеток [77] и обуславливает целесообразность применения процедуры сидинга в процессе замораживания клеточной суспензии.

В процессе замораживания клеточной суспензии pH внеклеточного раствора уменьшается [3], вследствие чего изменяется и pH внутриклеточного раствора. В соответствии с уравнением Нернста при сдвиге pH на 1,2 трансмембранный потенциал изменяется на 72 мВ [13]. Такое изменение pH внутриклеточного раствора способно привести к электрическому пробое митохондрий, мембранный потенциал которых обусловлен перепадом концентрации ионов водорода и даже в норме является аномально высоким.

Таким образом, обобщая приведенные выше рассуждения, можно утверждать, что дальнейшее теоретическое и экспериментальное изучение электрического пробоя клеточных мембран является актуальным и перспективным для решения общебиологических проблем и создания новых биомедицинских технологий, а также для понимания связанных с электропорацией механизмов повреждения клеток в процессе их низкотемпературного консервирования и способов предотвращения этих повреждений.

Связь с научными программами, планами, темами

Диссертация выполнена в отделе низкотемпературного консервирования Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины в рамках бюджетных НИР: «Теоретический анализ и экспериментальное исследование специфических механизмов криоповреждения и криозащиты клеток, обусловленных особенностями их функционирования» (2006 – 2010 гг.), № государственной регистрации 0106U002164; «Теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение способов увеличения адгезивной способности клеток до и после криоконсервирования путем модификации физико–химических характеристик подложки и поверхности клеточных мембран» (2011 – 2015 гг.), № государственной регистрации 0111U001198.

Цели и задачи исследования

Цель работы – выяснение условий нарушения электроизоляционных свойств цитоплазматических мембран (электрического пробоя) ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши в процессе низкотемпературного консервирования.

Задачи исследования:

- Создать оригинальную физико–математическую модель процессов трансмембранного переноса веществ между клетками и окружающей их средой в процессе низкотемпературного консервирования, которая позволяет оценить изменение объема и мембранного потенциала клеток.
- Теоретически оценить влияние сил гидратационного отталкивания между липидами в стенке гидрофильной поры на мембранный потенциал, которое приводит к электрическому пробоя мембран ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши.
- С помощью созданной модели проанализировать влияние растворов этиленгликоля, диметилсульфоксида и замораживания на мембранный потенциал ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши.

– Экспериментально изучить условия возникновения обратимого и необратимого электрического пробоя двухклеточных эмбрионов мыши.

Объект исследования – изменение мембранного потенциала клеток под влиянием растворов этиленгликоля, диметилсульфоксида и замораживания.

Предмет исследования – электрический пробой как фактор криповреждения цитоплазматических мембран ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши под влиянием растворов этиленгликоля, диметилсульфоксида и замораживания.

Методы исследований. В работе использованы следующие теоретические и экспериментальные методы исследования: физико–математическое и компьютерное моделирование – для расчета зависимостей состава вне– и внутриклеточной сред, мембранного потенциала и объема клеток при низкотемпературном консервировании; метод импульсной кондуктометрии – для изучения электропроводности эмбрионов мыши под влиянием криопротекторов и после охлаждения; метод гормональной суперовуляции – для получения достаточного количества эмбрионов мыши; метод оптической микроскопии – для визуальной оценки морфологического состояния эмбрионов и при манипуляциях с отдельными клетками.

Научная новизна полученных результатов

Создана оригинальная модель для расчета изменяющихся во времени мембранного потенциала, объема клеток и состава вне– и внутриклеточной сред в течение экспозиции клеток в криозащитном растворе и при их замораживании. Впервые теоретически обоснована возможность повреждения клеток в процессе их замораживания путем электрического пробоя их мембран. Экспериментально установлены условия, при которых происходит электрический пробой эмбрионов мыши. Показано, что электропроводность мембран эмбрионов мыши может служить чувствительным тестом для выявления их латентных повреждений.

Практическая значимость

Теоретически обоснован механизм образования поры критического радиуса при действии повышенной напряженности поля. Полученные в работе результаты в дальнейшем могут быть использованы при усовершенствовании существующих и разработке новых способов низкотемпературного консервирования эмбрионов млекопитающих и других типов клеток, а также для диагностики функциональной полноценности клеток при реализации различных клеточных биотехнологий. Предложенная физико – математическая модель позволяет существенно сузить область поиска оптимальных условий криоконсервирования биологических объектов.

Личный вклад соискателя

Диссертация является самостоятельным научным исследованием. Автором работы проведен анализ литературы по теме диссертации, лично получены и статистически обработаны представленные в ней экспериментальные данные, выполнены численные расчеты и сформулированы выводы.

В опубликованных с соавторами публикациях личный вклад диссертанта состоит в следующем:

в работах [189, 191–195] – в получении клеток заданной стадии развития, проведении экспериментов, обработке и анализе полученных результатов;

в работах [190, 197, 199] – в изучении электрических параметров ооцитов и 2–клеточных эмбрионов до и после полного цикла криоконсервирования методом витрификации, в обработке и анализе результатов;

в работах [175, 176] – в построении теоретической модели трансмембранного переноса веществ при замораживании клеточных суспензий;

в работе [180] – в подготовке аналитического обзора по теме диссертации;

в работах [181, 182, 184] – в построении физико–математической модели электропорации сферической бислойной липидной мембраны;

в работе [196] – участие в планировании и выполнении экспериментов, в обсуждении результатов и выводов;

в работе [183] – в моделировании явления электропорации яйцеклеток мыши;

в работе [185] – в обобщении литературных данных по теме диссертации и обосновании актуальности темы диссертации;

в работе [198] – в обобщении возможности применения электропроводимости мембран ооцитов и эмбрионов млекопитающих для диагностики их функциональной полноценности.

Апробация результатов диссертации

Материалы диссертационной работы были представлены на: X Всеукраїнській науковій конференції студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих вчених в Україні» (г. Киев, 2010); V З'їзді українського біофізичного товариства (г. Луцк, 2011); 8th EBSA European Biophysics Congress (г. Будапешт, Венгрия, 2011); міжнародних науково-технічних конференціях «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» (г. Севастополь 2011, 2012); конференциях молодых ученых ИПКиК НАН Украины совместно с кафедрой UNESCO «Холод в биологии и медицине» (г. Харьков, 2011, 2012, 2014); The international conference of the society for low temperature biology (г. Ганновер, Германия, 2013); международной заочной научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии» (г. Сыктывкар, Россия – Украина, 2014); міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми біофізики» (г. Львов, 2014); международной конференции «Консервация генетических ресурсов» (г. Пущино, Россия, 2014).

Публикации

Результаты диссертации отражены в 19 публикациях: 5 статей в ведущих научных профильных журналах, 2 статьи в зарубежных научных журналах, 12

тезисов докладов – в сборниках научных работ научно–практических конференций и симпозиумов.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, 3 разделов оригинальных исследований, выводов, списка использованных источников. Работа изложена на 132 страницах, из них 111 страниц основного текста, 34 рис., 3 фото, 2 табл., 1 схема, список использованных источников из 199 наименований на 21 странице.

РАЗДЕЛ 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРИЧИНАХ, МЕХАНИЗМАХ И ЗАКОНОМЕРНОСТЯХ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПРОБОЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Липидные бислои и клеточные мембраны значительно затрудняют диффузионный перенос сквозь них ионов и молекул по сравнению с диффузией в контактирующих с мембранами растворах. В частности, типичное значение электропроводности искусственных бислойных липидных мембран (БЛМ) для ионов натрия или калия равно 10^{-4} См/м² [15, 78]. Значение этой величины для клеточных мембран при нормальных физиологических условиях составляет около 10 См/м² и зависит как от трансмембранного электрического потенциала, так и от состава соприкасающихся с мембраной растворов [12, 15]. Электропроводность физиологического раствора значительно превышает оба эти значения [79].

Электрическим пробоем клеточной мембраны или БЛМ называется явление резкого роста их электропроводности при определенном значении перепада электрического потенциала на мембране. Это явление было обнаружено в 40-х годах двадцатого столетия при измерении вольт – амперной характеристики *Chara Australia* Голдманом [80]. Обнаруженный эффект оказался обратимым: вольтамперная характеристика оставалась неизменной после повторного воздействия аналогичных трансмембранных потенциалов. В соответствии с этим указанное явление было названо обратимым электрическим пробоем. После этого в результате изучения вольтамперных характеристик большого количества других клеток было доказано, что электрический пробой клеточных мембран является универсальным ответом клетки на приложенное к ней извне достаточно сильное электрическое поле. В работах [7, 20, 81]

показано, что, когда перепад электрического потенциала на мембране неоплодотворенной яйцеклетки морского ежа становится достаточно большим (≈ 1 В), электропроводность мембраны резко увеличивается и через несколько микросекунд может достичь значения 10^4 См/м². Повреждение искусственных бислойных липидных мембран и клеточных мембран наблюдалось при величинах трансмембранного электрического потенциала в диапазоне 150–600 мВ и более и при длительности его действия от нескольких микросекунд до нескольких миллисекунд [10, 15, 41, 82–84]. При этом напряженность электрического поля в мембране, толщина которой равна около 5 нм, достигала значений порядка 10^5 кВ/м.

Большое количество экспериментальных работ посвящено изучению механизмов электропорации в разных типах мембран, начиная от липидных бислоев [35, 85] до мембран эритроцитов [20, 86, 87]. Проведены исследования процессов образования и исчезновения мембранных пор в результате действия на клетки электрических импульсов разной интенсивности и продолжительности [88], кинетики электропорации мембран методом петч-кламп [81, 89], проведен анализ движения ионов и флуоресцентных красителей сквозь электропорированные мембраны [90–92]. Получены данные о трансмембранном потенциале с помощью чувствительных к трансмембранной разности потенциалов красителей [91, 93].

В конце 1970–х возникло представление о том, что в результате электрического пробоя в мембране возникает сквозная пора, которая, если действующий на мембрану импульс внешнего электрического поля имеет небольшую длительность, залечивается, так что в итоге повреждения мембраны не возникает [94, 95]. В начале 1980–х годов представление об образовании мембранных пор косвенно подтвердилось данными о том, что небольшие молекулы, такие, как сахароза, некоторые красители, одно- и двухвалентные ионы, которые в норме не проникают в клетки, обнаруживаются в клетках после электрического пробоя их цитоплазматических мембран. Сразу после этого электрические импульсы начали применять как способ внутриклеточной

микроинъекции, который можно использовать для введения в клетки лекарственных препаратов [48, 96, 97], ДНК [25, 26] и протеинов [98] путем временного повышения проницаемости клеточных мембран при действии на них импульсов электрического поля [11].

Первопричиной, которая приводит к образованию пор в мембране при действии на нее электрического поля, считается возникновение достаточно большого и длительно действующего трансмембранного перепада электрического потенциала. Теоретический анализ показывает [10], что при включении внешнего электрического поля мембрана клетки заряжается подобно соединенным параллельно сопротивлению и емкости. В стационарном случае трансмембранный потенциал, наведенный внешним однородным электрическим полем с напряженностью $\vec{E}$ на мембране сферической клетки с нулевой электропроводностью мембраны, равен

$$\Delta\varphi_m = \varphi_{in} - \varphi_{out} = \frac{3}{2}Er_c \cos\theta, \quad (1.1)$$

где Δ – оператор Лапласа, φ_{in} – электрический потенциал, в окружающей клетку среде, φ_{out} – внутриклеточный электрический потенциал, r_c – радиус клетки, θ – угол между направлением электрического поля и радиусом – вектором $\vec{r}$. Он найден Шванном [99] в 1957 г. как решение системы уравнений

$$\Delta\varphi_{in} = 0 \quad (1.2)$$

$$\Delta\varphi_{out} = 0 \quad (1.3)$$

Вдали от клетки

$$\lim_{r \rightarrow \infty} \varphi_{out} = -Er \cos\theta, \quad (1.4)$$

где r – расстояние от центра клетки до рассматриваемой точки внеклеточного пространства. Равенство (1.4) используется как одно из граничных условий при решении системы уравнений (1.2) – (1.3). В качестве второго граничного условия использовано условие ограниченности внутриклеточного электрического потенциала $\varphi_{in}(r=0) < \infty$. Еще два граничных условия, являются условиями непрерывности электрического потенциала, на внешней и внутренней поверхностях мембраны и условиями отсутствия трансмембранного тока.

Решение системы уравнений (1.2) – (1.3) с учетом указанных граничных условий показывает, что при действии внешнего постоянного электрического поля с напряженностью $\vec{E}_{out}$ на взвешенную в физиологическом растворе клетку, мембрана которой является сферой с радиусом r_c и имеет пренебрежимо малую электропроводность, на мембране клетки возникает мембранный потенциал [100, 101]

$$\Delta\varphi_m(t) = \frac{3}{2} r_c E_{out} \cos\theta \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_m}\right) \right], \quad (1.5)$$

где t – время после включения внешнего электрического поля, θ – угол между силовой линией поля и нормалью к сферической поверхности клетки в рассматриваемой точке поверхности мембраны, $\tau_m = r_c C_m \left(\frac{1}{\sigma_{in}} + \frac{1}{2\sigma_{out}} \right)$ – характерное время перезарядки мембраны при включении внешнего электрического поля, $C_m = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_m}{h}$ – емкость на единицу площади поверхности мембраны, ε_0 – диэлектрическая постоянная, ε_m – относительная диэлектрическая проницаемость мембраны, h – толщина мембраны; σ_{in} и

σ_{out} – удельные электрические сопротивления внутриклеточной и внеклеточной сред соответственно. Изменение емкости мембраны во время электропорации пренебрежимо мало, поскольку только малая часть поверхности мембраны содержит поры (экспериментально установлено, что емкость изменяется менее чем на 2%), а сопротивление мембраны меняется на порядок [12].

В соответствии с (1.5) при нулевом потенциале покоя максимальное по абсолютной величине значение трансмембранного потенциала

$\Delta\varphi_m(t) = \frac{3}{2}r_c E_{out}$ достигается на полюсах мембраны ($\theta = 0$ и $\theta = \pi$) за время

порядка 1 мкс. В соответствии с (1.5) величина индуцированного внешним

полем перепада трансмембранного потенциала $\Delta\varphi_m$ меняет знак при $\theta = \frac{\pi}{2}$.

Обобщение на случай отличной от нуля электропроводности мембраны приводит к следующему результату [101]:

$$\Delta\varphi_m(t) = \frac{3}{2}r_c E_{out} \cos\theta \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_m}\right) \right] \times$$

$$\times \frac{\sigma_{out} \left[3hr_c^2 \sigma_{in} + (3h^2 r_c - h^3)(\sigma_m - \sigma_{in}) \right]}{r_c^3 (\sigma_m + 2\sigma_{out}) \left(\sigma_m + \frac{1}{2}\sigma_{in} \right) - (r_c - h)^3 (\sigma_{out} - \sigma_m)(\sigma_{in} - \sigma_m)}, \quad (1.6)$$

$$\tau_m = r_c C_m \left(\frac{1}{\frac{2\sigma_{in}\sigma_{out}}{\sigma_{in} + 2\sigma_{out}} + r_c \sigma_m} \right)$$

где σ_m – удельная электропроводность клеточной мембраны. При $\sigma_m \rightarrow 0$ этот результат совпадает с (1.5). Для создания достаточных для электрического пробоя клеток потенциалов используются специальные устройства, которые генерируют короткие (от 10 мкс до 10 мс) импульсы электрического поля с амплитудой до 10 кВ и более [102, 103].

Эксперименты подтверждают приведенные выше результаты теоретического анализа при сравнительно небольших трансмембранных перепадах электростатического потенциала [104, 105]. В работе К. Kinosita [20] исследован трансмембранный потенциал, возникающий при действии внешнего электрического поля на клеточные мембраны неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа. Пока $\Delta\varphi_m$ на мембране яйцеклетки морского ежа не превосходит значение 0,75 В, клетку можно рассматривать как сферический проводник, окруженный тонкой диэлектрической мембраной с небольшой электропроводностью, и экспериментальные результаты вполне удовлетворительно согласуются с вычисленными по формулам (1.5) или (1.6).

Однако, когда перепад электрического потенциала на мембране неоплодотворенной яйцеклетки морского ежа становится достаточно большим (около 0,75 В), электропроводность мембраны резко увеличивается и через несколько микросекунд достигает значения 10^5 См/м² [20, 86, 87, 106]. При этом изменение трансмембранного потенциала со временем и его распределение вдоль поверхности клеточной мембраны отклоняются от предсказываемых равенствами (1.5) и (1.6). Так, например, при напряженности приложенного к яйцеклетке морского ежа электрического поля, равной 4×10^4 В/м, рассчитанная по (1.5) теоретическая зависимость трансмембранного потенциала от времени имеет вид, показанный на рис. 1.1 пунктирной линией с максимальным значением трансмембранного потенциала около 3 В [107].

Однако в процессе экспериментов такая величина $\Delta\varphi_m$ не достигается. Экспоненциальный рост $\Delta\varphi_m$, соответствующий равенству (1.5) и представленный на рис. 1.1 пунктирной линией, примерно через одну

микросекунду после начала действия на клетку внешнего электрического поля прекращается. Спустя одну миллисекунду после начала действия электрического импульса это распределение имеет вид, показанный на рис. 1.1 сплошной линией [107].

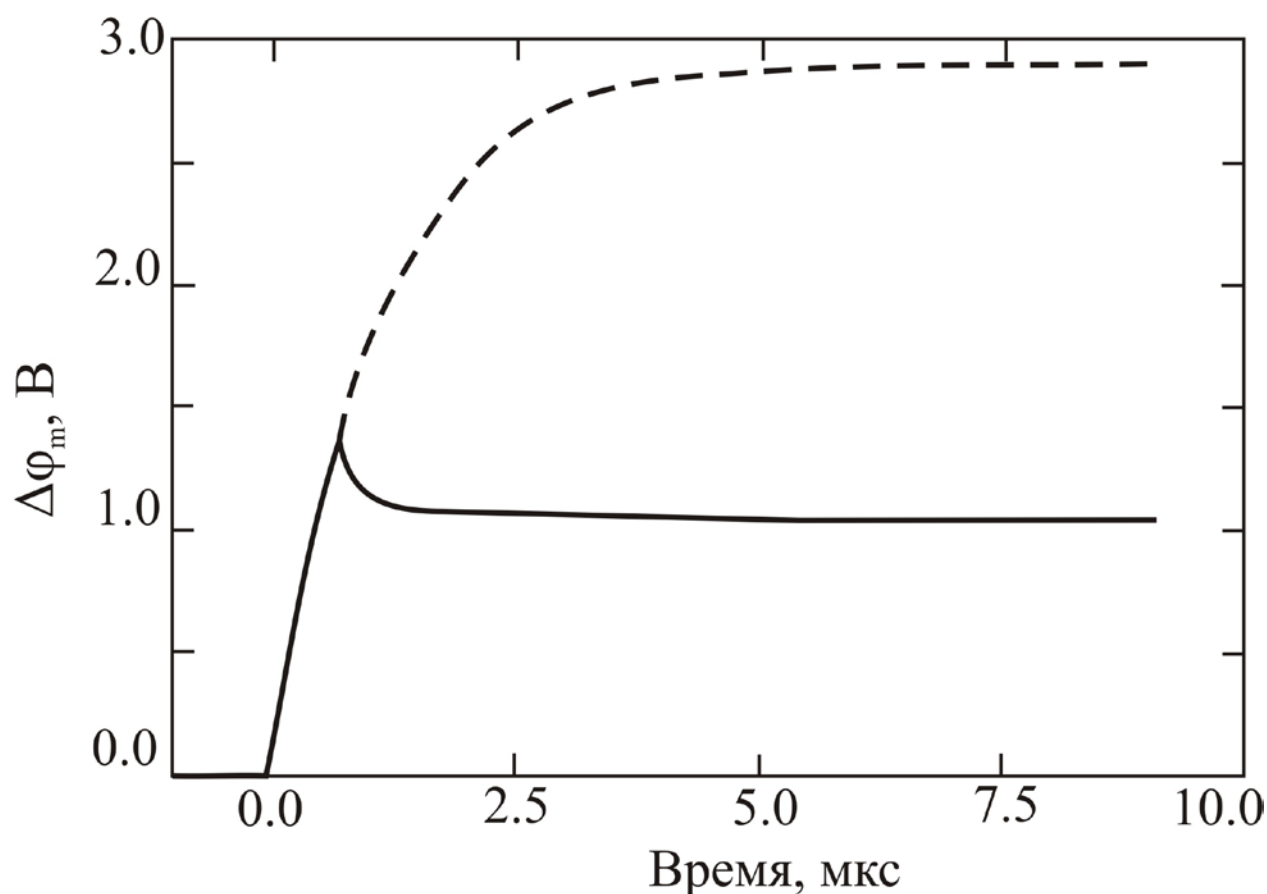


Рис. 1.1. Изменение трансмембранного потенциала на полюсе сферической клетки со временем при экспозиции во внешнем электрической поле с напряженностью $\vec{E}_{out} = 400$ кВ/м. Пунктирная кривая – зависимость, рассчитанная по (1.5), сплошная линия – экспериментальные данные [107].

При больших напряженностях внешнего электрического поля E_{out} распределение трансмембранного потенциала вдоль поверхности мембраны также отклоняется от косинусоидальной зависимости (1.6). Оно уплощается в

полярных областях на уровне $\Delta\varphi_m \approx 1$ В (рис. 1.2). Из литературы известно, что трансмембранный потенциал неэлектропорированной клетки имеет косинусоидальное распределение (пунктирная линия), а по экспериментальным данным распределение трансмембранного потенциала вдоль профиля клетки уплощено в полярных областях (сплошная линия) [107].

Когда в процессе электропорации размер поры чересчур увеличивается, через нее начинает течь большой трансмембранный ток, вследствие чего приложенный к поре перепад напряжения падает.

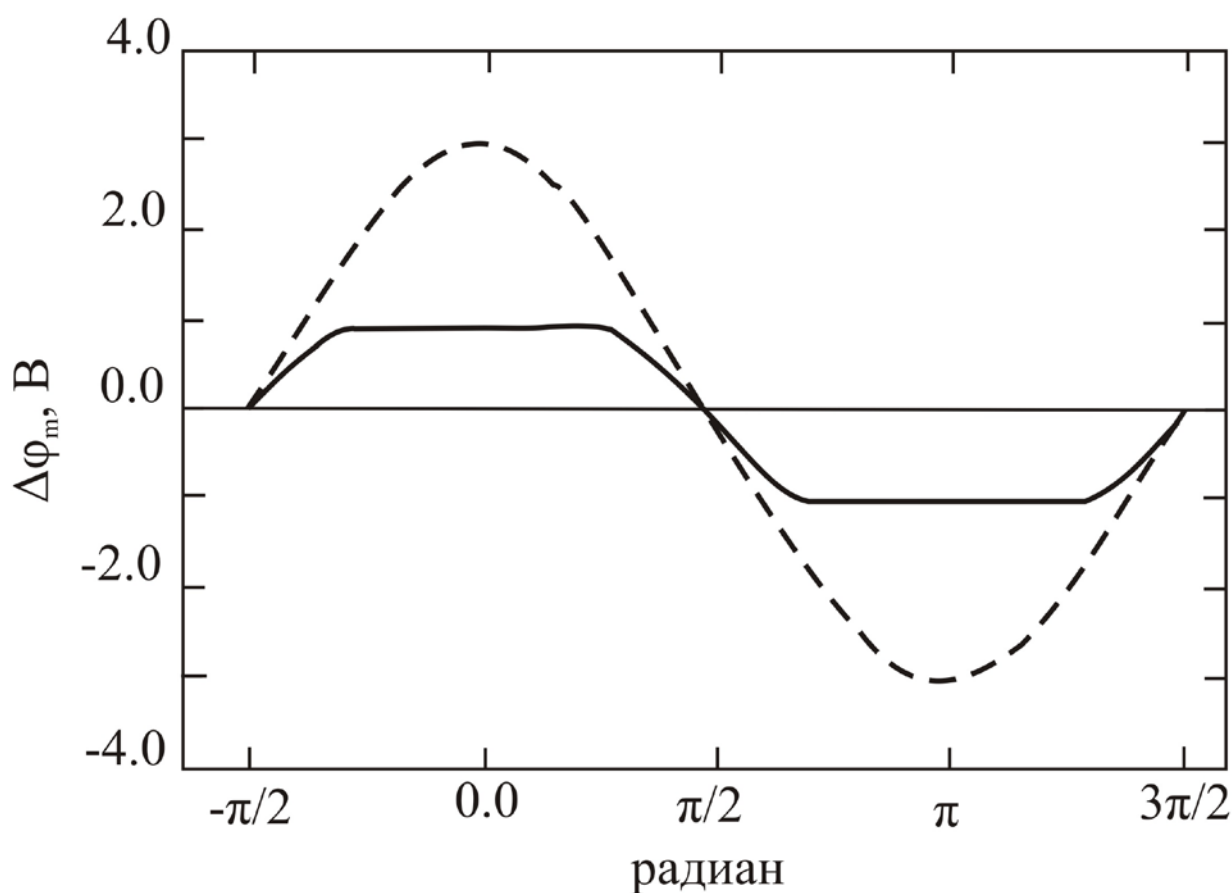


Рис. 1.2. Распределение трансмембранного потенциала $\Delta\varphi_m$ вдоль профиля клетки сразу после действия прямоугольного импульса электрического поля с напряжением 4 кВ/м и продолжительностью 1 миллисекунда [107].

При этом размер поры, который зависит от приложенного к поре перепада напряжения, уменьшается и параллельно с этим уменьшаются размер и электропроводность поры. Из-за сужения поры шунтирующий трансмембранный потенциал ток уменьшается, перепад напряжения на поре растёт, и размер поры снова увеличивается. В результате возникают флуктуации размера поры и вызванные этим эффектом флуктуации текущего через пору тока и значение мембранного потенциала некоторое время удерживается в окрестности определенного стационарного размера поры. Knisley наблюдал подобный эффект при изучении процесса электропорации миоцитов кролика [108]. Повреждение искусственных бислойных липидных мембран и естественных клеточных мембран наблюдалось при величинах трансмембранного электрического потенциала в диапазоне 150–600 мВ и более при длительности его действия от нескольких микросекунд до нескольких миллисекунд [10, 41, 84, 109]. При этом напряженность электрического поля в мембране, толщина которой равна 5 нм, достигает значений порядка 10^5 кВ/м. Хотя процесс образования пор в мембране под действием внешнего электрического поля является вероятностным, многие исследователи выявили существование определенной «критической величины» $\Delta\varphi_m$, при которой возникает заметная электропорация клеточной мембраны. По данным разных авторов эта величина изменяется в области от 250 мВ до 1 В и зависит от длительности экспозиции клеток в электрическом поле, от экспериментальных условий и типа клеток [15, 20, 110, 111]. Более того, как показывают эксперименты, эта величина может значительно изменяться даже для клеток одного типа [112]. Как правило, более длительный импульс приводит к большей электропорации мембраны [82, 88, 113].

Из экспериментальных данных Kinosita с соавт. [19, 20] следует оценка, согласно которой доля мембранной поверхности, занятой порами, находится в пределах от 10^{-4} до 10^{-3} , что согласуется и с другими экспериментальными данными [114, 115].

До 1990-х годов концепция образования мембранных пор под действием

электрического поля оставалась, главным образом, теоретической гипотезой. Однако, после серии экспериментальных работ [20], в которых методом электронной микроскопии (быстрое замораживание – скалывание) мембранные поры, возникающие в результате электрического пробоя мембран эритроцитов человека, наблюдались визуально (рис. 1.3), указанная гипотеза стала общепризнанным фактом.

Использованный в [20] комбинированный метод криофиксации и замораживания – скалывания позволил зарегистрировать изменения в структуре мембраны с временным разрешением порядка 1 мс и исследовать динамику образования и закрытия мембранных пор.

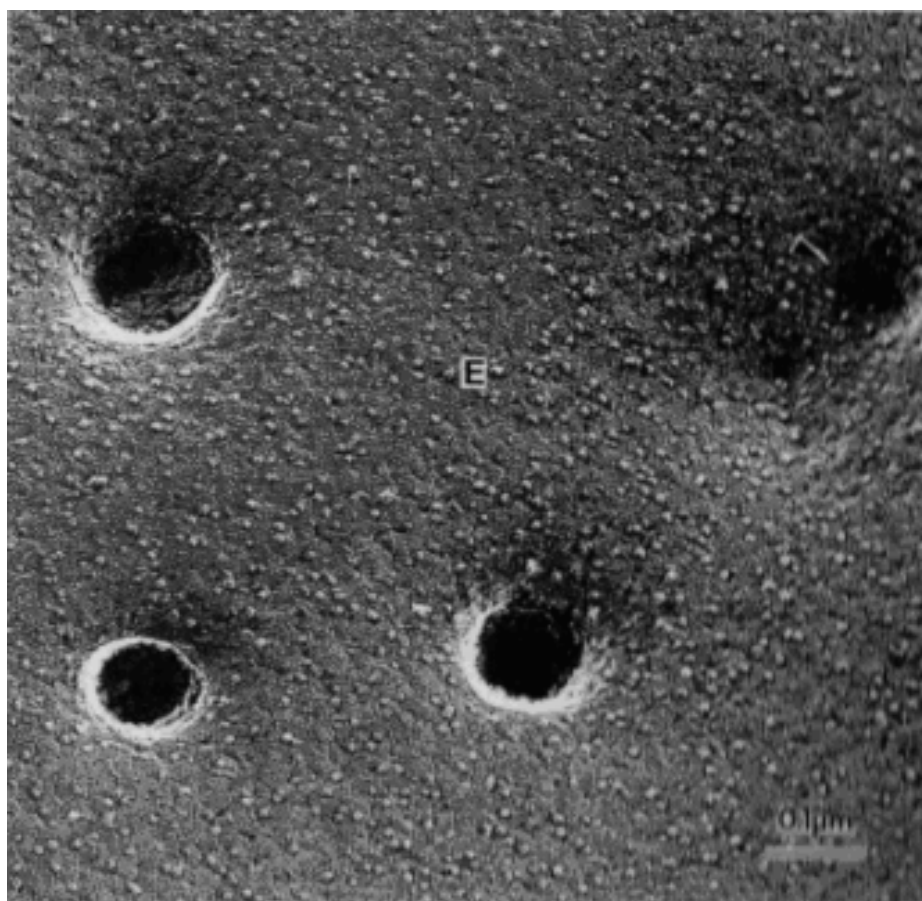


Рис. 1.3. Увеличенное изображение порообразных структур на внешней поверхности эритроцита [20].

В экспериментальной работе Kinosita [19] определен трансмембранный потенциал, который возникает при действии внешнего электрического поля на

клеточной мембране яйцеклеток морского ежа. Визуализация распределения трансмембранного потенциала $\Delta\varphi_m$ вдоль поверхности мембраны осуществлялась при помощи потенциалзависимого флуоресцирующего красителя, который связывается с мембраной. В указанной работе использовался краситель RH292, интенсивность флуоресценции которого растет при положительном $\Delta\varphi_m$ и уменьшается при отрицательном $\Delta\varphi_m$. В отсутствие внешнего поля наблюдалась однородная интенсивность флуоресценции. При действии импульса электрического поля интенсивность флуоресценции за 2 мкс повышалась на стороне мембраны, обращенной к положительному электроду, в то время как на стороне, обращенной к отрицательному электроду, она уменьшалась. В соответствии с (1.5) во внешнем поле с напряженностью $E_{out} = 10^4$ В/м максимальная величина $\Delta\varphi_m$ равна 0,75 В при $r_c = 50$ мкм. При $C_m \approx 10^{-2}$ Ф/м², $r_{in} \approx 2$ Ом·м и $r_{out} \approx 0,2$ Ом·м имеем $\tau_m \approx 1$ мкс. Трансмембранный потенциал $\Delta\varphi_m$, экспериментально определенный по интенсивности флуоресценции, действительно достигал такой величины, по крайней мере, за 10 мкс. Мембрана сферической клетки во внешнем электрическом поле поляризуется так, что максимальное и минимальное значения трансмембранного потенциала возникают на полюсах клетки, а трансмембранный потенциал на экваторе равен потенциалу покоя [101]. Kinosita et. al. [20] определили электропроводность мембраны вдоль профиля клетки. Она достигает наибольшего значения у полюсов клетки, а наименьшего значения – у ее экватора.

В принципе, стенки мембранной поры могут быть образованы либо углеводородными хвостами липидов (гидрофобные поры), либо полярными головками переориентированных липидных молекул (гидрофильные поры). Для относительно больших радиусов пор ($> 0,5$ нм) свободная энергия гидрофильной поры значительно меньше, чем энергия гидрофобной поры, то есть в соответствии с термодинамическим принципом минимума свободной энергии [116], существование гидрофильной поры энергетически более

выгодно по сравнению с гидрофобной порой [35]. Имеются экспериментальные данные, показывающие, что большие поры, которые приводят к разрыву липидного бислоя при его электрическом пробое, гидрофильны. Одним из доводов в пользу того, что проводимость клеточной мембраны определяется гидрофильными, а не гидрофобными порами, приведена в работе Глазера [35], в которой показано, что добавление во внеклеточную среду фосфатидилхолина приводит к увеличению электропроводности мембран в несколько раз. Молекулы фосфатидилхолина имеют большую положительную кривизну, то есть большую гидрофильную головку и сравнительно небольшой гидрофобный хвост. Поэтому включение указанного фосфолипида в кромку поры, которая также имеет большую положительную кривизну, энергетически выгодно и уменьшает энергетический барьер, который необходимо преодолеть для образования и роста гидрофильной поры. Этот эффект предсказан теоретически в работах [117, 118].

Эксперименты показывают [20], что проницаемость мембраны, в которой образовались поры, для ионов на верхнем и нижнем полюсах мембраны не одинакова. Это объясняется тем, что на одном из полюсов мембранный потенциал покоя суммируется с потенциалом, который индуцирует внешнее электрическое поле, а на противоположном полюсе – вычитается.

Процесс электропорации в значительной мере зависит от липидного состава мембраны. Кроме того, наличие у клетки гликокаликса и цитоскелета также модулирует ответ клетки на действие электрического импульса. Так, например, показано, что гликокаликс повышает, а натяжение цитоскелета уменьшает вероятность электропорации мембраны эритроцита человека.

Экспериментально установлено, что проницаемость мембраны имеет максимальное значение, когда одна половина липидов находится в транс-конформации, а другая половина – в цис – конформации, то есть при температуре фазового перехода липидов из жидкокристаллического в твердое гелеобразное состояние [76].

В конце 1990-х годов в результате чрезвычайно точных измерений

электропроводности БЛМ было зарегистрировано появление единичных пор, которые возникают в этих мембранах вследствие электрического пробоя [7, 53, 119].

Совокупность накопленных к настоящему времени экспериментальных данных показывает, что наиболее вероятным местом, с которого начинает развиваться электрический пробой мембраны, являются не интегральные белки, не зона контакта между белками и липидами, а непосредственно липидный компонент мембраны [12, 115].

По данным работы [107] состав внеклеточной среды и концентрация ионов в ней влияют на плотность распределения пор при электропорации брюшных клеток морской свинки. Результаты экспериментов с клетками миеломы мышей и крыс в разных солевых растворах [120], яиц морского ежа в морской воде [106, 121] и овариальных клеток яичника китайского хомячка в калиевых буферных растворах [122] не выявили значительного влияния ионной силы и состава солевого раствора на процесс электропорации, тогда как другие исследователи сообщили о значительном влиянии этих параметров на локальный захват меченых молекул (в слабосолевой среде в гиперполяризованной области клеток, а в концентрированных растворах солей – в деполяризованной области клеток). Kinosita с соавторами [19, 20, 90] наблюдали сложно зависящий от времени захват ионов кальция на обоих полюсах клетки, но захват этих ионов был большим в деполяризованной области. Этот результат находится в противоречии с результатами модельных экспериментов [107].

Показано, что площадь мембраны, на которой образуются поры, больше на полюсе, обращенном к положительному, а степень пермеабиллизации больше на полюсе, обращенном к отрицательному электроду. Поэтому больше молекул способно попасть в клетку при ее электрическом пробое на обращенной к отрицательному электроду части мембраны [115, 123]. Действительно, эксперименты показывают [91], что проницаемость мембраны для ионов, в которой образовались поры, в верхнем и нижнем полюсах мембраны не совсем

одинакова. Это объясняется тем, что на одном из полюсов физиологический мембранный потенциал (потенциал покоя) суммируется с потенциалом, индуцированным внешним электрическим полем, а на противоположном полюсе – вычитается.

Общей чертой электропорации является тот факт, что в мембранах клеток с меньшим радиусом образование пор происходит при более сильном внешнем электрическом поле (см. уравнение (1.5)). Поэтому величина мембранного потенциала, вызывающая пробой мембран для клеток млекопитающих, как правило, меньше, чем для бактерий. Вследствие этого же эффекта митохондрии и другие внутриклеточные органеллы могут избежать электрического пробоя при напряженности внешнего электрического поля, достаточной для пробоя клеточной мембраны. Однако в ряде экспериментов показано, что очень короткие импульсы (< 1 мкс) большой амплитуды могут повредить клеточные органеллы и при этом клеточная мембрана не повреждается. Возможно, это обусловлено тем, что при очень коротких импульсах клеточная мембрана не успевает зарядиться до значения, предсказываемого равенством (1.5) [113, 124, 125]. Если имеется гетерогенная по размерам популяция клеток (например, клетки асцитной карциномы Эрлиха), трудно добиться электропорации всех клеток одновременно без их значительной гибели. Экспериментальные исследования в этом направлении пока что отсутствуют.

В работе [114] приведены аргументы в пользу того, что при существовании одной поры второй поре выгодно образоваться в месте, наиболее удаленном от первой поры. Поэтому образование нескольких пор не могут рассматриваться как совершенно независимые события. Поры не только имеют тенденцию образовываться далеко друг от друга, но, более того, в плоской БЛМ поры мигрируют друг от друга. Это связано с тем, что образование одной поры приводит к появлению касательной к поверхности мембраны составляющей градиента поля. С учетом этой составляющей поперечная сила, действующая на стенку поры со стороны, более удаленной от соседней поры, превышает силу, действующую на стенку поры со

стороны, более близкой к первой поре. В искривленной мембране эффект результирующей тангенциальной компоненты поля приводит к миграции пор в область больших $\Delta\varphi_m$. Качественно, это может приводить к контакту пор в области полярных шапочек и к контакту между порами, что, в свою очередь, может приводить к коалесценции пор [126].

Было предложено несколько теорий электрического пробоя, из которых мы остановимся только на теории Ю. А. Чизмаджева с соавт., изложенной в серии работ [127–133], поскольку она представляется нам наиболее обоснованной. Эта теории опирается на расчет изменения свободной энергии мембраны клетки, на которую действует внешнее постоянное однородное электрическое поле, при образовании в липидном бислое мембранной поры с радиусом a . Пору считается гидрофильной и имеющей цилиндрическую форму.

Образование круглой поры в мембране увеличивает свободную энергию мембраны на величину $\Delta F_1 = 2\pi ah\gamma$, что связано с необходимостью затратить работу на образование границы раздела фаз между водным раствором, заполняющим пору, и липидно – белковой стенкой поры. Эта работа пропорциональна произведению радиуса поры a и толщины мембраны h . Коэффициент пропорциональности γ – удельная свободная энергия (на единицу площади) стенки поры. Величина этого коэффициента для разных биологических мембран изменяется в пределах от 3×10^{-5} Н/м до 3×10^{-3} Н/м [134]. Теоретическая оценка свободной энергии единицы длины кромки поры дана в работе [135]. Изменение электростатической составляющей свободной энергии мембраны за счет увеличения радиуса поры определяется как изменение свободной энергии плоского (поскольку выполняется условие $a \ll r_o$) конденсатора при замене его липиднобелковой прокладки (с диэлектрической проницаемостью ε_m ,) на водный раствор (с диэлектрической

проницаемостью ε_w), заполняющий образовавшуюся пору. Это изменение задается равенством [35, 127, 136, 137]

$$\Delta F_e = -\frac{1}{2} \Delta C_m \Delta \varphi_m^2$$

где $\Delta C_m = -\frac{\pi a^2}{h} \varepsilon_0 \varepsilon_m \left(\frac{\varepsilon_w}{\varepsilon_m} - 1 \right)$, $\Delta \varphi_m$ – мембранный потенциал в точке образования поры, h – толщина клеточной мембраны, ε_0 – диэлектрическая постоянная, равная $\varepsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12}$ Кл²/м²·Н. Так как диэлектрическая проницаемость водных вне- и внутриклеточного растворов слабо зависит от их состава и определяется, в основном, поляризацией растворов за счет изменения ориентации молекул воды в электрическом поле, $\varepsilon_w \approx 80$. Диэлектрическая проницаемость липидного бислоя, как известно, равна $\varepsilon_m \approx 2$. Искомое изменение свободной энергии рассматриваемой системы при образовании на мембране круглой поры радиуса a равно

$$\Delta F_e = -\frac{1}{2} \frac{\pi a^2}{h} \varepsilon_0 \varepsilon_m \left(\frac{\varepsilon_w}{\varepsilon_m} - 1 \right) \Delta \varphi_m^2$$

Суммарное изменение свободной энергии мембраны при образовании в ней поры с радиусом a за счет поверхностной и электростатической составляющих равно

$$\Delta F(a) = \Delta F_1 + \Delta F_e = 2\pi h \gamma a - \frac{1}{2} \frac{\pi a^2}{h} \varepsilon_0 \varepsilon_m \left(\frac{\varepsilon_w}{\varepsilon_m} - 1 \right) \Delta \varphi_m^2 \quad (1.7)$$

Зависимость (1.7) представлена на рис. 1.4. График зависимости свободной энергии мембраны от радиуса поры имеет максимум при

$$a_c = \frac{2\gamma h^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_m \left(\frac{\varepsilon_w}{\varepsilon_m} - 1 \right) \Delta \varphi_m^2} \quad (1.8)$$

Очевидно, поры, радиус которых удовлетворяет неравенству $a < a_c$, в силу термодинамического принципа минимума свободной энергии [116] имеют тенденцию к исчезновению, а поры с радиусом $a > a_c$, превышающим критический размер a_c , будут необратимо увеличиваться, приводя в конечном итоге к разрыву мембраны.

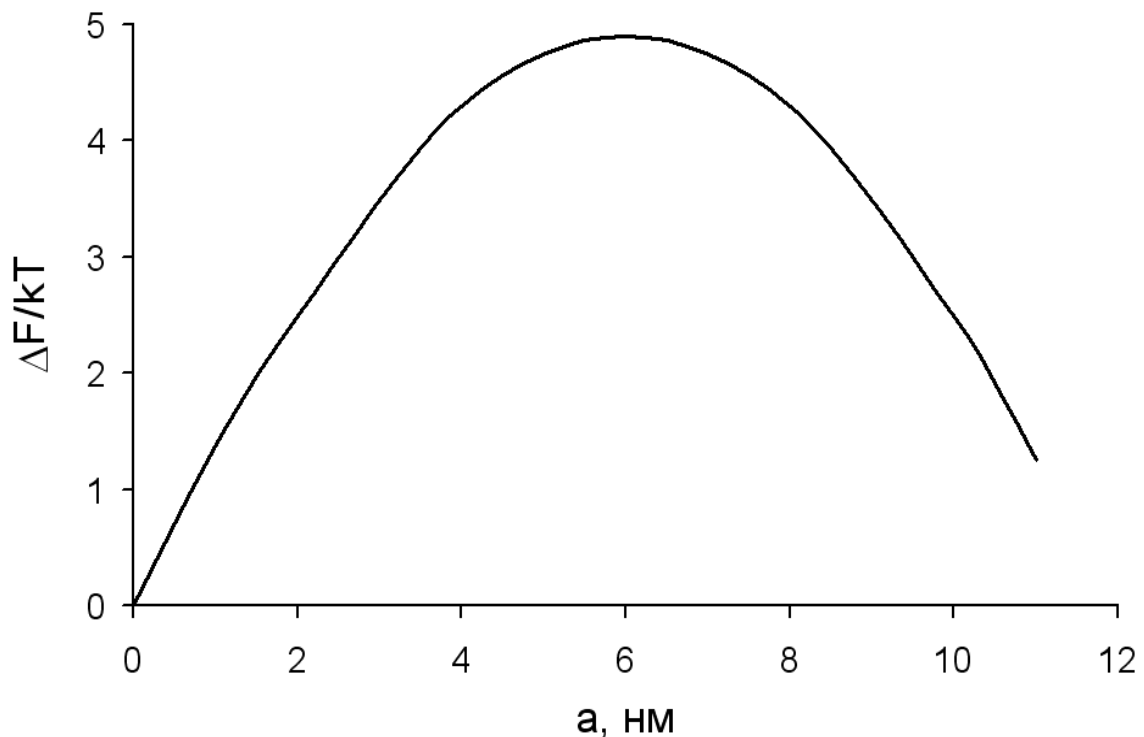


Рис. 1.4. Зависимость изменения свободной энергии мембраны (в единицах энергии теплового движения kT) от радиуса мембранной поры a при значении мембранного потенциала $\Delta \varphi_m = 50$ мВ; $\gamma h = 1 \times 10^{-12}$ Н.

Как следует из (1.8) увеличение трансмембранной разности электрического потенциала $\Delta\varphi_m$ приводит [18] к уменьшению критического радиуса поры. Легко вычислить высоту энергетического барьера, который должна преодолеть рассматриваемая система для образования поры с критическим радиусом. Высота этого энергетического барьера равна

$$\Delta F^* = \frac{4\pi\gamma^2 h^3}{\varepsilon_0 \varepsilon_m \left(\frac{\varepsilon_w}{\varepsilon_m} - 1 \right) \Delta\varphi_m^2}. \quad (1.9)$$

Как следует из (1.9), увеличение трансмембранной разности электрического потенциала $\Delta\varphi_m$ приводит к снижению высоты энергетического барьера ΔF^* , который за счет тепловых флуктуаций должна преодолеть мембрана для образования в ней поры с критическим радиусом.

В соответствии с теорией процессов активационного типа [138–140] среднее время $\langle t_p \rangle$ образования поры критического размера в мембране клетки, мембранный потенциал которой равен $\Delta\varphi_m$, определяется решением второго уравнения Понtryгина [141].

$$\frac{d^2}{da^2} \langle t_p \rangle - \frac{1}{kT} \frac{d\Delta F^*}{da} \frac{d}{da} \langle t_p \rangle + \frac{1}{D} = 0 \quad (1.10)$$

где a – радиус мембранной поры, k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, D – коэффициент диффузии по размеру поры. Изменение свободной энергии мембраны $\Delta F(a)$ при образовании в ней мембранной поры с радиусом a определено равенством (1.7).

Решение (1.10) с граничными условиями $\frac{d}{da}\langle t_p \rangle = 0$ при $a = 0$ и $\langle t_p \rangle = 0$ при $a = a_c$ есть

$$\langle t_p \rangle = \frac{(kT)^2}{2\pi^{\frac{3}{2}}\gamma^2 h^2 D(0)} \left(\frac{\Delta F^*}{kT} \right)^{\frac{1}{2}} \exp\left(\frac{\Delta F^*}{kT} \right)$$

С учетом (1.9) эта зависимость принимает вид

$$\begin{aligned} \langle t_p \rangle = & \frac{(kT)^2}{2\pi^{\frac{3}{2}}\gamma^2 h^2 D(0)} \left(\frac{4\pi\gamma^2 h^3}{\varepsilon_0 kT (\varepsilon_w - \varepsilon_m) (\Delta\varphi_m)^2} \right)^{\frac{1}{2}} \times \\ & \times \exp \left[\left(\frac{4\pi\gamma^2 h^3}{\varepsilon_0 kT (\varepsilon_w - \varepsilon_m) (\Delta\varphi_m)^2} \right) \right] \end{aligned} \quad (1.11)$$

По истечении промежутка времени $2\langle t_p \rangle$ мембрана необратимо повреждается, поскольку ее свободная энергия при $a > a_c$ монотонно уменьшается с увеличением радиуса поры. Величина γ для разных биологических мембран изменяется в пределах от 3×10^{-5} Н/м до 3×10^{-3} Н/м [134]. В работе Barnett и Weaver принято $D(0) = 5 \times 10^{-14}$ м²/с [142], в работе [137] Powell и Weaver, $D(0) = 1 \times 10^{-12}$ м²/с.

Для биологических мембран $h \approx 5 \times 10^{-9}$ м, $\varepsilon_m \approx 2$. Учитывая, что $\varepsilon_0 \cong 8,854 \times 10^{-12}$ Кл²/м²·Н, $\varepsilon_m \approx 80$, $k \cong 1,38 \times 10^{-23}$ Дж/К, и полагая $\gamma h = 1 \times 10^{-12}$ Н, $D(0) = 1 \times 10^{-18}$ м²/с при $T = 273,15$ К из (1.11), получаем зависимость между амплитудой $\Delta\varphi_m$ и длительностью прямоугольного трансмембранного

электрического импульса, который вызывает электропорацию мембраны (рис. 1.5).

Основной особенностью этой зависимости является то, что разрыв мембраны возникает не только при больших мембранных потенциалах, но даже при сравнительно небольших потенциалах, если они действуют на мембрану достаточно длительный промежуток времени [20, 98].

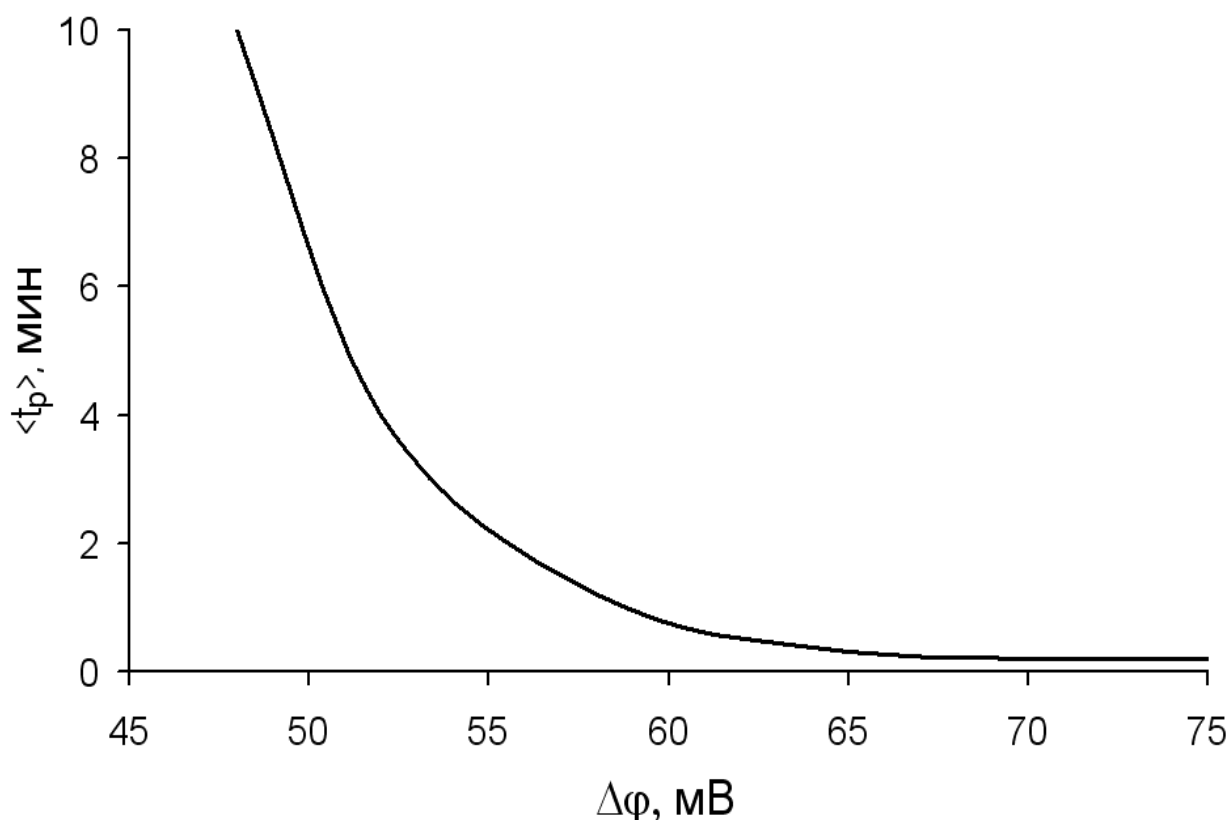


Рис. 1.5. Вычисленная по уравнению (1.9) зависимость времени $\langle t_p \rangle$ (в минутах), за которое возникает электрический пробой мембраны, от перепада электрического потенциала (в милливольтках) на клеточной мембране при следующих параметрах $\gamma\hbar = 1 \times 10^{-12}$ Н, $D(0) = 1 \times 10^{-18}$ м²/с, $T = 273,15$ К.

Некоторые ученые считают, что электрический пробой мембран является универсальным механизмом нарушения их барьерной функции при различных патологиях или стрессовых состояниях живой клетки [13, 73]. При этом пробой мембраны осуществляется не в результате воздействия на нее внешнего

электрического поля, а собственным мембранным потенциалом. Диэлектрическая проницаемость липидного бислоя уменьшается, например, вследствие перекисного окисления мембранных липидов. При этом в соответствии с (1.8) и (1.9) уменьшаются критический радиус поры a_c и энергетический барьер ΔF^* , то есть понижается устойчивость мембраны к ее электрическому пробую. При этом в соответствии с (1.8) и (1.9) уменьшаются критический радиус поры a_c и энергетический барьер ΔF^* , то есть понижается устойчивость мембраны к ее электрическому пробую.

В отсутствие внешнего электрического поля критический радиус пор в жидкокристаллической мембране достигает значения порядка толщины мембраны, вследствие чего вероятность ее разрыва при физиологических условиях очень мала [35]. Однако любое физическое или химическое воздействие, которое влияет на поверхностное натяжение липидного бислоя может нарушить стабильность мембраны, которая первоначально содержит поры докритического размера. Как показано в работе [76], фазовый переход липидных бислоев из жидкокристаллического в твердое гелеобразное состояние при охлаждении клеток сопровождается увеличением их изотропного натяжения и тем самым способствует электропорации мембраны. Действительно, при фазовом переходе липидов из жидкого в твердое состояние площадь поверхности мембраны уменьшается на несколько процентов, в результате чего в жидких участках мембраны, сосуществующих с участками твердой фазы, возникает натяжение, которое способствует разрыву мембраны. Так, коэффициент линейного натяжения кромки поры γ_h при замораживании бислоев из гидрированного яичного лецитина возрастает от значения $11,1 \times 10^{-3}$ до $5,6 \times 10^{-3}$ Н/м, что способствует электропорации клеточной мембраны [76].

Как известно, в процессе низкотемпературного консервирования биологических объектов на клетки действуют физико – химические факторы (перекисное окисление мембранных липидов [143, 144], фазовый переход мембраны из жидкокристаллического в твердое гелеобразное состояние [145],

нарушение ионного гомеостаза клеток), которые могут способствовать электропорации биомембран собственным мембранным потенциалом даже в отсутствие внешнего электрического поля. Можно предположить, что электрический пробой клеточных мембран является одним из механизмов повреждения клеток при низкотемпературном консервировании клеточных суспензий.

Общие соображения о возможности криповреждения клеток сильным электрическим полем, которое возникает в процессе замораживания биообъектов при растрескивании твердой фазы в области субэвтектических температур высказывались в работе Де Гроот [146].

В статье Toner [8] с помощью простой термодинамической модели количественно описано изменение трансмембранного потенциала и содержания воды в клетке при замораживании ооцитов мыши в изотоническом буферном солевом растворе. Авторы этой модели учитывают только процесс переноса молекул воды между клетками и окружающей их средой, который происходит при замораживании клеточной суспензии, пренебрегая трансмембранным переносом других растворенных в ней веществ. В приближении линейной неравновесной термодинамики трансмембранный перенос в этом случае описывается простым уравнением

$$\frac{d}{dt}V = v_w \frac{d}{dt}N_w^{in} = -SL_p \frac{RT}{v_w} \ln\left(\frac{c_w^{out}}{c_w^{in}}\right) \quad (1.12)$$

где V — объем клетки, v_w — молярный объем воды, N_w^{in} — количество молей воды во внутриклеточном растворе, S — площадь поверхности клеточной мембраны, L_p — коэффициент фильтрации клеточной мембраны, который связан с коэффициентом проницаемости мембраны для молекул воды равенством $p_w = L_p \frac{RT}{v_w}$, R — универсальная газовая постоянная, T —

абсолютная температура, C_w^{out} и C_w^{in} – концентрация воды вне и внутри клетки соответственно.

Связь изменяющейся в процессе замораживания клеточной суспензии концентрации воды в окружающем клетки растворе с температурой определялась по соотношению Гиббса – Гельмгольца

$$\frac{d}{dT} \ln c_w^{out} = \frac{q}{RT^2},$$

где q – скрытая теплота плавления воды, которая в рамках рассматриваемой модели считается постоянной величиной. Интегрирование этого простого дифференциального уравнения дает искомую связь:

$$\ln c_w^{out} = \frac{q}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right), \quad (1.13)$$

где T_0 – равновесная температура кристаллизации воды (273,15 K).

Концентрация (мольная доля) внутриклеточной воды C_w^{in} в работе [8] приближенно определялась как

$$C_w^{in} = \frac{N_w^{in}}{N_w^{in} + N_s^{in}} = \frac{\frac{V - V_n}{V_w}}{\frac{V - V_n}{V_w} + N_s^{in}}, \quad (1.14)$$

где N_s^{in} – суммарное количество растворенных во внутриклеточном растворе молекул и ионов, V_n – суммарный объем растворенных внутри клетки веществ.

Считается, что зависимость коэффициента проницаемости клеточных мембран для молекул воды от температуры удовлетворяет закону Аррениуса

$$p_w = p_{w_0} \exp \left[-\frac{U_w}{RT} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right], \quad (1.15)$$

где p_{w_0} – коэффициент проницаемости мембраны для молекул воды при температуре T_0 , U_w – энергия активации процесса трансмембранного переноса воды.

Для вычисления изменения мембранного потенциала в процессе замораживания клеток в работе Toner [8] использовалось полученное в приближении постоянного поля уравнение Гольдмана – Ходжкина – Катца [139]:

$$\Delta\varphi_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{p_K [K^+]^{out} + p_{Na} [Na^+]^{out} + p_{Cl} [Cl^-]^{in}}{p_K [K^+]^{in} + p_{Na} [Na^+]^{in} + p_{Cl} [Cl^-]^{out}} \quad (1.16)$$

где F – число Фарадея, p_K , p_{Na} , p_{Cl} – коэффициенты проницаемости клеточной мембраны для ионов калия, натрия и хлора соответственно, $[K^+]^{out}$, $[Na^+]^{out}$, $[Cl^-]^{out}$ – концентрации соответствующих ионов во внеклеточном растворе, $[K^+]^{in}$, $[Na^+]^{in}$, $[Cl^-]^{in}$ – концентрации соответствующих ионов во внутриклеточном растворе.

Из уравнения 1.16 видно, что как гиперконцентрация внеклеточного раствора в процессе замораживания, так и дегидратация – регидратация клеток должны приводить к изменению мембранного потенциала. Поэтому можно

предположить, что при определенных условиях это может способствовать электрическому пробоя клеточных мембран [3, 135].

Решение уравнения (1.12) с учетом равенств (1.13) – (1.16) описывает изменение трансмембранного потенциала и содержания воды в клетке при замораживании ооцитов мыши в изотоническом буферном растворе. В результате компьютерного моделирования авторы этой работы показали, что в начале замораживания происходит быстрый рост кристаллов льда во внеклеточном растворе, который вызывает резкое (до -90 мВ) увеличение мембранного потенциала. Однако возможность электрического пробоя клеток при этом авторы указанной статьи не рассматривали.

Анализ литературных данных подтверждает, что теоретическое и экспериментальное изучение электрического пробоя клеточных мембран является актуальным и перспективным для решения общебиологических проблем и создания новых биомедицинских технологий, а также для понимания связанных с электропорацией механизмов повреждения клеток в процессе их низкотемпературного консервирования и способов предотвращения этих повреждений. В настоящее время созданы предпосылки для более углубленных, чем представленные в литературе, количественных исследований, направленных на выяснение роли электрического пробоя клеток в повреждении клеток при их криоконсервировании и для разработки связанных с ним критериев оптимальности режимов их замораживания.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Физико-математическое моделирование процессов трансмембранного переноса веществ при замораживании клеток

Для достижения поставленной цели в работе использовали следующие методы теоретической физики и математические методы. Для теоретического анализа явления электрического пробоя клеточных мембран, индуцированного приложенным к исследуемой клеточной суспензии внешним электрическим полем и собственным мембранным потенциалом, в качестве одного из основных методических принципов в работе применен известный в равновесной термодинамике принцип минимума свободной энергии [116]. При моделировании и анализе процессов трансмембранного переноса в процессе замораживания клеток использованы некоторые положения и принципы неравновесной термодинамики [146], электродинамики [147], теории упругих конечных деформаций [148, 149] и асимптотический метод решения сингулярно возмущенных систем [150].

Расчет временных и температурных зависимостей объема клеток, концентраций внеклеточного и внутриклеточного растворов и мембранного потенциала клеток при фазовом переходе внеклеточного раствора из жидкого в твердое состояние осуществлялся путем численного решения системы обыкновенных нелинейных дифференциальных уравнений, полученных на базе фундаментальных положений теории процессов активационного типа [138, 151]. Для решения системы дифференциальных уравнений, описывающих изменение состава вне- и внутриклеточного растворов и мембранного потенциала клеток при кристаллизации клеточной суспензии, применяли стандартный метод Рунге – Кутты четвертого порядка [152].

2.2. Получение двухклеточных эмбрионов мыши

Экспериментальные животные содержались в условиях вивария при Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

В качестве объекта экспериментальной части исследования были выбраны двухклеточные эмбрионы мыши из-за их сравнительно большого размера и почти сферической формы, что облегчает манипуляции с одиночными клетками.

Двуклеточные эмбрионы были получены от гибридных самок линии F₁(CBA×C57BI) 8–12 недельного возраста после контролируемой гиперстимуляции яичников животных. Мышей содержали при световом режиме 12 час: 12 час / ночь: день. Стимуляция суперовуляции проводилась одинаковыми дозами гонадотропных гормонов. У самок вызывали гиперстимуляцию яичников по стандартной методике [153] путем внутрибрюшинного введения гонадотропных гормонов: 5 у.е. гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) («Folligon», Нидерланды) и 7,5 у.е. человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) («Chorulon», Нидерланды) с интервалом между инъекциями 46–48 часов [153]. Для оплодотворения самок подсаживали к самцам. На следующий день проверяли наличие копулятивной пробки, что соответствовало первому дню беременности самок. Через 48 часов после введения чХГ животных забивали путем дислокации шейных позвонков. Эмбрионы на стадии двух бластомеров получали путем промывания отпрепарированных яйцеводов теплой физиологической средой Дюльбекко с добавлением 5% – фетальной телячьей сыворотки («Sigma», США) при комнатной температуре. Затем клетки трижды отмывали физиологической средой и немедленно использовали в экспериментах. В экспериментах использовали только морфологически полноценные эмбрионы, без признаков фрагментации (рис. 2.2.1).

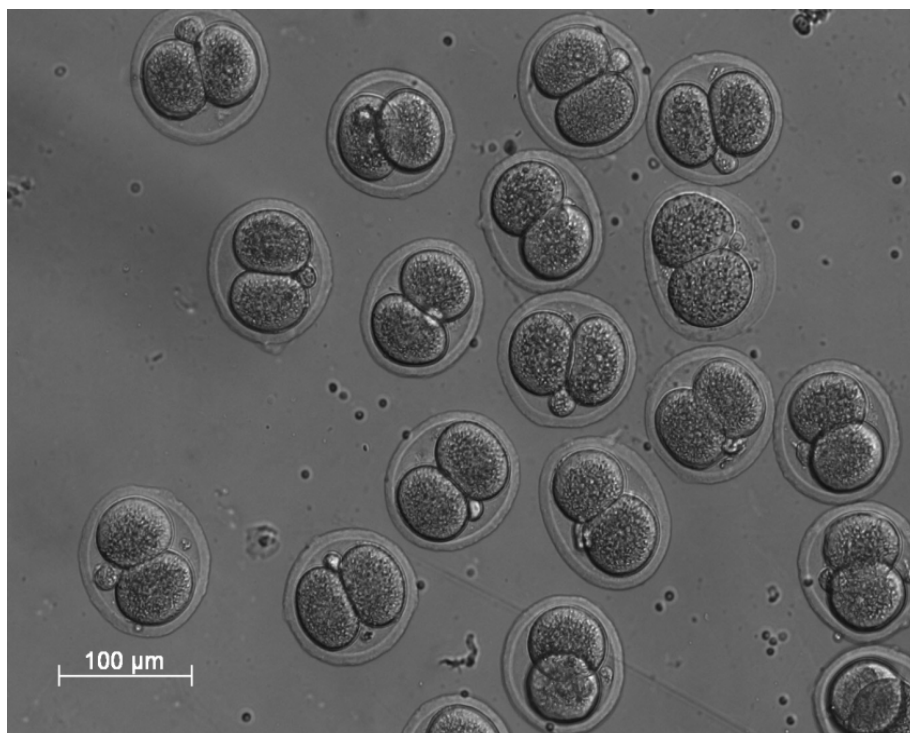


Рис. 2.2.1 Микрофотографии двухклеточных эмбрионов мышей, полученных после гормональной стимуляции животных.

Эксперименты на животных выполняли в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными I – III Национальными конгрессами по биоэтике (Киев, Украина, 2001 – 2007 гг.) и согласованными с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, Франция, 1986 г.) [154], а также под контролем Комитета по биоэтике ИПКиК НАН Украины.

2.3. Криоконсервирование двухклеточных эмбрионов мыши

В работе использовали протокол криоконсервирования методом витрификации, описанный ранее в работах [155–157]. Эмбрионы были разделены на пять групп: контрольную и четыре экспериментальных. В контрольную группу ($n = 32$) входили свежевыделенные 2-клеточные эмбрионы без признаков морфологических нарушений.

В первой серии экспериментов исследовали влияние инкубации в растворе криопротектора и среде витрификации на электрическую проводимость эмбрионов мыши. Эмбрионы I ($n = 25$) и II ($n = 28$) экспериментальных групп подвергали обработке 10%-м раствором этиленгликоля (ЭГ) в течение 5 мин, после чего переносили в среду витрификации (30% ЭГ + 0,7 М сахарозы) и выдерживали в ней 1,5 мин (I группа) и 3 мин (II группа). Затем зародыши переносили в капли раствора 0,5 М сахарозы, выдерживали 10 мин и переносили в физиологическую среду Дюльбекко для удаления криопротектора.

Во второй серии экспериментов исследовали влияние полного цикла низкотемпературного консервирования двухклеточных эмбрионов мыши на их электрическую проводимость. Эмбрионы III и IV экспериментальных групп ($n = 26$ и $n = 18$ соответственно) после предварительной эквilibрации в 10%-м растворе этиленгликоля и среде витрификации переносили (по 5 – 7 эмбрионов) в заранее подготовленные пластиковые соломинки диаметром 2 мм («Pacific Vet», Австралия), содержащие 5 мкл среды витрификации. Соломинки быстро погружали в жидкий азот и хранили 7 суток. Время экспозиции в этиленгликоль–сахарозной среде перед охлаждением для III группы составило 1,5 мин, для IV группы 3 мин. Соломинки отогревали на водяной бане (311 К). Для удаления криопротектора эмбрионы, извлеченные из соломинок, переносили в раствор сахарозы с концентрацией 0,5 М, выдерживали в нем 10 мин и затем трижды отмывали физиологической средой при комнатной температуре. Сохранность деконсервированных эмбрионов оценивали по морфологическим признакам: целостность бластомеров и прозрачность их цитоплазмы. В дальнейших экспериментах использовали эмбрионы без морфологических нарушений.

2.4. Определение электрической проводимости двухклеточных эмбрионов

Электрическую проводимость определяли методом импульсной кондуктометрии с использованием электропоратора, разработанного в Институте животноводства НААН [103]. Функциональная схема устройства показана на рис. 2.4.1.

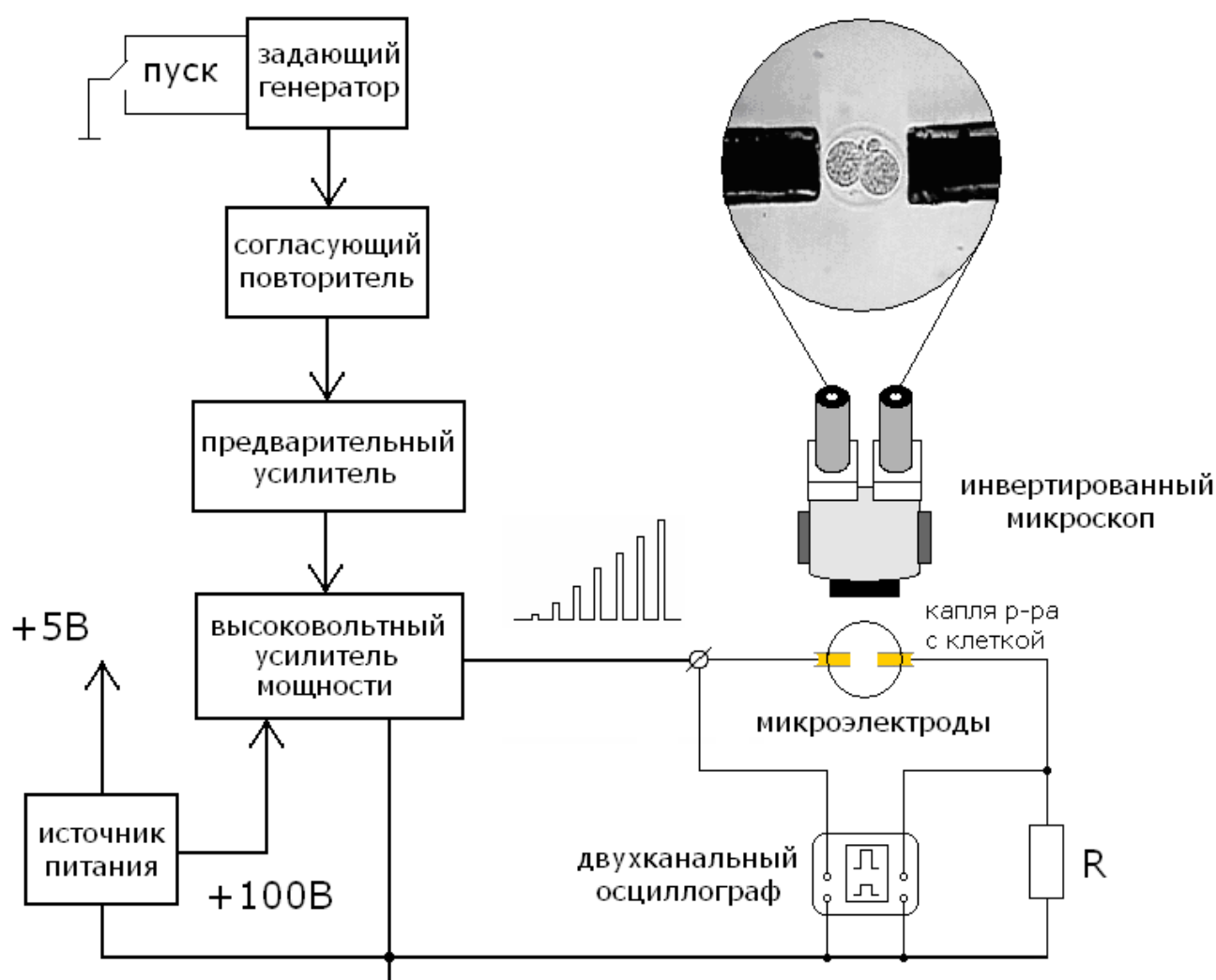


Рис. 2.4.1. Функциональная схема электропоратора.

Устройство содержит задающий генератор, который вырабатывает прямоугольный импульс заданной длительности (60 мкс), напряжение от которого подается на микроэлектроды, изготовленные из тонкой золотой нити,

запаянной в стеклянные капилляры, и последовательно соединенное с электродами калибровочное сопротивление R_R .

Каждый эмбрион перед измерением трижды отмывали в изотоническом растворе сахарозы для удаления следов солевого буфера, а затем в капле раствора сахарозы помещали между микроэлектродами так, как показано на рис. 2.4.2. Удельную проводимость определяли косвенно – путем измерения амплитуды напряжения на калиброванном резисторе, последовательно соединенном с микроэлектродами.

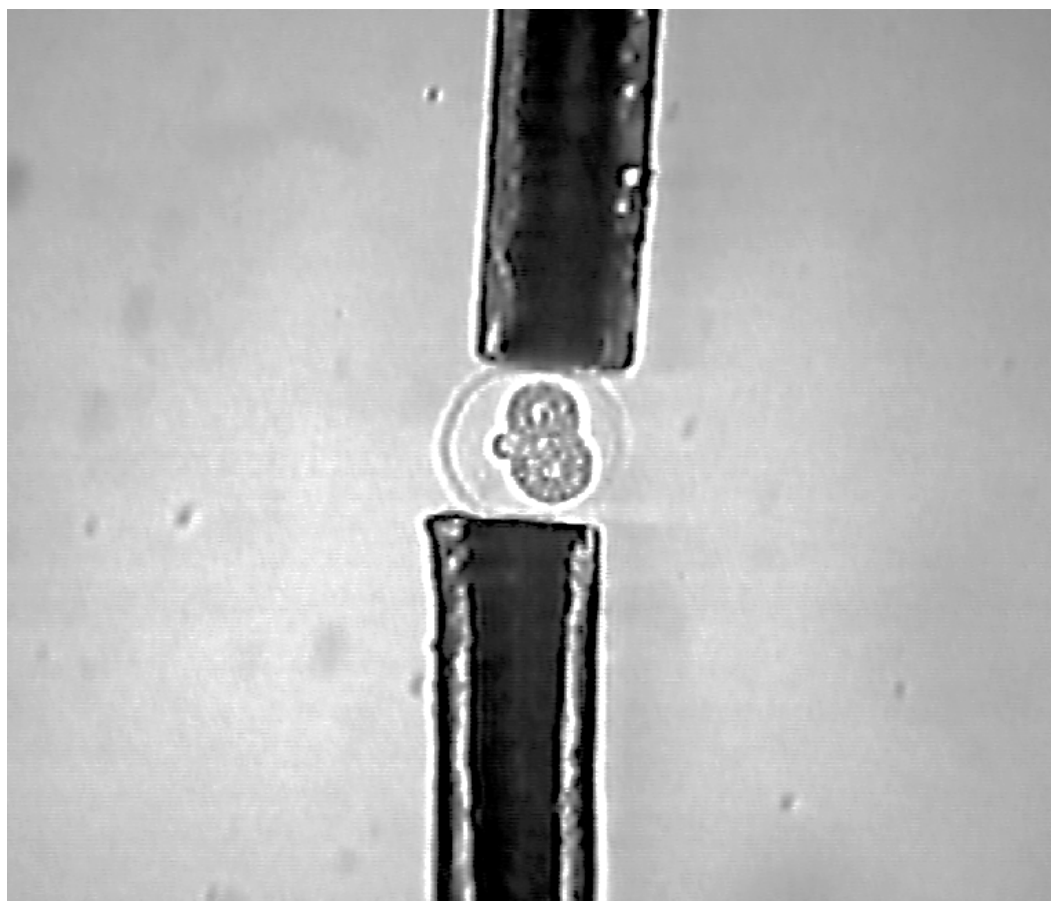


Рис. 2.4.2. Изображение двуклеточного эмбриона мыши, размещенного между микроэлектродами.

На вход устройства подавали серию прямоугольных импульсов напряжения с длительностью 60 мкс с линейно возрастающей амплитудой U_{in} и периодом следования ($\sim 10 - 15$ сек). Измеряя осциллографом скачок

амплитуды напряжения на калиброванном резисторе R_R , определяли электрическую проводимость помещенного между ними образца по алгоритму, описанному в работах [103, 158].

В соответствии со вторым законом Кирхгофа [159]

$$U_{in} = U_R + U_{el} \quad (2.4.1)$$

где U_R – скачок напряжения на калиброванном резисторе, U_{el} – амплитуда импульса напряжения, подаваемого на электроды. По первому закону Киргофа [159].

$$I_{el} = I_R, \quad (2.4.2)$$

где I_R и I_{el} – ток, протекающий через калиброванный резистор и помещенный между электродами образец, а по закону Ома

$$I_R = \frac{U_R}{R_R}; I_{el} = \frac{U_{el}}{R_{emb}} \quad (2.4.3)$$

где R_{emb} – сопротивление исследуемого образца. Комбинируя (2.4.1) с (2.4.2) и (2.4.3), получаем для проводимости исследуемого образца

$$G_{emb} = \frac{1}{R_{emb}} = \frac{U_R}{R(U_{in} - U_R)}$$

Таким образом, измеряя скачки напряжения U_R на резисторе с известным сопротивлением R_R при подаче на вход системы прямоугольного импульса с

заданной амплитудой U_{in} , получили зависимости удельной электрической проводимости отдельных двухклеточных эмбрионов от напряженности электрического поля между электродами $G_{emb} = G_{emb}(E_{el})$, где $E_{el} = \frac{U_{el}}{L}$, L – расстояние между электродами.

2.5. Химические реагенты

В качестве криозащитных веществ, а также реагентов, воздействующих на биологические объекты, использовали реактивы марки «х.ч.» или «ч.д.а.»: гонадотропин сыворотки жеребых кобыл («Folligon», Нидерланды); человеческий хорионический гонадотропин («Chorulon», Нидерланды); фетальная телячья сыворотка («Sigma», США); сахароза («Sigma», США); этиленгликоль («Реахим»); среда Дюльбекко («Sigma», США).

2.6. Приготовление растворов

Для криоконсервирования эмбрионов мыши использовались следующие растворы: 0,5 М, 0,7 М и 1 М сахарозы, приготовленные на физиологической среде Дюльбекко; 10% ЭГ, приготовленные на физиологической среде Дюльбекко; 30% ЭГ, приготовленный на 1 М растворе сахарозы. В состав среды криоконсервирования входили 30% раствор ЭГ и 0,7 М сахарозы. Криопротекторы были предоставлены отделом криопротекторов ИПКиК НАН Украины. Для определения электрической проводимости эмбрионов мыши использовали изотонический 0,3 М раствор сахарозы, приготовленный на ионизированной воде.

2.7. Методы анализа и статистической обработки результатов

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета параметрического анализа данных программы Microsoft Office Excel 2010 и методом Стьюдента для оценки достоверности различий [160]. Данные представлены в виде $M \pm SE$.

РАЗДЕЛ 3

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПРОБОЯ КЛЕТОК ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ

3.1. Физико–математическая модель трансмембранного переноса веществ и электропорации клеток при замораживании клеточной суспензии

Как известно, даже в норме клетки функционируют при таких значениях мембранного потенциала, при которых их технические аналоги разрушаются. Скорее всего, жизнедеятельность клетки в таких рискованных условиях оправдывается тем, что энергия, которую клетка запасает в виде мембранного потенциала, используется для реализации таких жизненно важных функций, как передача информации, клеточное дыхание, рецепция и механическая работа. Поскольку, в процессе низкотемпературного консервирования клеточной суспензии существенно нарушается ионный гомеостаз клеток, можно допустить, что в процессе замораживания повреждение мембран может происходить в результате их электрического пробоя. Эта гипотеза является более приемлемой с учетом современных представлений о роли электрического пробоя мембран при некрозе клеток и других патологиях [74, 76].

Эффективность физико – математического моделирования для решения фундаментальных и прикладных задач криобиологии убедительно продемонстрирована в классических научных работах Р. Masur, S. P. Leibo и других криобиологов [8, 9, 161, 162]. Созданные ими количественные модели трансмембранного переноса веществ при замораживании клеточных суспензий основаны на уравнениях линейной термодинамики необратимых процессов,

область применения которых ограничивается малыми мембранными потенциалами: $\Delta\varphi \ll \frac{RT}{F} = 25,4 \text{ мВ}$ при 295 К, где R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура, F – число Фарадея. Однако это приближение, как правило, не соответствует действительности даже в нормальной физиологической среде. Поэтому на первом этапе работы мы отказались от обычного подхода и сформулировали количественную модель трансмембранного переноса веществ при замораживании клеток, которая не подчиняется указанному ограничению.

Физико – математическая модель, которая использована нами для количественного описания трансмембранного переноса веществ и связанного с ним изменения мембранного потенциала клеток в процессе замораживания клеточной суспензии, вытекает из фундаментальных положений теории процессов активационного типа [141]. Считается, что при нулевом мембранном потенциале для переноса через клеточную мембрану из внутриклеточного во внеклеточный раствор в поперечном к ее поверхности направлении Z молекулы или ионы должны преодолеть симметричный по отношению к срединной поверхности мембраны S энергетический барьер ΔW_{12} , а при переносе в обратном направлении – энергетический барьер ΔW_{32} (рис. 3.1.1 А, $\Delta W_{12} = \Delta W_{32}$). Для разных веществ высота указанного барьера неодинакова.

Индексы *in* и *out* помечают величины, которые относятся ко внутриклеточному и внеклеточному растворам. Если между внешней и внутренней поверхностями мембраны создается разность электрического потенциала $\Delta\varphi = \varphi^{out} - \varphi^{in}$ и внутримембранный электрический потенциал линейно зависит от координаты Z (гипотеза постоянного поля), то симметрия мембранного энергетического барьера для заряженных частиц вещества нарушается – он принимает вид, показанный на рис. 3.1.1 В.

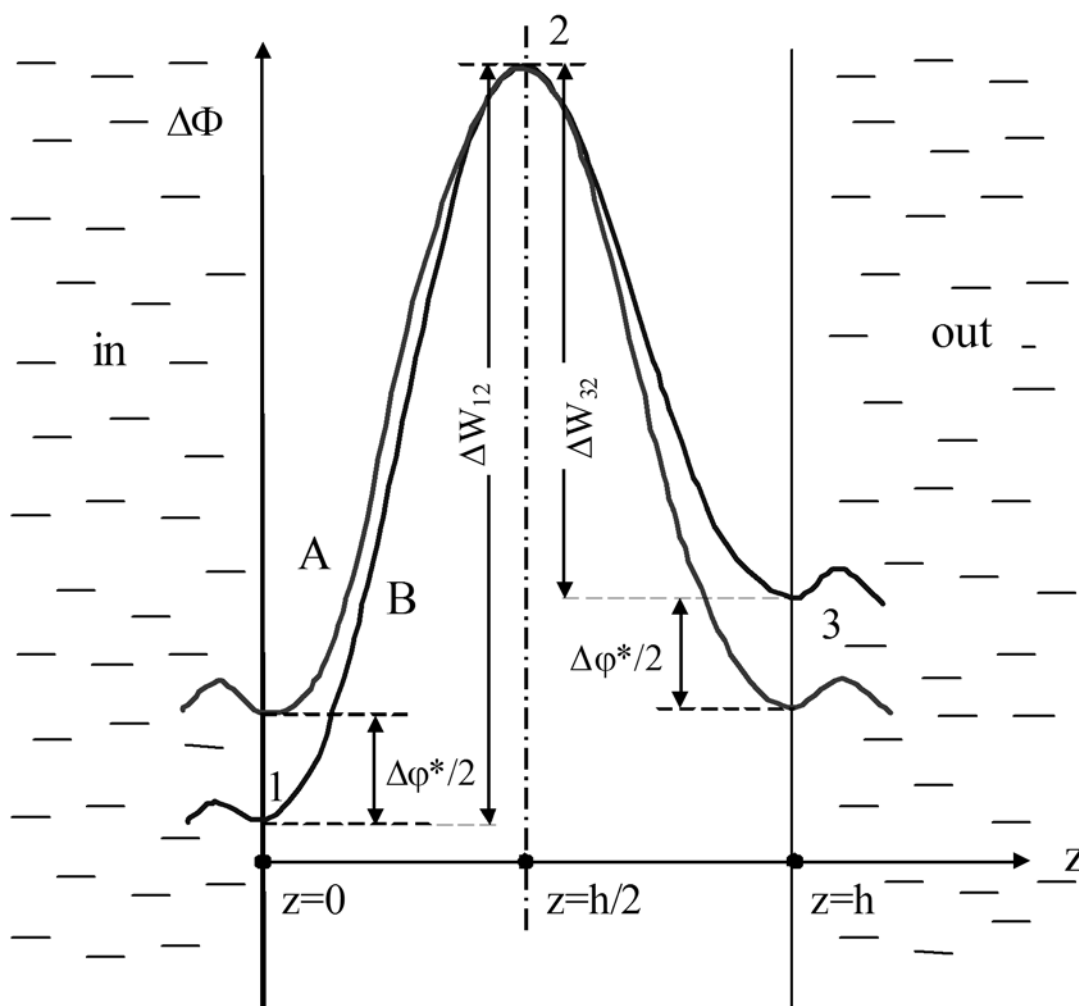


Рис. 3.1.1. Профиль энергетического барьера, который преодолевает ион в мембране в отсутствие (A) и при наличии (B) мембранного потенциала $\Delta\phi^*$.

Для ионов (в отличие от электронейтральных молекул) симметрия энергетического барьера нарушается, поскольку электрическое поле, созданное внутри мембраны, способствует трансмембранному переносу ионов одного знака, затрудняя трансмембранный перенос ионов противоположного знака в том же направлении.

Скорость изменения количества молей k -го компонента внутриклеточного раствора определяется равенством [139]

$$\frac{d}{dt}N_k^{in} = Sp_k \left[c_k^{out} \exp\left(+\frac{1}{2}z_k\Delta\varphi^*\right) - c_k^{in} \exp\left(-\frac{1}{2}z_k\Delta\varphi^*\right) \right], \quad k = 1, 2, \dots, n \quad (3.1.1)$$

где t – время, N_k^{in} – количество молей k -го компонента во внутриклеточном растворе (под k -м компонентом будем считать основные по содержанию ионы K^+ , Na^+ , Cl^- ; w – молекулы воды; cr – молекулы криопротектора; s – непроницающие через клеточную мембрану вещества), S – площадь поверхности клеточной мембраны, p_k – коэффициент проницаемости клеточной мембраны для k -го компонента, z_k – валентность k -го компонента растворов, контактирующих с клеточной мембраной, $\Delta\varphi^* = \frac{F}{RT}\Delta\varphi$ – безразмерный перепад электрического потенциала между внешней и внутренней поверхностями мембраны, $c_k^{out}(c_k^{in})$ – концентрация k -го компонента в мембранном слое, ограниченном внешней (внутренней) и срединной поверхностями мембраны, выраженная в моль/м³, n – количество веществ, содержащихся во вне- и внутриклеточном растворах.

По определению

$$c_k^{in} = \frac{N_k^{in}}{V^{in} - V_n}, \quad V^{in} - V_n = \nu_w N_w^{in} + \sum_{k=1}^n \nu_k N_k^{in}, \quad (3.1.2)$$

где V^{in} – объем клетки, V_n – объем осмотически неактивных внутриклеточных веществ, ν_w и N_w^{in} – молярный объем и внутриклеточная концентрация воды, ν_k – молярный объем k -го растворенного вне или внутри клетки вещества, n – количество растворенных вне или внутри клетки веществ.

Дифференцирование (3.1.2) по времени дает

$$\frac{d}{dt}c_k^{in} = \frac{1}{V^{in} - V_n} \left(\frac{d}{dt}N_k^{in} - c_k^{in} \frac{d}{dt}V^{in} \right) \quad (3.1.3)$$

$$\frac{d}{dt}V^{in} = \left(\nu_w \frac{d}{dt}N_w^{in} + \sum_{k=1}^n \nu_k \frac{d}{dt}N_k^{in} \right) \quad (3.1.4)$$

Система уравнений (3.1.3), (3.1.4) с учетом (3.1.1) принимает вид

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}c_k^{in} = \frac{1}{y - \alpha} & \left\{ \mathcal{P}_k \left(c_k^{out} e^{\frac{1}{2}z_k\Delta\varphi^*} - c_k^{in} e^{-\frac{1}{2}z_k\Delta\varphi^*} \right) - \right. \\ & \left. - c_k^{in} \nu_w \left[-\mathcal{P}_w \sum_{i=1}^n (c_i^{out} - c_i^{in}) + \gamma \sum_{i=1}^n p_i \frac{\nu_i}{\nu_w} \left(c_i^{out} e^{\frac{1}{2}z_i\Delta\varphi^*} - c_i^{in} e^{-\frac{1}{2}z_i\Delta\varphi^*} \right) \right] \right\} \quad (3.1.5) \end{aligned}$$

$$\frac{d}{dt}y = -\mathcal{P}_w \left[\sum_{i=1}^n \nu_i (c_i^{out} - c_i^{in}) + \sum_{i=1}^n \frac{p_i}{p_w} \nu_i \left(c_i^{out} e^{\frac{1}{2}z_i\Delta\varphi^*} - c_i^{in} e^{-\frac{1}{2}z_i\Delta\varphi^*} \right) \right], \quad (3.1.6)$$

где введены следующие обозначения: $y = \frac{V^{in}}{V^{in}(0)}$ – относительный объем

клетки, $V^{in}(0)$ – начальный объем клетки, $\alpha = \frac{V_n}{V^{in}(0)}$, $\gamma = \frac{S}{V^{in}(0)}$ –

отношение площади поверхности клетки к начальному значению ее объема.

Если в клеточной суспензии рассматривать процессы перераспределения веществ между клетками и окружающим их раствором в отсутствие химических или фазовых превращений, то в силу законов сохранения количества каждого из растворенных во вне– или внутриклеточном растворах компонентов и полного количества вещества в суспензии имеем

$$xN_k^{in}(0) + N_k^{out}(0) = xN_k^{in} + N_k^{out}, \quad k = 1, 2, \dots, n \quad (3.1.7)$$

$$xN^{in}(0) + N^{out}(0) = xN^{in} + N^{out} \quad (3.1.8)$$

где x – количество клеток в клеточной суспензии, которое считается неизменным, откуда следует

$$c_k^{out} = \frac{(1-H)c_k^{out}(0) + H(1-\alpha)c_k^{in}(0) - Hc_k^{in}(y-\alpha)}{1-yH} \quad (3.1.9)$$

где введено обозначение $H = \frac{xV^{in}(0)}{V^{out}(0) + xV^{in}(0)}$ – отношение суммарного

объема клеток к полному объему суспензии в начальный момент времени, x – количество клеток в клеточной суспензии, которое считается неизменным. Если же k -ое растворенное вещество не проникает через клеточную мембрану, то, учитывая (3.1.2) и (3.1.9) для внутриклеточной и внеклеточной концентраций этого вещества получаем

$$c_k^{in} = c_k^{in}(0) \frac{1-\alpha}{y-\alpha} \quad \text{и} \quad c_k^{out} = \frac{(1-H)c_k^{out}(0)}{1-yH} \quad (3.1.10)$$

Как известно, клеточную мембрану можно рассматривать как конденсатор с утечкой [12]. Обкладками этого конденсатора являются внутриклеточный и внеклеточный электролиты. Током утечки является трансмембранный ток проводимости

$$I = \sum_{k=1}^m z_k F \frac{d}{dt} N_k^{in} = SF \sum_{k=1}^m z_k p_k \left[c_k^{out} \exp\left(+\frac{1}{2} z_k \Delta \varphi^*\right) - c_k^{in} \exp\left(-\frac{1}{2} z_k \Delta \varphi^*\right) \right],$$

который связан со скоростью изменения суммарного заряда внутриклеточного раствора равенством $I = -\frac{d}{dt}Q^{in}$. С другой стороны $Q^{in} = C_m \Delta\varphi$ и $\frac{d}{dt}Q^{in} = C_m \frac{d}{dt}\Delta\varphi$, где $C_m = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_m S}{h}$ – емкость клеточной мембраны, ε_0 – электрическая постоянная, ε_m – относительная диэлектрическая проницаемость мембраны, h – толщина мембраны. Подставив эти величины в приведенное выше уравнение, получаем

$$\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_m S}{h} \frac{d}{dt} \Delta\varphi = SF \sum_{n=1}^k z_k p_k \left[c_k^{out} \exp\left(+\frac{1}{2} z_k \Delta\varphi^*\right) - c_k^{in} \exp\left(-\frac{1}{2} z_k \Delta\varphi^*\right) \right].$$

Умножая обе части данного уравнения на коэффициент $b = 1$ моль/м³. И вводя следующие обозначения: $\tilde{c}_k^{out} = \frac{c_k^{out}}{b}$; $\tilde{c}_k^{in} = \frac{c_k^{in}}{b}$; $\theta_k = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_m RT}{hF^2 p_k b}$, m – количество проникающих через клеточную мембрану ионов, получаем уравнение в безразмерных величинах

$$\frac{d}{dt} \Delta\varphi^* = - \sum_{k=1}^m \frac{z_k}{\theta_k} \left[\tilde{c}_k^{out} \exp\left(+\frac{1}{2} z_k \Delta\varphi^*\right) - \tilde{c}_k^{in} \exp\left(-\frac{1}{2} z_k \Delta\varphi^*\right) \right] \quad (3.1.11)$$

С учетом (3.1.9), и введя обозначения $\tau_w = (\gamma p_w)^{-1}$, $t^* = \frac{t}{\tau_w}$, $\nu = \frac{\theta_k}{\tau_w}$,

$$f_k = \frac{(1-H)\tilde{c}_k^{out}(0) + H(1-\alpha)\tilde{c}_k^{in}(0) - H\tilde{c}_k^{in}(y-\alpha)}{1-yH}, \quad g_k = (y-\alpha) \cdot \tilde{c}_k^{in} \quad \text{и}$$

$\tilde{V}_k = \nu_k b$, ν_k – молярный объем k -го растворенного вне и внутри клетки вещества, можно представить (3.1.5), (3.1.6) и (3.1.11) в виде:

$$\frac{d}{dt^*} g_k = \frac{p_k}{p_w} \left(f_k e^{\frac{1}{2} z_k \Delta \varphi^*} - \tilde{c}_k^{in} e^{-\frac{1}{2} z_k \Delta \varphi^*} \right) \quad (3.1.12)$$

$$\frac{d}{dt^*} y = - \sum_{i=1}^n \tilde{v}_i \left(f_i - \frac{g_i}{y - \alpha} \right) + \sum_{i=1}^n \frac{p_i \tilde{v}_i}{p_w} \left(f_i e^{\frac{1}{2} z_i \Delta \varphi^*} - \frac{g_i}{y - \alpha} e^{-\frac{1}{2} z_i \Delta \varphi^*} \right) \quad (3.1.13)$$

$$\nu \frac{d}{dt^*} \Delta \varphi^* = - \sum_{k=1}^m z_k \frac{p_k}{p_m} \left[\tilde{c}_k^{out} \exp \left(+ \frac{1}{2} z_k \Delta \varphi^* \right) - \tilde{c}_k^{in} \exp \left(- \frac{1}{2} z_k \Delta \varphi^* \right) \right] \quad (3.1.14)$$

Допустим, что фигурирующие в этой системе уравнений транспортные параметры клеток удовлетворяют следующим сильным неравенствам

$$\theta_k \ll \tau_w \ll \tau_i \quad (i = 1, 2, \dots, n). \quad (3.1.15)$$

Тогда по теореме Тихонова [163] за исключением малого промежутка времени ($\approx 10 \theta_k$) решение порождающей системы уравнений (3.1.12) – (3.1.14) с точностью до ν совпадает с решением редуцированной системы уравнений, которая состоит из уравнений (3.1.12), (3.1.13) и равенства

$$\sum_{k=1}^m z_k \frac{p_k}{p_m} \left[\tilde{c}_k^{out} \exp \left(+ \frac{1}{2} z_k \Delta \varphi^* \right) - \tilde{c}_k^{in} \exp \left(- \frac{1}{2} z_k \Delta \varphi^* \right) \right] = 0.$$

Последнее равенство следует из (3.1.14) при $\nu \rightarrow 0$. После разрешения относительно $\Delta\varphi^*$ оно превращается в известное уравнение Гольдмана – Ходжкина – Катца [164]

$$\Delta\varphi^* = \ln \left[\left(\sum^c p_k \tilde{c}_k^{in} + \sum^a p_k \tilde{c}_k^{out} \right) / \left(\sum^c p_k \tilde{c}_k^{out} + \sum^a p_k \tilde{c}_k^{in} \right) \right], \quad (3.1.16)$$

где символы $\sum^c$ и $\sum^a$ обозначают суммирование по катионам и анионам соответственно.

Учитывая, что транспортные, диэлектрические и геометрические параметры двуклеточных эмбрионов при $T = 297$ К имеют значения [137]

$$\begin{aligned} p_{Cl^-} &= 2,7 \times 10^{-7} \text{ м/с}, \quad p_{K^+} = 8 \times 10^{-10} \text{ м/с}, \quad p_{Na^+} = 12 \times 10^{-10} \text{ м/с}, \\ p_w &= 2,1576 \times 10^{-5} \text{ м/с}, \quad p_{DMSO} = 4 \times 10^{-7} \text{ м/с}, \quad r_b = 33 \times 10^{-6} \text{ м}, \quad h = 5 \times 10^{-9} \text{ м}, \quad \varepsilon_m = 2, \\ \theta_{Cl^-} &\approx 3,5 \times 10^{-3} \text{ с}, \quad \tau_w = \frac{r_b}{3p_w} = 0,55 \text{ с}, \quad \tau_{K^+} = \frac{r_b}{3p_{K^+}} = 1,375 \times 10^4 \text{ с}, \\ \tau_{Na^+} &= \frac{r_b}{3p_{Na^+}} = 0,917 \times 10^4 \text{ с}, \quad \tau_{DMSO} = \frac{r_b}{3p_{DMSO}} = 27,5 \text{ с}. \end{aligned}$$

Таким образом, неравенства (3.1.15) действительно выполняются для ооцитов мыши. Можно показать, что аналогичные неравенства справедливы также для эмбрионов мыши на ранних стадиях эмбриогенеза и для эритроцитов человека. Следовательно, если считать, что основными (по содержанию) компонентами внеклеточного и внутриклеточного растворов наряду с не проникающими через клеточные мембраны веществами, которые в дальнейшем будем отмечать нижним индексом s , являются вода и криопротектор, ионы калия, натрия и хлора, то изотермический трансмембранный перенос веществ, изменение объема и мембранного потенциала для указанных выше клеток

описывается системой уравнений, которая следует из системы уравнений

(3.1.12), (3.1.13) и (3.1.16) в рассматриваемом нами случае: Принимая $p_{K^+} \approx 0$, и $p_{Na^+} \approx 0$, в силу неравенств $p_w \ll p_{K^+}$, p_{Na^+} на протяжении промежутка времени $10 \times \theta_{Cl^-} < t \ll \tau_{Na^+}$ вместо системы уравнений (3.1.12), (3.1.13) и (3.1.16) получаем

$$\frac{d}{dt^*} g_{Cl^-} = \frac{p_{Cl^-}}{p_w} \left(f_{Cl^-} \frac{1}{[f_{Cl^-} (y - \alpha) / g_{Cl^-}]^{\frac{1}{2}}} - \frac{g_{Cl^-}}{y - \alpha} [f_{Cl^-} (y - \alpha) / g_{Cl^-}]^{\frac{1}{2}} \right) \quad (3.1.17)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt^*} y = & -\tilde{v}_{Cl^-} \left(f_{Cl^-} - \frac{g_{Cl^-}}{y - \alpha} \right) - \tilde{v}_{cr} \left(f_{cr} - \frac{g_{cr}}{y - \alpha} \right) - \\ & - \frac{(1 - H)(\tilde{v}_{K^+} \tilde{c}_{K^+}^{out}(0) + \tilde{v}_{Na^+} \tilde{c}_{Na^+}^{out}(0) + \tilde{v}_s \tilde{c}_s^{out}(0))}{1 - yH} - \\ & - \left(\tilde{v}_{K^+} \tilde{c}_{K^+}^{in}(0) + \tilde{v}_{Na^+} \tilde{c}_{Na^+}^{in}(0) + \tilde{v}_s \tilde{c}_s^{in}(0) \right) \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} + \\ & + \frac{p_{Cl^-} \tilde{v}_{Cl^-}}{p_w} \left(f_{Cl^-} \frac{1}{[f_{Cl^-} (y - \alpha) / g_{Cl^-}]^{\frac{1}{2}}} - \frac{g_{Cl^-}}{y - \alpha} [f_{Cl^-} (y - \alpha) / g_{Cl^-}]^{\frac{1}{2}} \right) + \\ & + \frac{p_{cr} \tilde{v}_{cr}}{p_w} \left(f_{cr} - \frac{g_{cr}}{y - \alpha} \right) \end{aligned} \quad (3.1.18)$$

$$\frac{d}{dt^*} g_{cr} = \frac{p_{cr}}{p_w} \left(f_{cr} - \frac{g_{cr}}{y - \alpha} \right) \quad (3.1.19)$$

где введены обозначения $g_{Cl^-} = (y - \alpha) \cdot \tilde{c}_{Cl^-}^{in}$, $g_{cr} = (y - \alpha) \cdot \tilde{c}_{cr}^{in}$,

$$f_{Cl^-} = \frac{(1 - H) \cdot \tilde{c}_{Cl^-}^{out}(0) + H(1 - \alpha) \cdot \tilde{c}_{Cl^-}^{in}(0) - Hg_{Cl^-}}{1 - Hy},$$

$$f_{cr} = \frac{(1 - H) \cdot \tilde{c}_{cr}^{out}(0) + H(1 - \alpha) \cdot \tilde{c}_{cr}^{in}(0) - Hg_{cr}}{1 - Hy},$$

$$\Delta\varphi^* \approx \ln \left[\frac{\tilde{c}_{Cl^-}^{out}}{\tilde{c}_{Cl^-}^{in}} \right]. \quad (3.1.20)$$

Совместно с равенством (3.1.20) решение системы уравнений (3.1.17) – (3.1.19) описывает искомые зависимости объема, мембранного потенциала клеток и состава внутриклеточной и внеклеточной сред от времени на этапе изотермической экспозиции клеток в криозащитном растворе.

Для того чтобы описать процесс перераспределения веществ между клетками и окружающим их раствором на этапе замораживания клеточной суспензии, представим оператор дифференцирования по времени в виде $\frac{d}{dt} = \frac{dT}{dt} \frac{d}{dT} = \beta \frac{d}{dT}$, где β ($\beta < 0$) – скорость изменения температуры замораживаемой клеточной суспензии. Будем считать, что в начальный момент времени при температуре T_0 в охлаждаемой клеточной суспензии начинается внеклеточное льдообразование. После этого по мере дальнейшего понижения температуры количество внеклеточного льда в окружающем клетки растворе увеличивается. Из литературы известно, что при бесконечно медленных скоростях охлаждения концентрация может изменяться вплоть до

эвтектической температуры [3]. За счет превращения все большего количества воды в лед по мере понижения температуры концентрация растворенных в межкристаллической жидкой фазе веществ также увеличивается, поскольку все растворенные в клеточной суспензии вещества и клетки вытесняются кристаллами льда в окружающую лед жидкую фазу. Так как в процессе замораживания количество воды в жидкой фазе клеточной суспензии непрерывно уменьшается, равенство (3.1.9) не выполняется. В этом

случае из определения $n_n^{out} = \frac{N_n^{out}}{V^{out}}$ и равенства (3.1.7), которое выполняется и в рассматриваемом случае потому, что все растворенные вещества и клетки вытесняются кристаллами льда в жидкую фазу, следует

$$c_k^{out} = c_{cr}^{out} \left| \frac{(1-H) \cdot c_k^{out}(0) + Hc_k^{in}(0)(1-\alpha) - Hc_k^{in}(y-\alpha)}{(1-H) \cdot c_{cr}^{out}(0) + Hc_{cr}^{in}(0)(1-\alpha) - Hc_{cr}^{in}(y-\alpha)} \right|, (k=1, 2, \dots, n-1) \quad (3.1.21)$$

где как c_{cr}^{out} – концентрация криопротектора во внеклеточной среде.

Чтобы облегчить анализ механизмов повреждения клеток «эффектами раствора», были разработаны эмпирические уравнения фазовой диаграммы, которые описывают, в частности, изменение композиционного состава тройных систем NaCl – ДМСО – H₂O и NaCl – ЭГ – H₂O, происходящие при внеклеточном льдообразовании [165]. Уравнения позволяют точно вычислять композиционные значения составляющих среды в зависимости от данного начального состава и конечных температур замораживания, а также определять температуры, в которых при замораживании реализуется интересующий специфический концентрационный состав в зависимости от исходного состава среды. Несмотря на некоторые ограничения (равновесные условия охлаждения в области температур выше $\sim -50^\circ\text{C}$, т.е. до эвтектической зоны) уравнения облегчают теоретически спрогнозировать взаимосвязь между сохранностью

клеток и значениями композиционного состава в ряду температур, при которых возможно наибольшее повреждение «эффектами раствора».

Будем считать, что в процессе замораживания клеточной суспензии кристаллы внеклеточного льда все время находятся в термодинамическом равновесии с окружающей их жидкой фазой. При этом изображающая состояние жидкой фазы раствора в замораживаемой клеточной суспензии точка по мере падения температуры движется вдоль так называемой кривой равновесия между жидкой и твердой фазами [166, 167]. Эта кривая равновесия может быть представлена в виде зависимости между температурой плавления криозащитного раствора и концентрацией криопротектора в жидкой фазе, контактирующей с кристаллами льда [166, 167]. Полагая, что n -й компонент исследуемого объекта является криопротектором ($n_n^{out} = n_{cr}^{out}$), указанную выше кривую равновесия можно представить в виде функции $n_{cr}^{out}(T) = f(T)$. Для каждого конкретного криозащитного раствора указанную зависимость можно определить экспериментально.

С учетом приведенных соображений можно представить систему уравнений (3.1.12), (3.1.13) и (3.1.14) в виде

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} g_{Cl^-} &= \frac{T_0}{\beta \tau_w(T_0)} \exp \left[\frac{U_w}{RT_0} \left(1 - \frac{1}{x} \right) \right] \frac{p_{Cl^-}}{p_w} \times \\ &\times \left(f_{Cl^-} \frac{1}{[f_{Cl^-} (y - \alpha / g_{Cl^-})]^{\frac{1}{2}}} - \frac{g_{Cl^-}}{y - \alpha} \left[f_{Cl^-} (y - \alpha / g_{Cl^-})^{\frac{1}{2}} \right] \right) \end{aligned} \quad (3.1.22)$$

$$\frac{d}{dx} g_{cr} = \frac{T_0}{\beta \tau_w(T_0)} \exp \left[\frac{U_w}{RT_0} \left(1 - \frac{1}{x} \right) \right] \frac{p_{cr}}{p_w} \left(\tilde{c}_{cr}(T) - \frac{g_{cr}}{y - \alpha} \right) \quad (3.1.23)$$

$$\frac{d}{dx} y = - \frac{T_0}{\beta \tau_w(T_0)} \exp \left[\frac{U_w}{RT_0} \left(1 - \frac{1}{x} \right) \right] \left\{ \tilde{v}_{Cl^-} \left(f_{Cl^-} - \frac{g_{Cl^-}}{y - \alpha} \right) + \right.$$

$$\begin{aligned}
& + \tilde{v}_{cr} \left(\tilde{c}_{cr}(T) - \frac{g_{cr}}{y - \alpha} \right) + \frac{(1 - H) [\tilde{v}_{K^+} \tilde{c}_{K^+}^{out}(0) + \tilde{v}_{Na^+} \tilde{c}_{Na^+}^{out}(0) + \tilde{v}_s \tilde{c}_s^{out}(0)]}{1 - yH} + \\
& + \left(\tilde{v}_{K^+} \tilde{c}_{K^+}^{in}(0) + \tilde{v}_{Na^+} \tilde{c}_{Na^+}^{in}(0) + \tilde{v}_s \tilde{c}_s^{in}(0) \right) \times \left(\frac{1 - \alpha}{y - \alpha} \right) \Bigg\} + \\
& + \frac{p_{Cl^-} \tilde{v}_{Cl^-}}{p_w} \left(f_{Cl^-} \frac{1}{[f_{Cl^-}(y - \alpha) / g_{Cl^-}]^{\frac{1}{2}}} - \frac{g_{Cl^-}}{y - \alpha} [f_{Cl^-}(y - \alpha) / g_{Cl^-}]^{\frac{1}{2}} \right) + \\
& + \frac{p_{cr} \tilde{v}_{cr}}{p_w} \left(\tilde{c}_{cr}(T) - \frac{g_{cr}}{y - \alpha} \right) \tag{3.1.24}
\end{aligned}$$

где введено обозначение $\chi = \frac{T}{T_0}$, U_w – энергия активации трансмембранного

переноса молекул воды.

Построенная нами количественная модель массообмена между клеткой и окружающей ее средой является универсальной и применима для анализа процессов трансмембранного переноса веществ между клетками и окружающей их средой, в какой угодно клеточной суспензии. Мы ограничились численным моделированием указанных процессов применительно к ооцитам и двухклеточным эмбрионам мыши, взвешенным в растворах «диметилсульфоксид – хлорид натрия – вода» и «этиленгликоль – хлорид натрия – вода». Системы уравнений (3.1.17) – (3.1.20) и, (3.1.22) – (3.1.24) решались численно стандартным методом Рунге – Кутты четвертого порядка [164]. Используемые для расчета значения параметров, фигурирующих в этой системе уравнений, приведены в таблицах 3.1.1.

Таблица 3.1.1.

Значения параметров, использованных при численном моделировании процессов перераспределения веществ между ооцитами и двухклеточными эмбрионами мыши при их изотермической экспозиции в криозащитном растворе и при замораживании

Наименование величины	Обозначение	Размерность	Величина	T, °C	Источник
1	2	3	4	5	6
Проницаемость ооцита мыши для молекул воды	p_w	м/с	$1,767 \times 10^{-5}$	24	[168]
Энергия активации переноса молекул воды через мембрану ооцита мыши	U_w	кДж/моль	39,69	37–10	[168]
Проницаемость ооцита мыши для молекул ДМСО	p_{DMSO}	м/с	$3,083 \times 10^{-7}$	24	[169]
Проницаемость ооцита мыши для молекул ЭГ	p_{EG}	м/с	$1,2 \times 10^{-7}$	22	[170]
Проницаемость ооцита мыши для ионов калия	p_{K^+}	м/с	8×10^{-10}	22	[171]
Проницаемость ооцита мыши для ионов натрия	p_{Na^+}	м/с	$1,2 \times 10^{-9}$	22	[171]
Проницаемость ооцита мыши для ионов хлора	p_{Cl^-}	м/с	$2,7 \times 10^{-7}$	22	[171]
Концентрация ионов калия внутри ооцита мыши	c_{K^+}	моль/м ³	204	22	[171]

1	2	3	4	5	6
Концентрация ионов натрия внутри ооцита мыши	C_{Na^+}	моль/м ³	83	22	[171]
Концентрация ионов хлора внутри ооцита мыши	C_{Cl^-}	моль/м ³	67	22	[171]
Объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ в ооците мыши	α	1	0,2		
Проницаемость 2–клеточного эмбриона мыши для молекул воды	p_w	м/с	$2,1576 \times 10^{-5}$	24	[168]
Энергия активации переноса молекул воды через мембрану 2–клеточного эмбриона мыши	U_w	кДж/ моль	30,9	37–10	[172]
Проницаемость 2–клеточного эмбриона мыши для молекул ДМСО	p_{DMSO}	м/с	4×10^{-7}	24	[169]
Проницаемость 2–клеточного эмбриона мыши для молекул ЭГ	p_{EG}	м/с	$1,25 \times 10^{-7}$	22	[170]
Проницаемость двухклеточного эмбриона мыши для ионов калия	p_{K^+}	м/с	8×10^{-10}	22	[171]
Проницаемость двухклеточного эмбриона мыши для ионов натрия	p_{Na^+}	м/с	$1,2 \times 10^{-9}$	22	[171]

1	2	3	4	5	6
Проницаемость двуклеточного эмбриона мышы для ионов хлора	p_{Cl^-}	м/с	$2,7 \times 10^{-7}$	22	[171]
Концентрация ионов калия внутри двуклеточного эмбриона мышы	c_{K^+}	моль/м ³	128	22	[173]
Концентрация ионов натрия внутри двуклеточного эмбриона мышы	c_{Na^+}	моль/м ³	116	22	[173]
Концентрация ионов хлора внутри двуклеточного эмбриона мышы	c_{Cl^-}	моль/м ³	99	22	[173]
Объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ в двуклеточном эмбрионе мышы	α		0,21		
Радиус гидратированного иона калия	r_{K^+}	нм	0,283		
Радиус гидратированного иона натрия	r_{Na^+}	нм	0,34		
Радиус гидратированного иона хлора	r_{Cl^-}	нм	0,228		
Молярный объем ионов калия	ν_{K^+}	м ³ /моль	$77,4 \times 10^{-6}$		
Молярный объем ионов натрия	ν_{Na^+}	м ³ /моль	$133,8 \times 10^{-6}$		

1	2	3	4	5	6
Молярный объем ионов хлора	ν_{Cl^-}	м ³ /моль	$40,34 \times 10^{-6}$		
Молярный объем воды	ν_w	м ³ /моль	18×10^{-6}		
Молярный объем ДМСО	ν_{DMSO}	м ³ /моль	71×10^{-6}		
Молярный объем ЕГ	ν_{EG}	м ³ /моль	56×10^{-6}		
Молярный объем сахарозы	ν_s	м ³ /моль	$215,69 \times 10^{-6}$		

Молярный объем ионов рассчитывался по формуле $\nu_{ion} = \frac{4\pi}{3} r_{ion}^3 \cdot N_A \times 1,35$,

где ν_{ion} – молярный объем ионов, r_{ion} – эффективный радиус иона, N_A – число Авогадро. Множитель 1,35 учитывает тот факт, что при плотной упаковке сфер объем, который они занимают, превышает суммарный объем сфер вследствие наличия пустот между плотно упакованными сферами.

В качестве модели криозащитных сред выбраны растворы ДМСО – 0,15 М NaCl – H₂O и ЭГ – 0,15 М NaCl – вода, при концентрациях криопротекторов 1 М, 2 М и 3 М.

Как следует из результатов численного решения системы уравнений (3.1.17) – (3.1.20), на этапе изотермической экспозиции двухклеточных эмбрионов в криозащитном растворе диметилсульфоксида протекают следующие процессы. Концентрация диметилсульфоксида внутри клеток достигает максимального значения через 10–15 минут после помещения ооцита или эмбриона в криозащитный раствор и в дальнейшем не изменяется. Так для ооцита мыши (рис. 3.1.2) максимальные значения криопротектора внутри клетки равны: 0,55 М в 1 М растворе ДМСО, 1,1 М в 2 М растворе и 1,66 М – в

3 М растворе криопротектора. А для двухклеточного эмбриона (рис. 3.1.3): 0,832 М в 1 М растворе криопротектора, 1,664 М – в 2 М растворе диметилсульфоксида и 2,496 М – в 3 М растворе, соответственно.

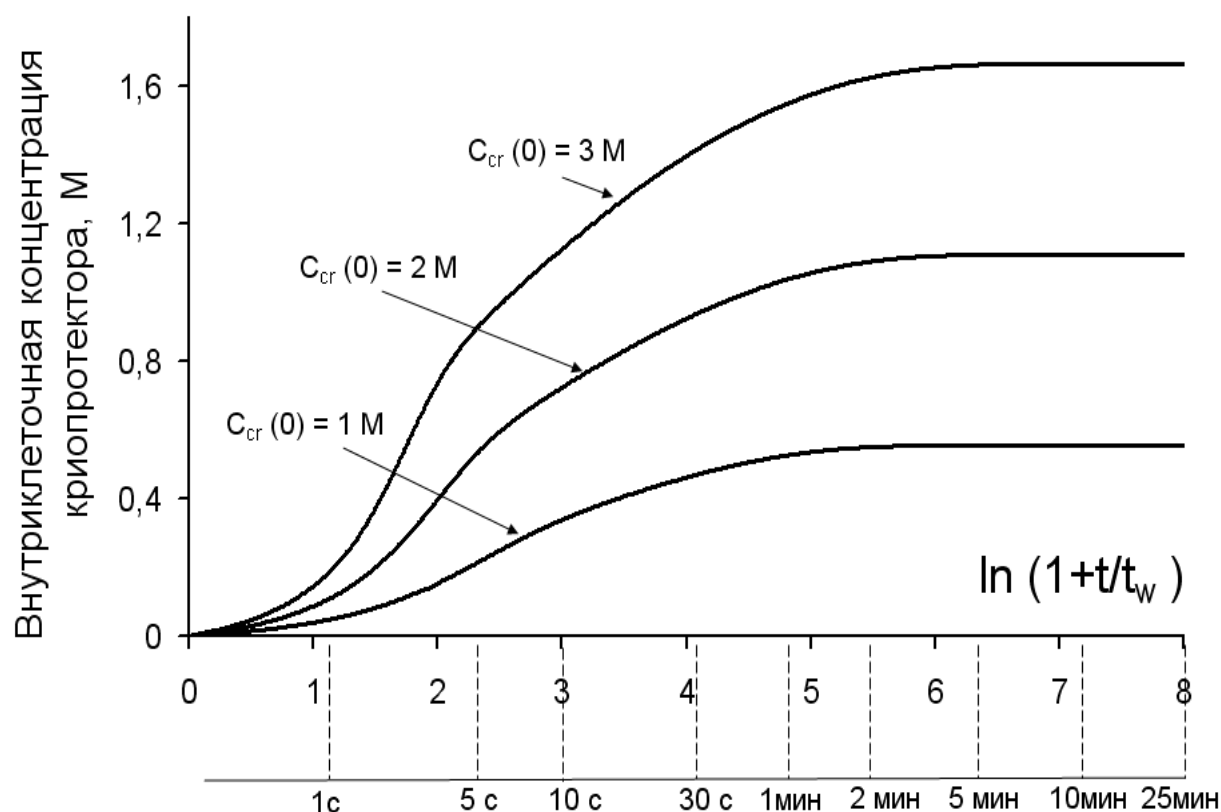


Рис. 3.1.2. Зависимость внутриклеточной концентрации ДМСО от времени экспозиции ооцита мыши в криозащитном растворе ДМСО.

На рис. 3.1.4 и 3.1.5 показана кинетика обезвоживания ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши на этапе экспозиции клеток в криозащитном растворе при $T = 297 \text{ K}$. Проницаемость мембран клеток для молекул воды гораздо выше проницаемости для криопротектора. Поэтому в результате обезвоживания объем клеток сначала уменьшается. Максимальное обезвоживание происходит в течение первых нескольких секунд. Объем ооцита уменьшается до 47% в 3 М растворе, до 55% – в 2 М и до 70% в 1 М растворе криопротектора. А в случае двухклеточного эмбриона объем уменьшается до

40% от начального значения в 3 М растворе криопротектора, до 47,7% – 2 М растворе и до 62,7% – в 1 М растворе ДМСО.

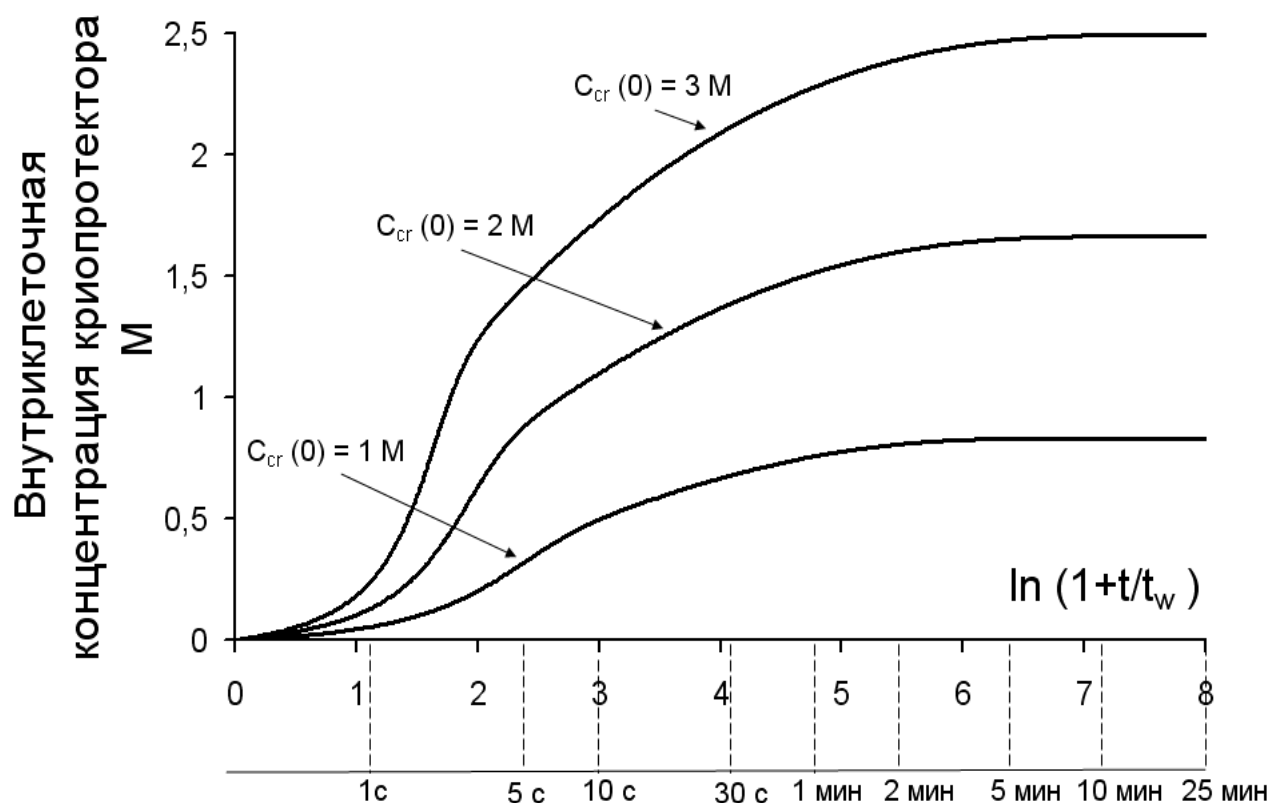


Рис. 3.1.3. Зависимость внутриклеточной концентрации ДМСО от времени экспозиции двухклеточных эмбрионов мыши в криозащитном растворе ДМСО.

По мере проникновения криопротектора внутрь клетки одновременно в клетку поступает некоторая часть воды так, что концентрация криопротектора вне- и внутри клетки остается постоянной в каждый момент времени [3]. Объем клетки при этом начинает увеличиваться и через 2–5 минут достигает первоначального значения.

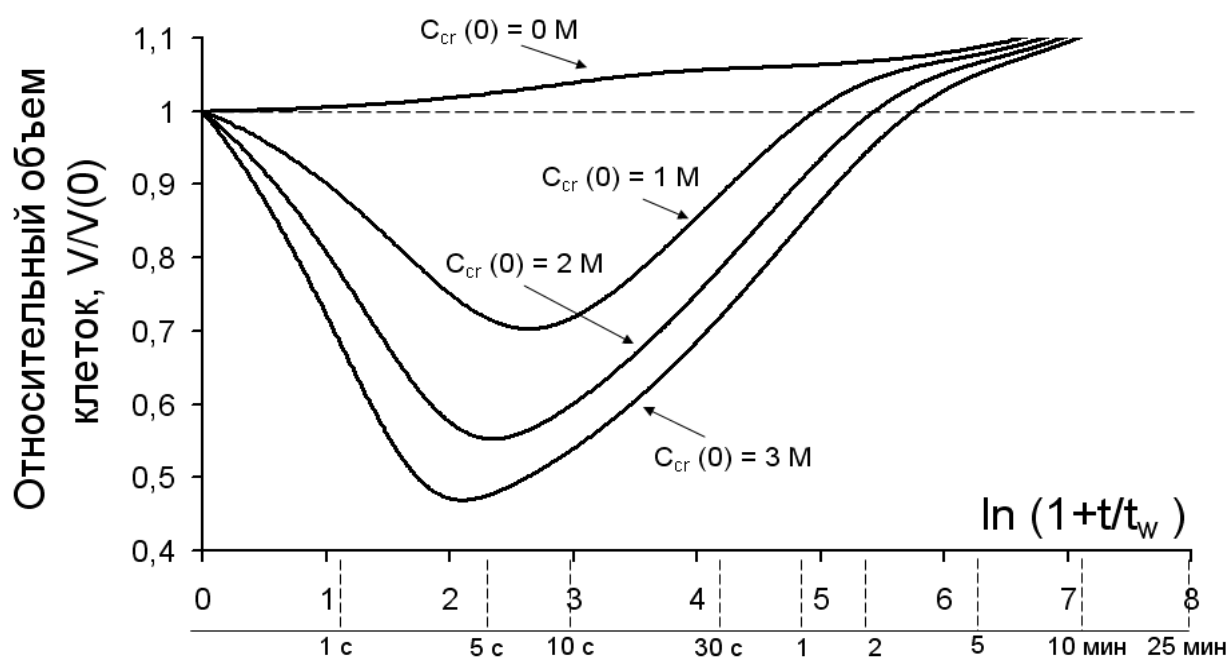


Рис. 3.1.4. Зависимость относительного объема ооцитов мышцы от времени при экспозиции в криозащитном растворе «ДМСО – хлорид натрия – вода».

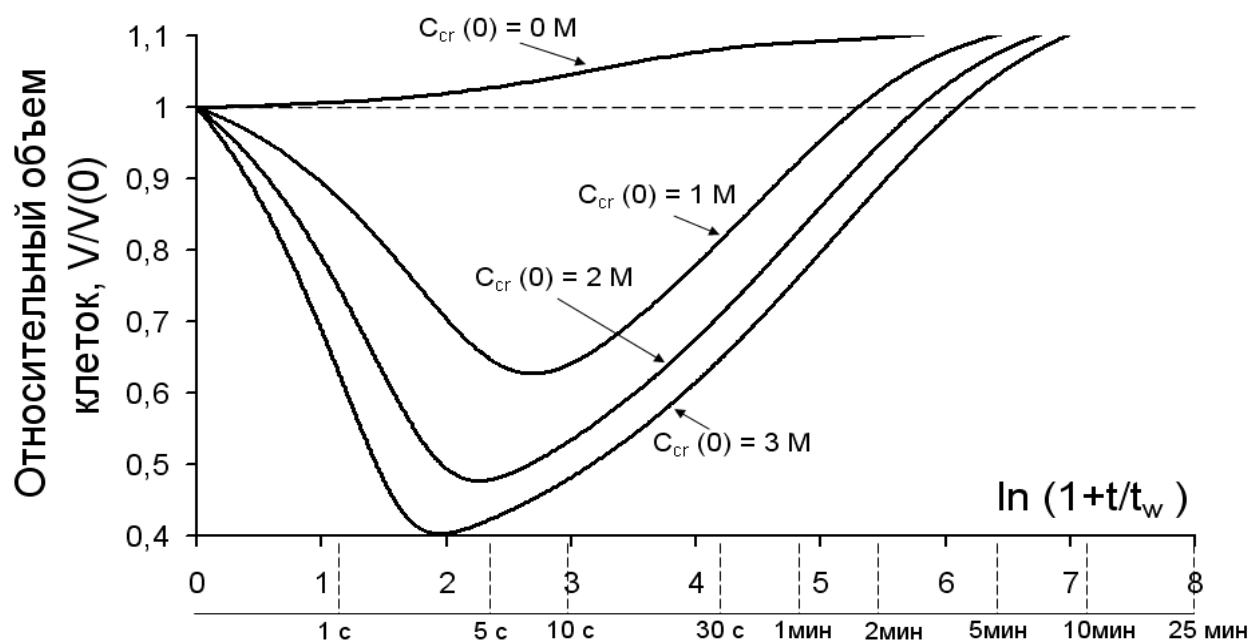


Рис. 3.1.5. Зависимость относительного объема бластомеров от времени при экспозиции двуклеточных эмбрионов мышцы в криозащитном растворе «ДМСО – хлорид натрия – вода».

Степень обезвоживания клеток, как и ожидалось, увеличивается с ростом концентрации криопротектора. Далее при более длительной продолжительности экспозиции до 25 минут клетки незначительно набухают. Такое незначительное превышение исходного объема происходит из-за проникновения внеклеточных ионов внутрь клетки и может быть устранено путем добавления в криозащитный раствор небольшого количества не проникающего в клетки вещества, например, сахарозы (рис. 3.1.6).

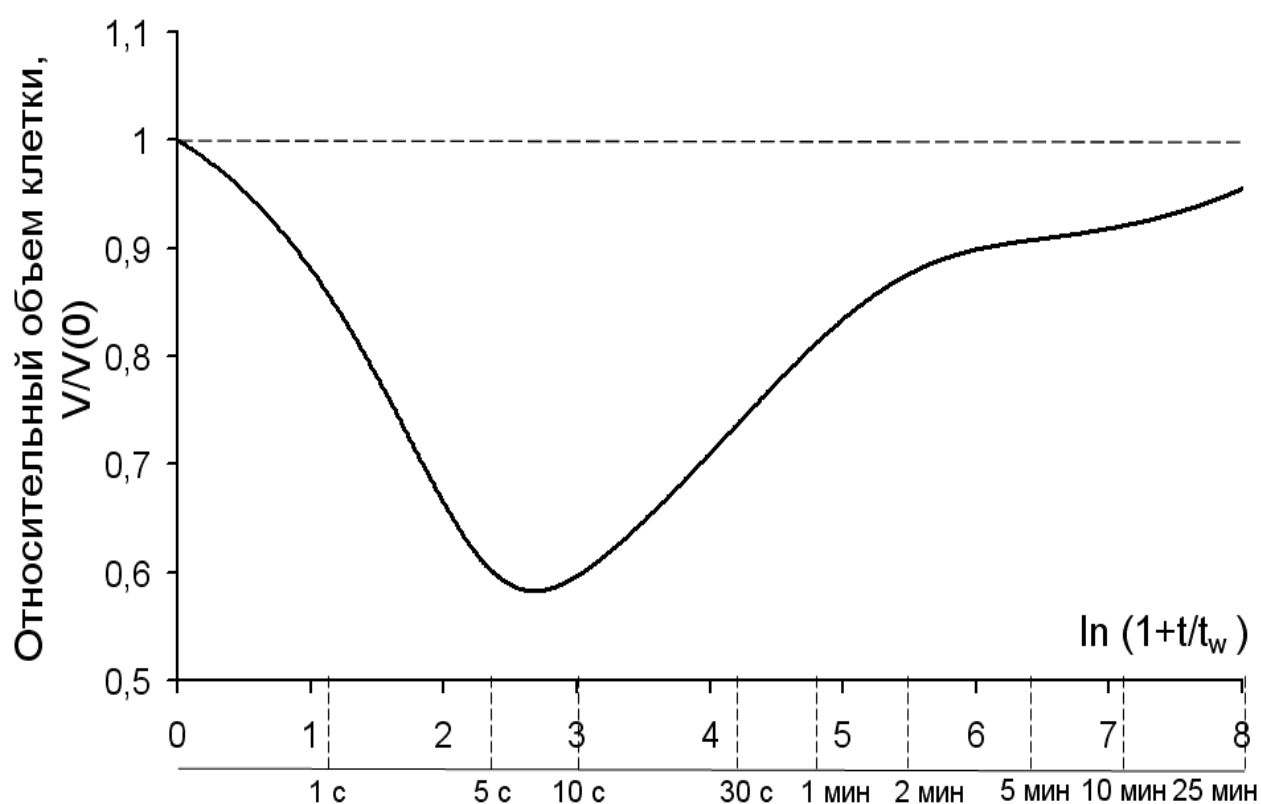


Рис. 3.1.6. Зависимость относительного объема бластомеров от времени при экспозиции двухклеточных эмбрионов мыши в криозащитном растворе «1 М ДМСО – 0,15 М хлорид натрия – 0,04 М сахароза – вода».

Как следует из результатов численного моделирования, представленных на рис. 3.1.7 мембранный потенциал ооцитов после перемещения в криозащитный раствор быстро (за несколько секунд) изменяется от нормального значения (-20 мВ) до максимального значения $+17,3$ мВ 3 М

растворе, до +9,2 мВ в 2 М и до –2,4 мВ в 1 М растворе ДМСО. Аналогичная кинетика изменения мембранного потенциала характерна и для двухклеточных эмбрионов (рис. 3.1.8). Мембранный потенциал бластомеров после перемещения эмбриона в криозащитный раствор за несколько секунд увеличивается до максимального значения +16,8 мВ в 3 М растворе ДМСО, до +8,7 мВ в 2 М растворе, до –2,8 мВ в 1 М растворе.

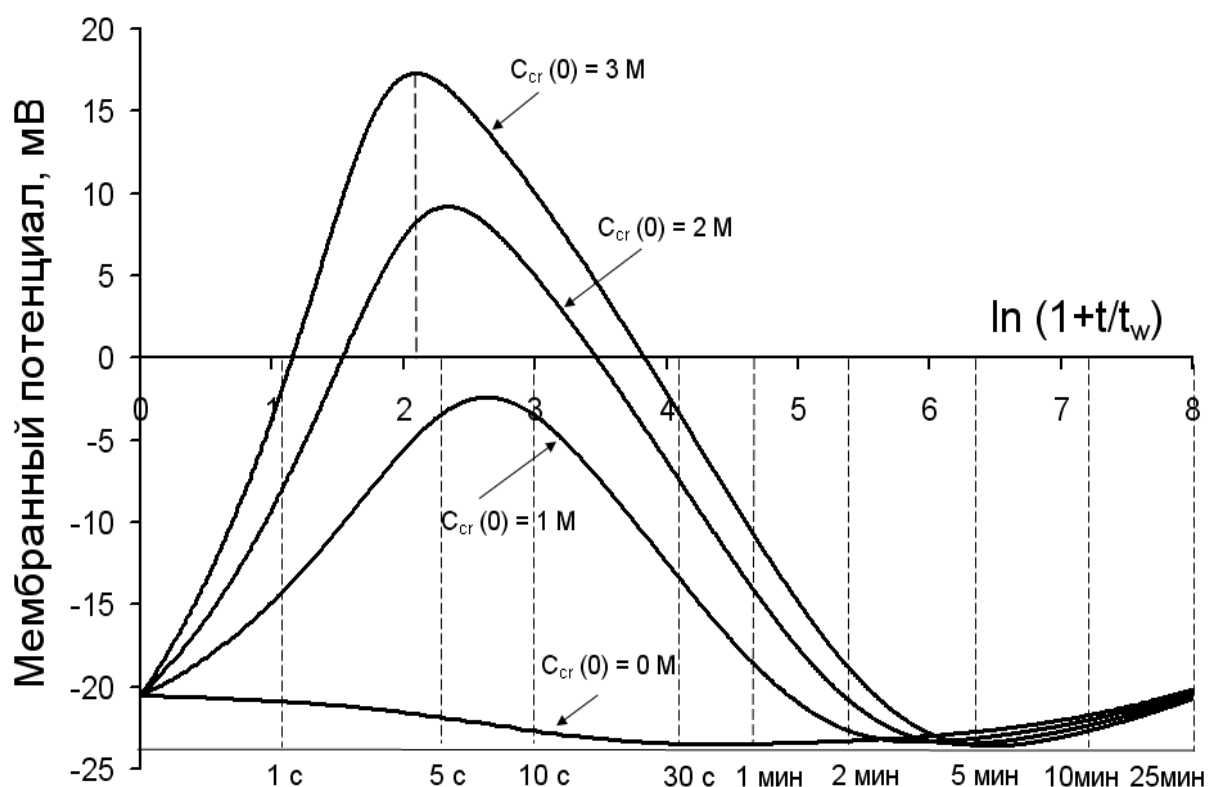


Рис. 3.1.7. Зависимость мембранного потенциала ооцитов мыши от времени экспозиции в криозащитном растворе ДМСО.

При больших концентрациях криопротектора происходит деполяризация клеточных мембран. Это может способствовать увеличению ионной проницаемости и отражаться на величине мембранного потенциала при условиях приводящих к гиперполяризации. Примерно через 5 минут мембранный потенциал клеток возвращается к первоначальному значению и в

дальнейшем остается практически постоянным и равным первоначальному значению.

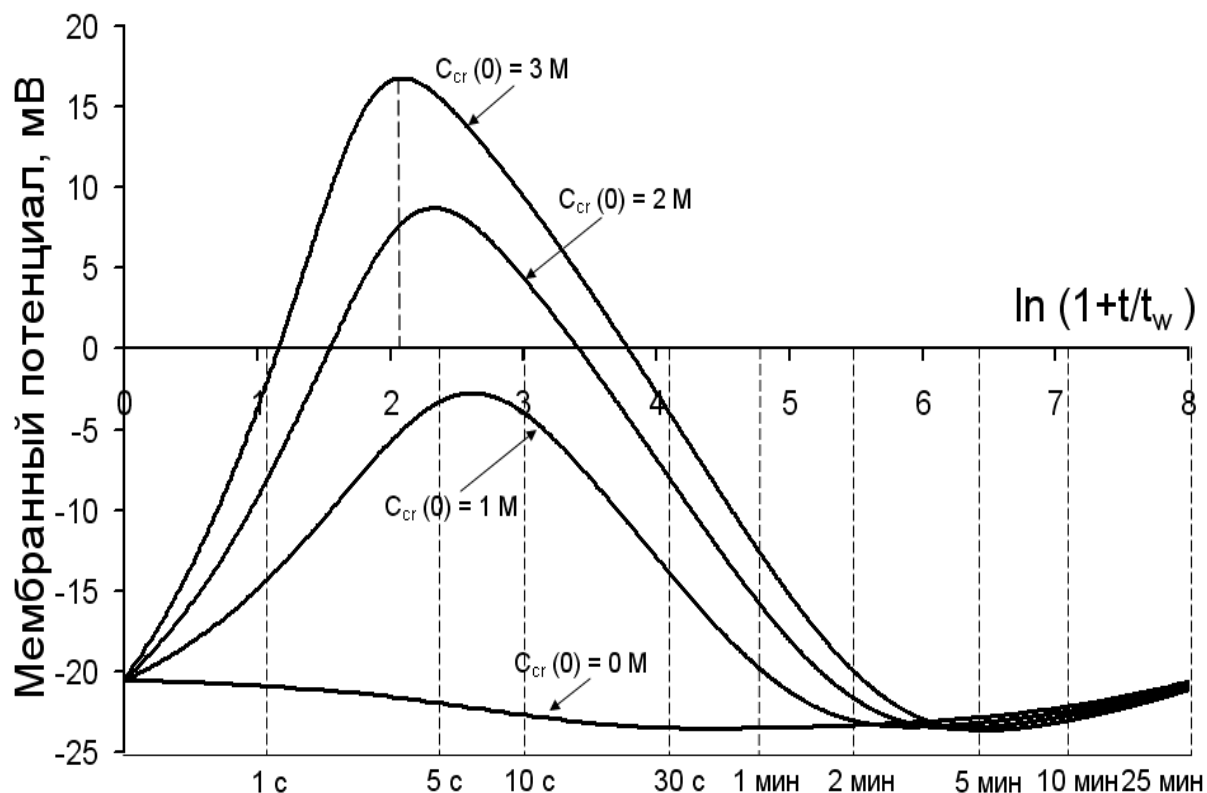


Рис. 3.1.8. Зависимость мембранного потенциала бластомеров от времени экспозиции двухклеточных эмбрионов мыши в криозащитном растворе ДМСО.

Как видно из рисунков 3.1.4 – 3.1.8 динамика изменения мембранного потенциала клеток отражает изменение относительного объема клеток. Подобная кинетика изменения объема и потенциала также характерна для ооцитов мыши при экспозиции в растворах криопротекторов.

Аналогичный вид имеют зависимости концентраций ионов калия и хлора внутри клетки от времени (рис. 3.1.9 и 3.1.10).

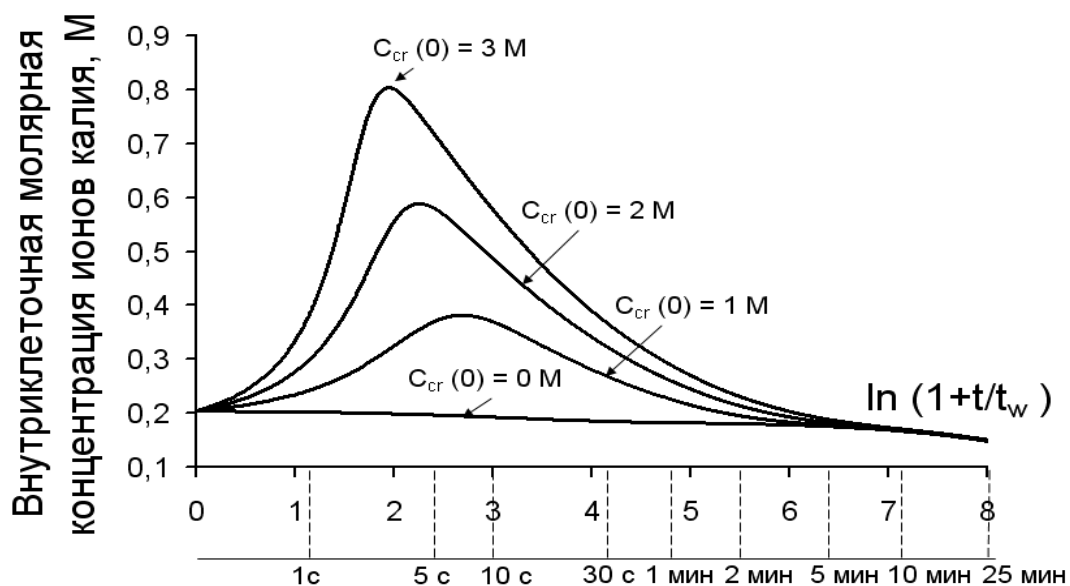


Рис. 3.1.9. Зависимость внутриклеточной концентрации ионов калия от времени экспозиции двухклеточных эмбрионов мыши в растворе ДМСО.

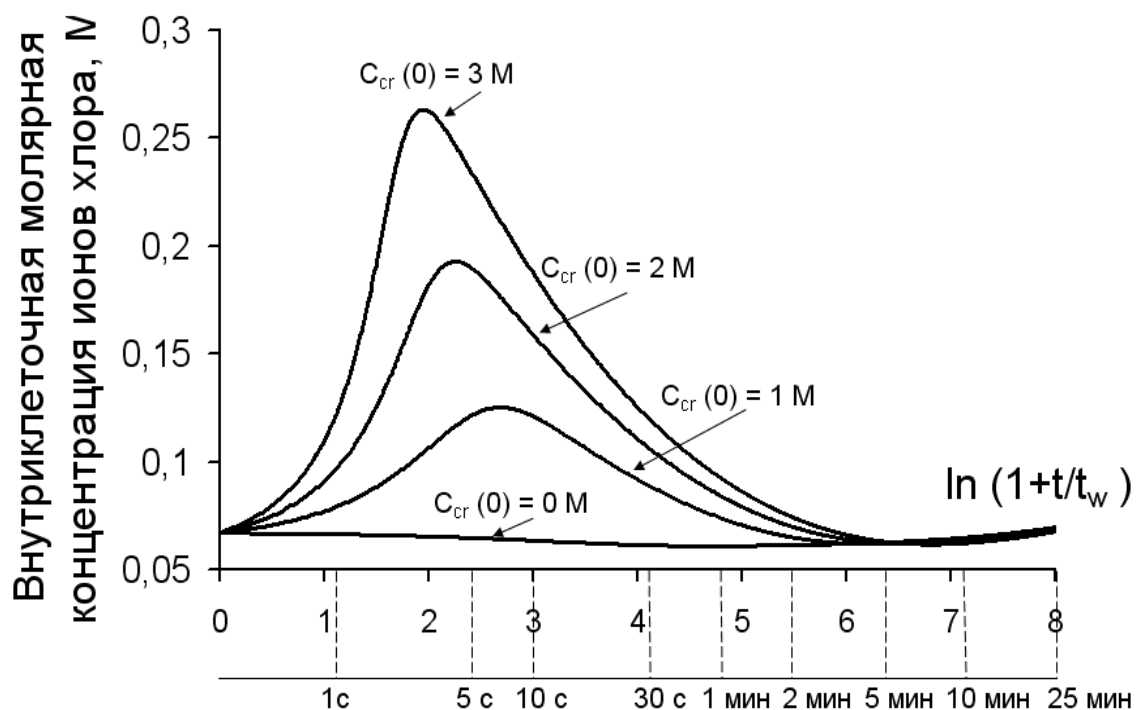


Рис. 3.1.10. Зависимость внутриклеточной концентрации ионов хлора от времени экспозиции двухклеточных эмбрионов мыши в растворе ДМСО.

По данным численного моделирования, внутриклеточные концентрации ионов за несколько секунд после помещения двухклеточного эмбриона мыши в криозащитный раствор достигают максимальных значений ($0,8 \text{ М } K^+$ и $0,26 \text{ М } Cl^-$ в 3 М растворе ДМСО, $0,58 \text{ М } K^+$ и $0,18 \text{ М } Cl^-$ в 2 М растворе ДМСО, $0,34 \text{ М } K^+$ и $0,12 \text{ М } Cl^-$ в 1 М растворе ДМСО). Затем концентрации ионов восстанавливаются до исходных значений примерно за 5 минут.

Из полученных нами результатов следует, что при решении системы дифференциальных уравнений (3.1.20), (3.1.22) – (3.1.24), описывающих процессы трансмембранного переноса веществ в процессе замораживания клеточной суспензии, в качестве начальных значений для объема клеток и внутриклеточных концентраций ионов можно использовать нормальные значения этих величин, если предварительная выдержка клеток в криозащитном растворе превышает 5 минут. При этом начальное условие для концентрации криопротектора внутри клеток следует задавать с учетом данных, полученных для этапа экспозиции клеток в криозащитной среде до начала замораживания. Из проведенных расчетов видно, что увеличивать продолжительность экспозиции двухклеточных эмбрионов мыши сверх 10 минут нецелесообразно, так как при более длительных временах экспозиции уже не происходит существенных изменений ни в клетке, ни в криозащитной среде. При этом минимальное время экспозиции составляет 5 мин.

Изменение объема бластомеров двухклеточного эмбриона мыши, внутриклеточных концентраций ионов и криопротектора, мембранного потенциала клеток и переохлаждения их цитоплазмы в процессе замораживания рассчитывали путем численного решения системы обыкновенных дифференциальных уравнений (3.1.20), (3.1.22) – (3.1.24).

На рис. 3.1.11 – 3.1.17 приведены полученные нами методом компьютерного моделирования графики решений системы уравнений (3.1.20), (3.1.22) – (3.1.24), которые описывают зависимость изменения объема ооцита и бластомеров двухклеточного эмбриона мыши, внутриклеточных концентраций

ионов и криопротектора, мембранного потенциала клеток и переохлаждения их цитоплазмы в процессе охлаждения с разными скоростями и концентрациями криопротекторов в криозащитном растворе.

На рис. 3.1.11 представлены зависимости объема ооцита мыши в процессе охлаждения со скоростями 1, 5, 10, 100 К/мин в 1 М растворе ЭГ. Как видно, в процессе охлаждения со скоростью 100 К/мин относительный объем клеток остается практически неизменным, в то время как при более медленном охлаждении происходит дегидратация клеток.

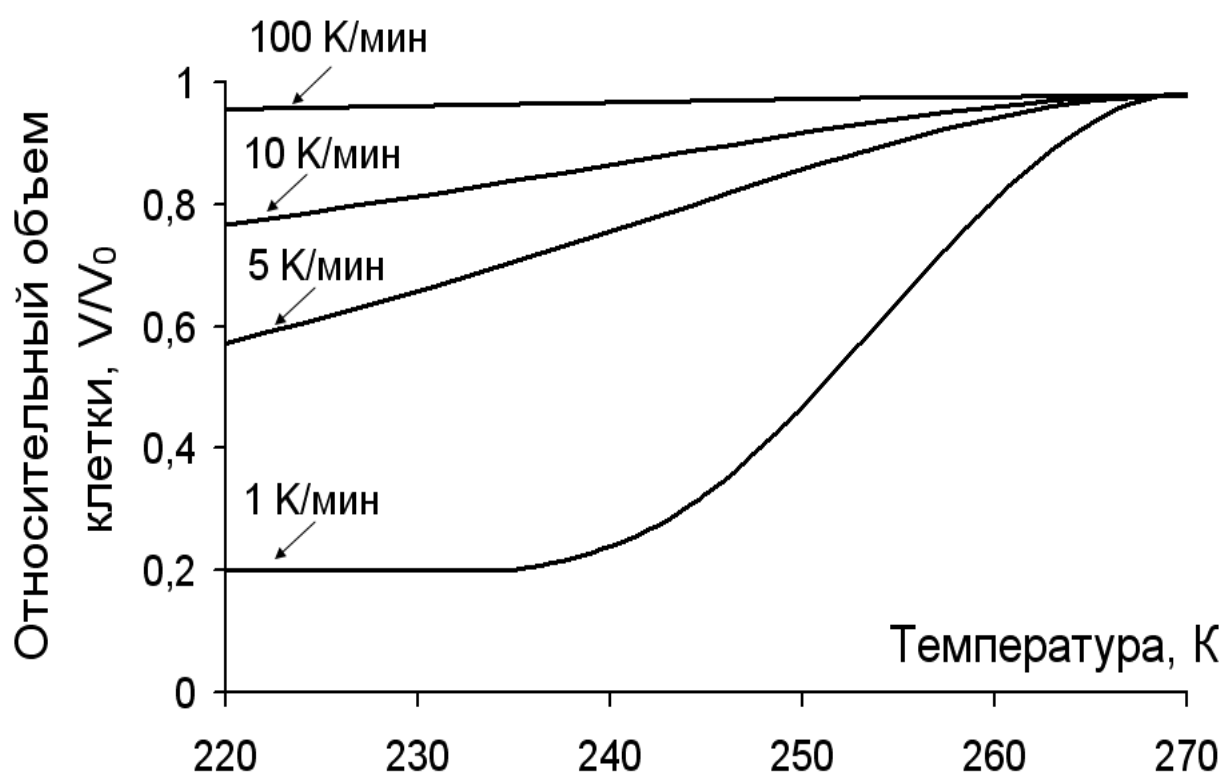


Рис. 3.1.11. Изменение объема ооцита мыши в процессе охлаждения с разными скоростями в 1 М растворе этиленгликоля.

Аналогичные зависимости изменения объема ооцита мыши в процессе замораживания с разными скоростями охлаждения получены и для 1 М раствора диметилсульфоксида.

Зависимости объема бластомеров в процессе охлаждения двухклеточного эмбриона мыши со скоростями 1, 5, 10, 100 К/мин в 1 М растворах этиленгликоля и диметилсульфоксида представлены на рисунках 3.1.12 и 3.1.13.

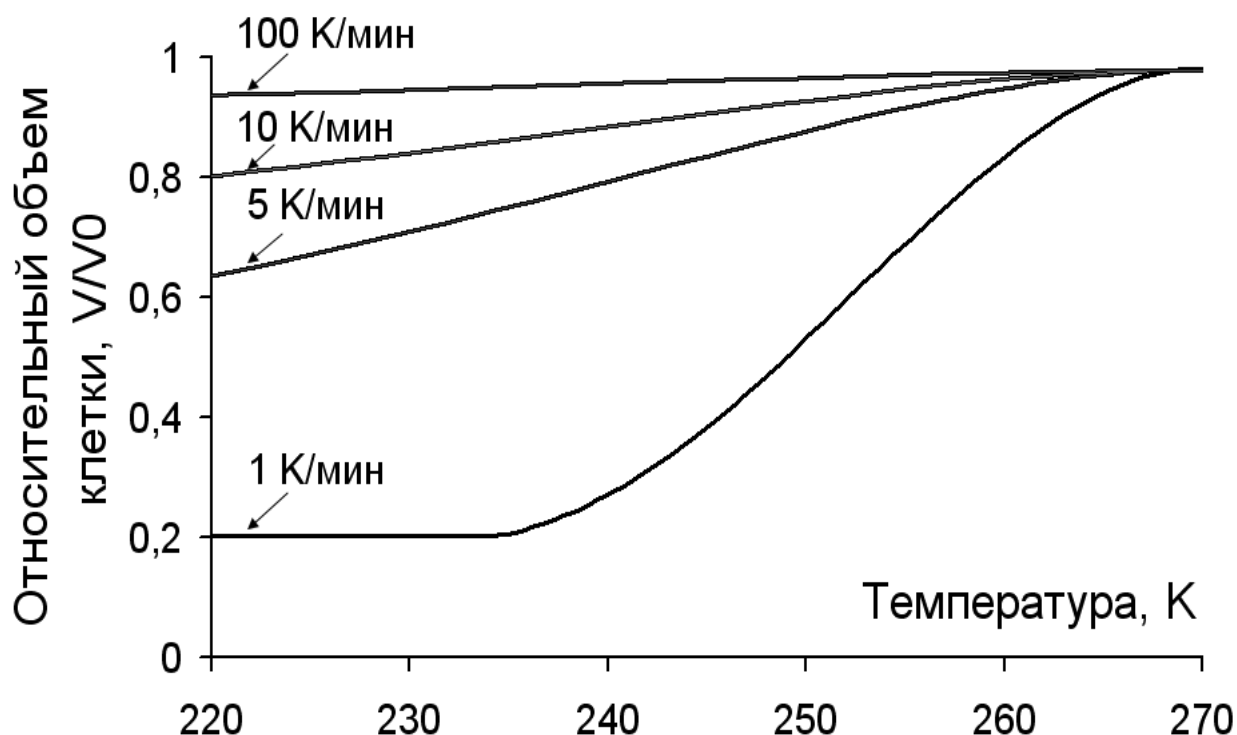


Рис. 3.1.12. Изменение объема бластомеров в процессе охлаждения двухклеточного эмбриона мыши с разными скоростями в 1 М растворе ЭГ.

Сравнивая зависимости изменения объемов ооцита и двухклеточного эмбриона мыши в 1 М растворе ЭГ (рис. 3.1.11 и 3.1.12) при охлаждении можно увидеть, что при скорости 1 К/мин эти зависимости практически не отличаются. А при больших скоростях охлаждения видно, что объем ооцита уменьшается сильнее, чем объем эмбриона. Так при скорости охлаждения 5 К/мин объем ооцита изменяется на 41%, тогда как объем эмбриона на 36%; при 10 К/мин – на 23% и 20%; при 100 К/мин – на 4% и 6%, соответственно.

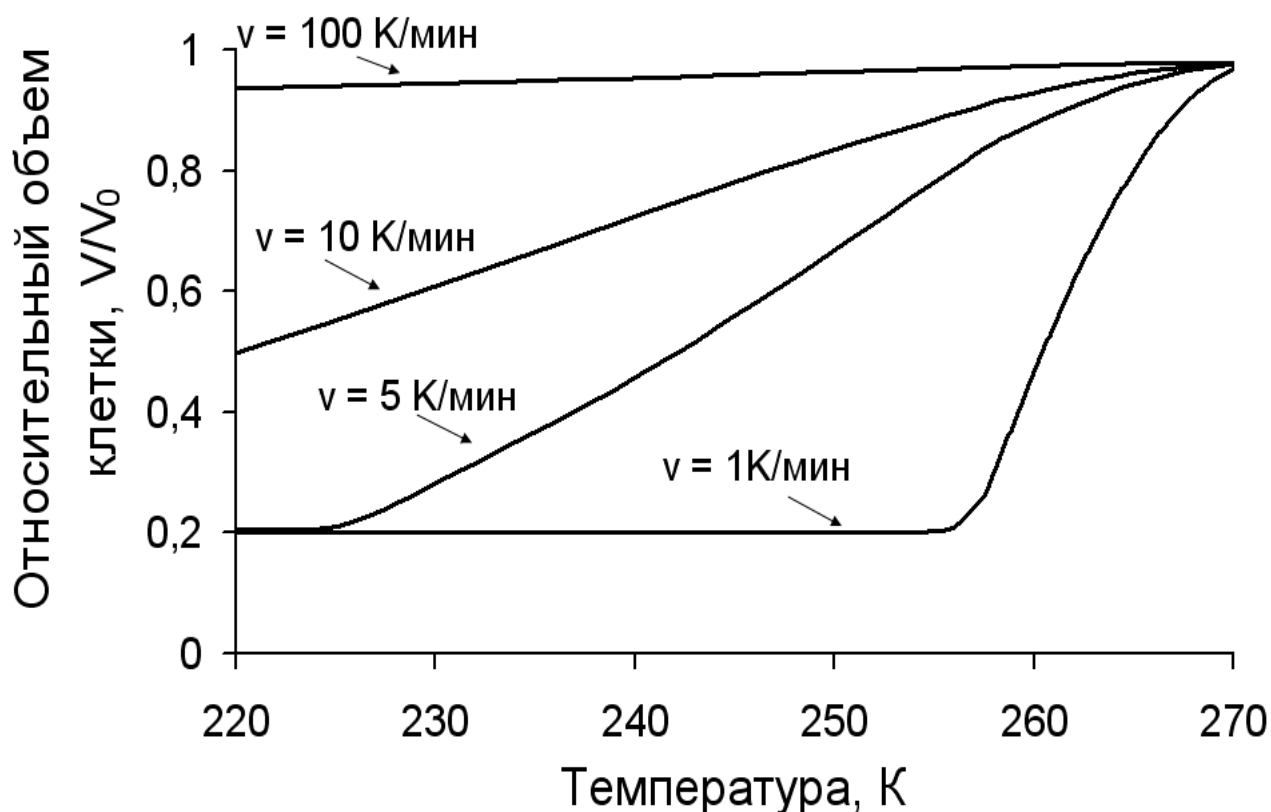


Рис. 3.1.13. Изменение объема бластомеров в процессе охлаждения двухклеточного эмбриона мыши с разными скоростями в 1 М растворе ДМСО.

Изучая влияние одномолярных растворов ЭГ и ДМСО на изменение объема двухклеточного эмбриона мыши в процессе охлаждения можно заметить (рис. 3.1.12 и 3.1.13), что влияние ДМСО на изменение объема клетки является более сильным, по сравнению с ЭГ. Так, при скоростях охлаждения 1 К/мин объем клетки в обоих случаях уменьшается на 80%. однако при использовании ДМСО конечный объем достигается при 255 К, а при использовании ЭГ – при 234 К. При скорости охлаждения 5 К/мин объем эмбриона в ДМСО также уменьшается на 80%, достигая минимума при 226 К. А при этой же скорости в ЭГ объем эмбриона уменьшается только на 36%. При скорости охлаждения 10 К/мин в ДМСО объем клетки уменьшается на 50%, а в ЭГ только на 20%.

При скорости охлаждения 100 К/мин объемы эмбрионов уменьшаются примерно одинаково для обоих случаев (6 – 7%).

На рис. 3.1.14 – 3.1.16 представлены полученные нами методом компьютерного моделирования зависимости мембранного потенциала ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши в процессе их охлаждения со скоростями 1; 5; 10 и 100 К/мин в 1 М растворах диметилсульфоксида и этиленгликоля в физиологическом растворе. Как видно из рисунка 3.1.14 – 3.1.16, с увеличением скорости охлаждения наблюдается рост отрицательного мембранного потенциала (гиперполяризация), значения которого находятся в интервале – 50÷–80 мВ, что соответствует увеличению напряженности поля на мембране $\sim 10^7$ В/м.

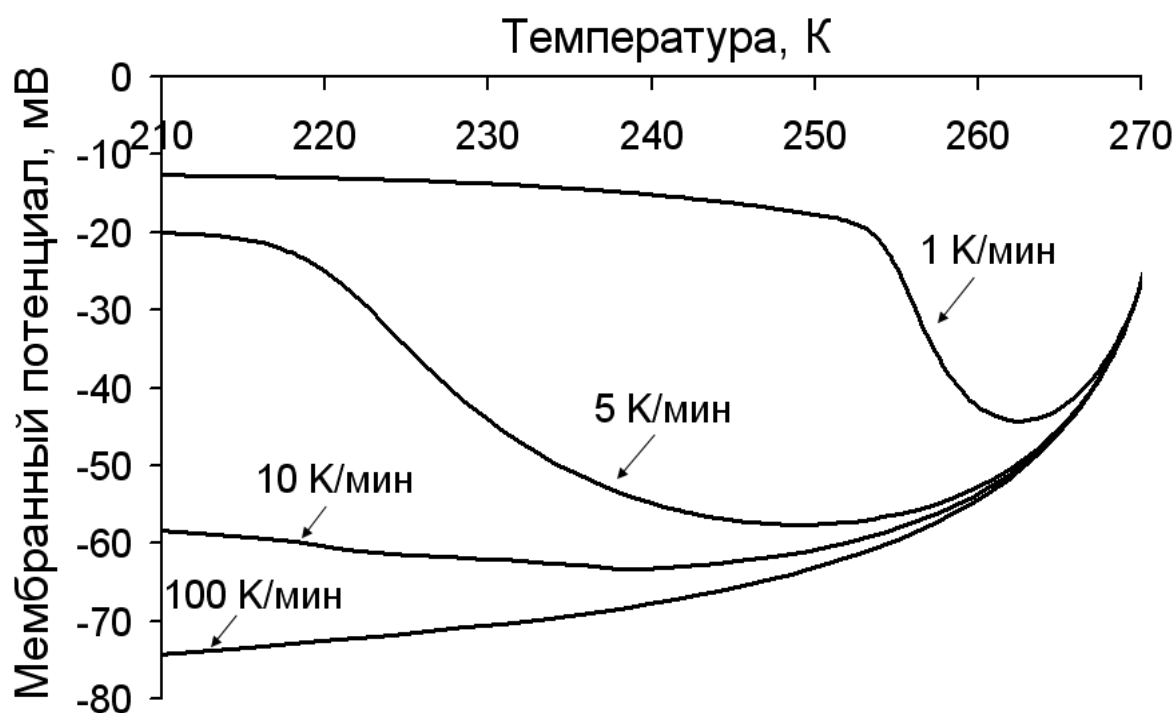


Рис. 3.1.14. Изменение мембранного потенциала ооцита мыши в процессе охлаждения с разными скоростями в 1 М растворе ЭГ.

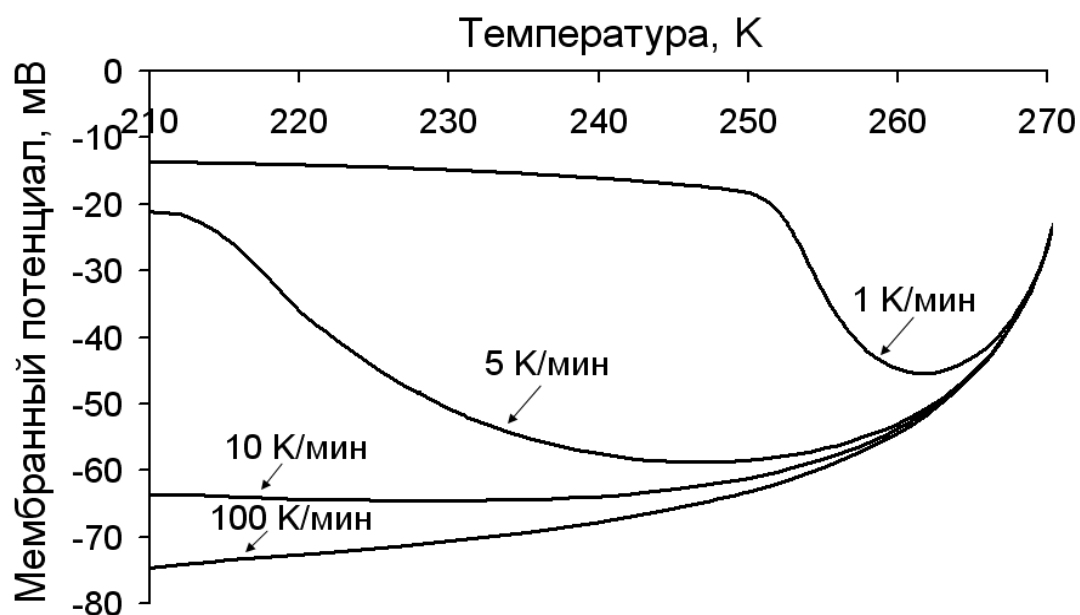


Рис. 3.1.15. Изменение мембранного потенциала двухклеточного эмбриона мышцы в процессе охлаждения с разными скоростями в 1 М ЭГ.

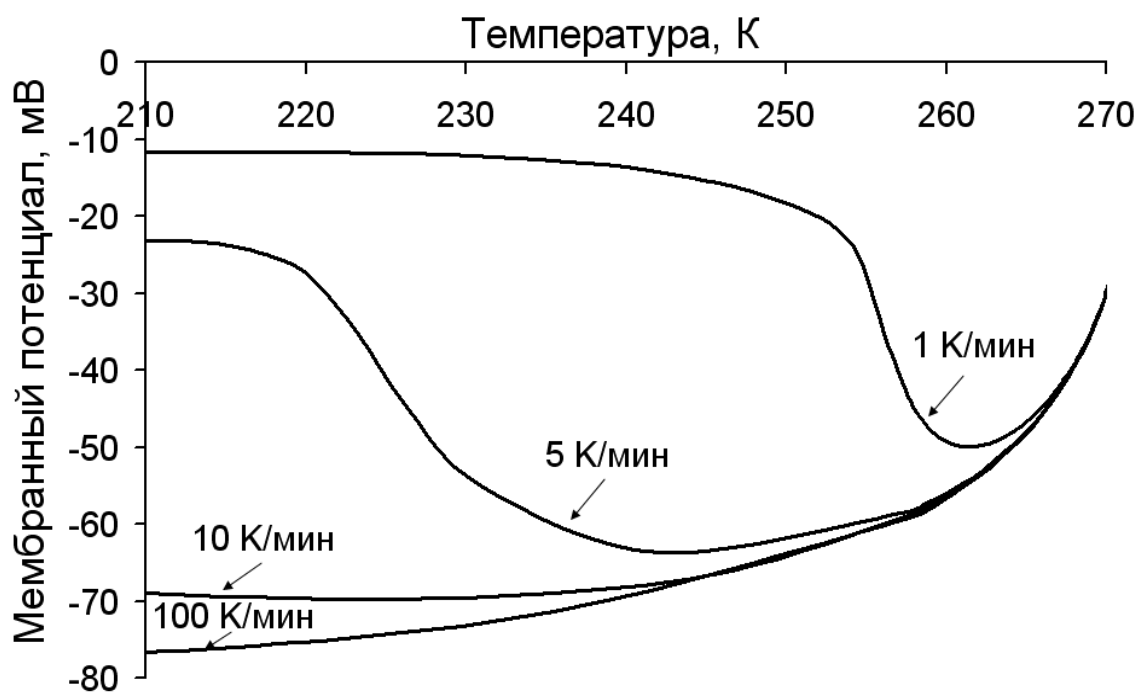


Рис. 3.1.16. Изменение мембранного потенциала двухклеточного эмбриона мышцы в процессе охлаждения с разными скоростями в 1 М ДМСО.

С увеличением скорости охлаждения и с уменьшением концентрации криопротектора в криозащитной среде, мембранный потенциал ооцита и двухклеточного эмбриона мыши в течение охлаждения достигает все больших максимальных значений. Аномально высокие значения сохраняются на мембранах клеток все больший промежуток времени.

Графики на рис. 3.1.14 – 3.1.16 не сильно отличаются друг от друга, очевидно из-за того, что величины проницаемости мембран клеток для молекул ЭГ и ДМСО близки. Что касается увеличения мембранного потенциала (для скоростей охлаждения 1 К/мин и 5 К/мин) с последующим его уменьшением при снижении температуры, то это, очевидно, связано с выходом ионов (K^+ и Na^+) из клетки в процессе охлаждения.

Наши расчеты хорошо согласуются с литературными данными. Так в работе [8] компьютерное моделирование показало, в начальном периоде льдообразования (при $-1^{\circ}C$) быстрый рост внеклеточных кристаллов приводит к резкому возрастанию потенциала мембраны ооцитов мыши в метафазе II. При замораживании со скоростью охлаждения 120 К/мин мембранный потенциал ооцитов может достигать -90 мВ. В то же время мембранный потенциал покоя ооцита равен $-38,4$ мВ [174]. Ниже этой величины может наступать электрический пробой мембраны.

Благодаря рассчитанным зависимостям мембранного потенциала клеток от температуры легко установить, какое количество времени клеточная мембрана находится под действием того или иного перепада электрического потенциала. Соответствующие данные представлены на рис. 3.1.17.

Характер поведение клеток (изменение мембранного потенциала и объема) в растворах ДМСО и ЭГ аналогично, потому как фазовые диаграммы и молекулярных вес этих криопротекторов различаются незначительно. Оба криопротектора успешно используют для криоконсервирования ооцитов и эмбрионов.

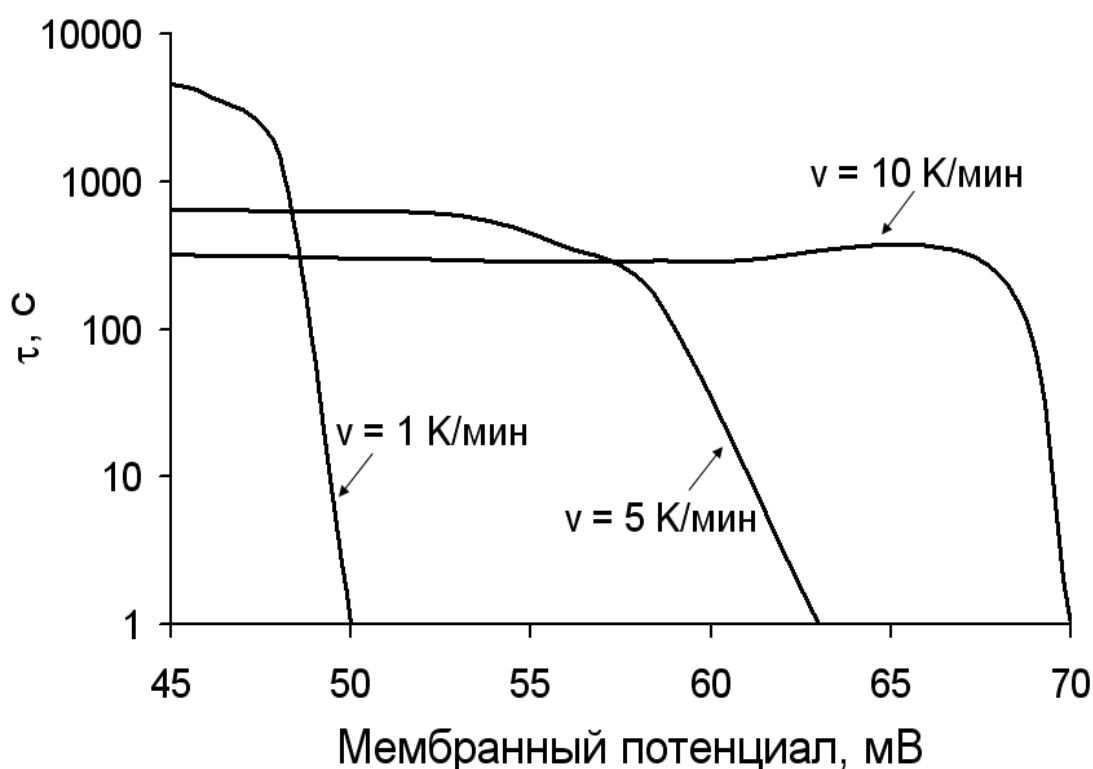


Рис. 3.1.17. Зависимость среднего времени образования поры от электрического потенциала на мембране двухклеточного эмбриона мыши при охлаждении с разными скоростями в 1 М растворе ДМСО.

Созданная модель описывает трансмембранный перенос веществ между клетками и окружающей средой в процессе низкотемпературного консервирования клеточной суспензии и учитывает влияние на эти процессы экспозиции клеток в растворах криопротекторов, скорости охлаждения, геометрические и транспортные характеристики клеток.

Материалы подраздела 3.1 опубликованы в работах [175, 176].

3.2. Усовершенствованная модель электрического пробоя клеточных мембран

На втором этапе исследования для того, чтобы ответить на вопрос, происходит электрический пробой мембран при том или ином режиме замораживания, кратко рассмотрим современные теоретические представления об электрическом пробое клеточных мембран. Основные положения теории электрического пробоя бислойных липидных мембран сформулированы Ю. А. Чизмаджевым с коллегами в серии научных работ [127–133]. Сформулированная этими авторами теория опирается на расчет зависимости свободной энергии $F(a)$ от радиуса a гидрофильной цилиндрической поры, которая пронизывает липидный бислой. По теории Ю. А. Чизмаджева эта свободная энергия равна

$$F(a) = 2\pi ah\sigma_m - \frac{\pi a^2}{h} \varepsilon_0 (\varepsilon_w - \varepsilon_m) \Delta\varphi_m^2, \quad (3.2.1)$$

где h – толщина клеточной мембраны, σ_m – удельная поверхностная энергия бислоя, ε_0 – электрическая постоянная, ε_w и ε_m – диэлектрическая проницаемость воды и липидного бислоя соответственно, $\Delta\varphi_m$ – мембранный потенциал.

Наличие первого слагаемого в правой части равенства (3.2.1) обусловлена пропорциональным радиусу поры увеличением поверхности контакта липидного бислоя с водным раствором, который заполняет пору, вследствие чего поверхностная энергия системы повышается.

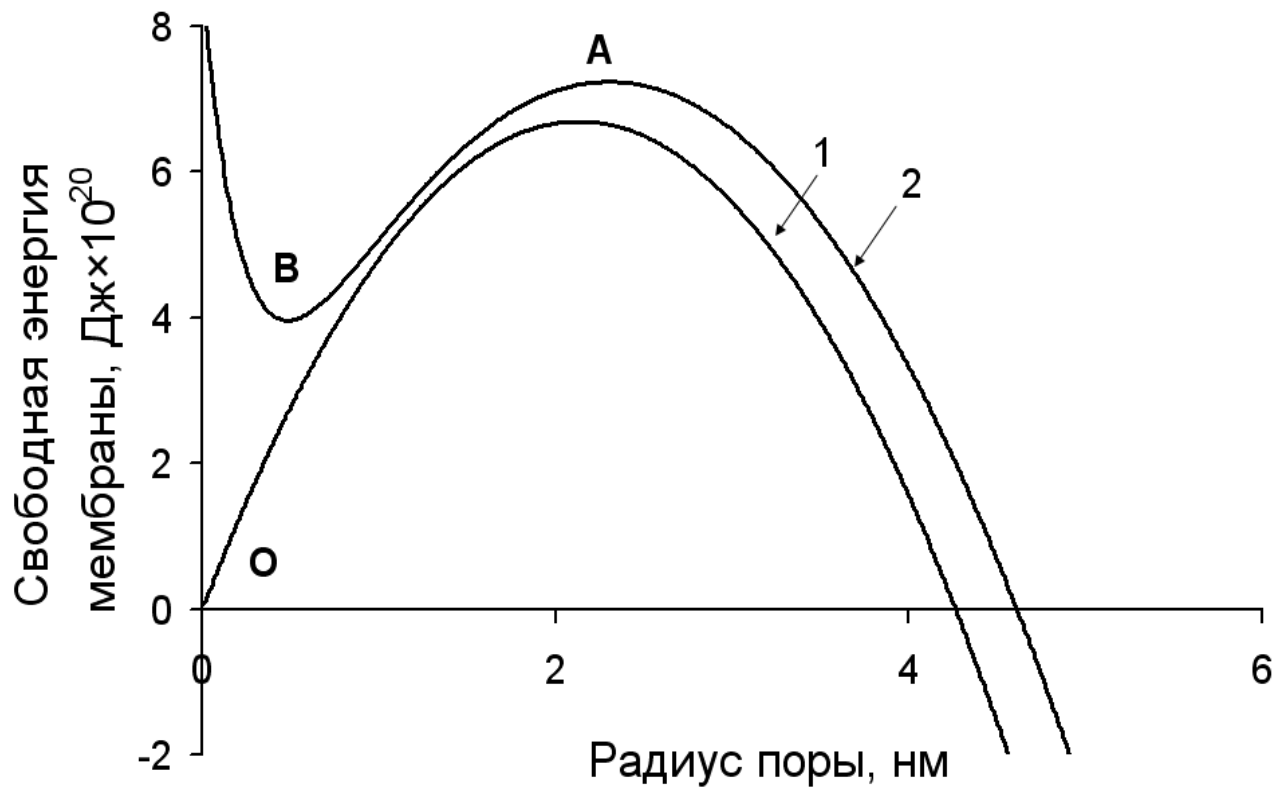


Рис. 3.2.1. Зависимость свободной энергии мембраны от размера мембранной поры: 1 – без учета гидратационного отталкивания между головками липидов, выстилающих стенку мембранной поры; 2 – с учетом гидратационного отталкивания.

Второе слагаемое уравнения $-\frac{\pi a^2}{h} \varepsilon_0 (\varepsilon_w - \varepsilon_m) \Delta \varphi_m^2$ отражает тот факт,

что на боковую поверхность мембранной поры при наличии мембранного потенциала действует электрическая пондеромоторная сила, которая стремится расширить пору. Вследствие противоположного действия этих эффектов график зависимости $F = F(a)$ имеет вид, показанный на рис. 3.2.1, 1. Как видно, свободная энергия мембраны как функция радиуса поры достигает

максимума при некотором (критическом) радиусе поры $a_c = \frac{2\gamma h}{\varepsilon_0 (\varepsilon_w - \varepsilon_m) \varphi_m^2}$,

где γ – линейная плотность свободной энергии кромки мембранной поры. Потом, с увеличением радиуса поры свободная энергия мембраны монотонно уменьшается.

В соответствии с принципом минимума свободной энергии в отсутствие трансмембранного потенциала электрического поля термодинамически устойчивым является состояние с нулевым радиусом поры. При наличии мембранного потенциала достаточно большой величины состояние с нулевым радиусом становится метастабильным. В соответствии с принципом минимума свободной энергии, если за счет тепловых флуктуаций радиус поры достигнет большего, чем критическое, значения ($a > a_c$), происходит спонтанный разрыв мембраны, то есть возникает ее электрический пробой.

Для того чтобы электрический пробой произошел, мембрана как термодинамическая система должна преодолеть энергетический барьер

$$\Delta F_{\max} = \frac{2\pi\gamma^2}{\varepsilon_0(\varepsilon_w - \varepsilon_m)\varphi_m^2}. \text{ Как видно (рис. 3.2.1, 2), высота этого барьера}$$

уменьшается по мере увеличения величины мембранного потенциала. Вместе с уменьшением высоты барьера ОА и увеличением (по абсолютной величине) мембранного потенциала, время, за которое происходит разрыв мембраны под действием внутримембранной напряженности электрического поля, также уменьшается. Расчет этого времени на основе теории процессов активационного типа осуществляется по общеизвестному механизму [141].

Теория электрического пробоя биомембран Ю. А. Чизмаджева не учитывает существование очень сильных короткодействующих гидратационных сил отталкивания между липидными бислоями [177], которым соответствует увеличение свободной энергии приближающихся друг к другу по

экспоненциальному закону $\Delta F = A \exp\left(-\frac{l}{\delta}\right)$, где A – работа по сближению

бислоев, l – расстояние между липидными бислоями, δ – максимальное расстояние взаимодействия сил отталкивания, которое приблизительно равно

0,25 нм. Физической причиной гидратационного отталкивания является необходимость затраты сравнительно большой работы на отрыв гидратированных полярными головками липидов молекул воды для достижения непосредственного контакта между липидными бислоями. Гидратационная сила препятствует уменьшению радиуса гидрофильной мембранной поры до нуля даже в отсутствие мембранного потенциала. С учетом силы гидратационного отталкивания зависимость свободной энергии мембраны от радиуса гидрофильной мембранной поры определяется функцией

$$F(a) = 2\pi ah\sigma_m - \frac{\pi a^2}{h} \varepsilon_0 (\varepsilon_w - \varepsilon_m) \Delta \varphi_m^2 + A \exp\left(-\frac{a}{\delta}\right),$$

график этой функции представлен на рис. 3.2.1, 2.

Таким образом, даже в отсутствие мембранного потенциала стабильной является мембранная пора с отличным от нуля радиусом поры a_0 . По данным работ [178, 179] $a_0 \approx 0,5$ нм, что при $h = 5 \times 10^{-9}$ м, $\sigma_m = 0,004$ Дж/м², что приводит к значению $A \approx 8 \times 10^{-20}$ Дж. Существование гидрофильных пор с размером $\approx 0,5$ нм в цитоплазматических мембранах клеток согласуется с экспериментальными данными о большей электропроводности клеточных мембран по сравнению с искусственными БЛМ, объясняет возможность перемещения мембранных компонентов из одного монослоя в другой монослой по кромке мембранных пор, а также высокую проницаемость молекул диметилсульфоксида, этиленгликоля, 1,2-пропандиола по сравнению с криопротекторами, эффективный размер молекул которых превышает 0,5 нм.

Одним из наиболее существенных следствий существования сил гидратационного отталкивания между липидами, расположенными в стенке гидрофильной поры, является понижение высоты барьера, который система должна преодолеть, чтобы мембрана разорвалась: $OA > BA$ (рис. 3.2.1).

Расчет времени, за который осуществляется разрыв мембраны при заданном значении мембранного потенциала осуществлялся по известному алгоритму [141].

$$t = \frac{\pi k T}{D \left(-\frac{d^2}{da^2} F(a_{\min}) \frac{d^2}{da^2} F(a_{\max}) \right)^{\frac{1}{2}}} \exp \frac{F(a_{\max}) - F(a_{\min})}{kT}$$

где k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, D – коэффициент диффузии системы в пространстве размера поры, $F(a_{\max})$ и $F(a_{\min})$ – значения свободной энергии мембраны соответственно в максимуме А и в минимуме В (рис. 3.2.1). Вторые производные $-\frac{d^2}{da^2} F(a_{\min})$ и $\frac{d^2}{da^2} F(a_{\max})$ определялись численно как коэффициенты при квадрате радиуса поры в квадратичных полиномах, аппроксимирующих функцию $F(a)$ в окрестности ее экстремумов.

Значения параметров, использованных при компьютерном моделировании процесса электропорации ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши приведены в таблице 3.2.1.

Таблица 3.2.1.

**Значения параметров, использованных при компьютерном моделировании
процесса электропорации ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши**

Наименование величины	Обозначение	Численное значение
1	2	3
Модуль изотропного растяжения мембраны	Γ	0,5 Н/м
Модуль растяжения мембраны при постоянной площади	μ	5×10^{-5} Н/м
Радиус ооцита мыши	r_o	$35,5 \times 10^{-6}$ м
Радиус бластомера в двухклеточном эмбрионе мыши	r_b	28×10^{-6} м
Линейная плотность свободной энергии кромки мембранной поры	γ	10^{-12} Н
Диэлектрическая проницаемость мембраны липосомы или клетки	ε_m	2
Диэлектрическая проницаемость водного внеклеточного и внутриклеточного раствора	ε	80
Электрическая постоянная	ε_0	$8,854 \times 10^{-12}$ Кл ² /м ² Н
Толщина мембраны	h	10^{-8} м

1	2	3
Диаметр zona pellucida яйцеклетки мышы	L	$1,15 \times 10^{-4}$ м
Радиус мембранной поры в недеформированной мембране яйцеклетки	a_0	$35,5 \times 10^{-10}$ м
Температура	T	293,15 К
Постоянная Больцмана	k	$1,38 \times 10^{-23}$ Н·м/К
Коэффициент диффузии в пространстве размера поры	D	5×10^{-14} м ² /с

Расчитаная таким образом зависимость времени, за которое происходит разрыв мембраны, от величины собственного мембранного потенциала клетки имеет вид (рис. 3.2.2).

Важной особенностью этой зависимости является то, что разрыв мембраны наступает не только при больших значениях мембранного потенциала, но и при сравнительно небольших значениях мембранного потенциала, если они сохраняются достаточно длительный промежуток времени. Приведенная на рис. 3.2.2 кривая делит площадь рисунка на две области: область выше этой кривой соответствует условиям, при которых электрический пробой мембран в процессе замораживания происходит, а если временная зависимость мембранного потенциала лежит ниже кривой, электрического пробоя мембран не происходит.

Следует подчеркнуть, что экспериментальные данные об электрическом пробое биомембран в подавляющем большинстве получены при действии на

мембрану очень коротких (до мс) прямоугольных импульсов внешнего электрического поля, при которых напряженность электрического пробоя биомембран слабо зависит от продолжительности существования на мембране аномально высоких значений мембранного потенциала.

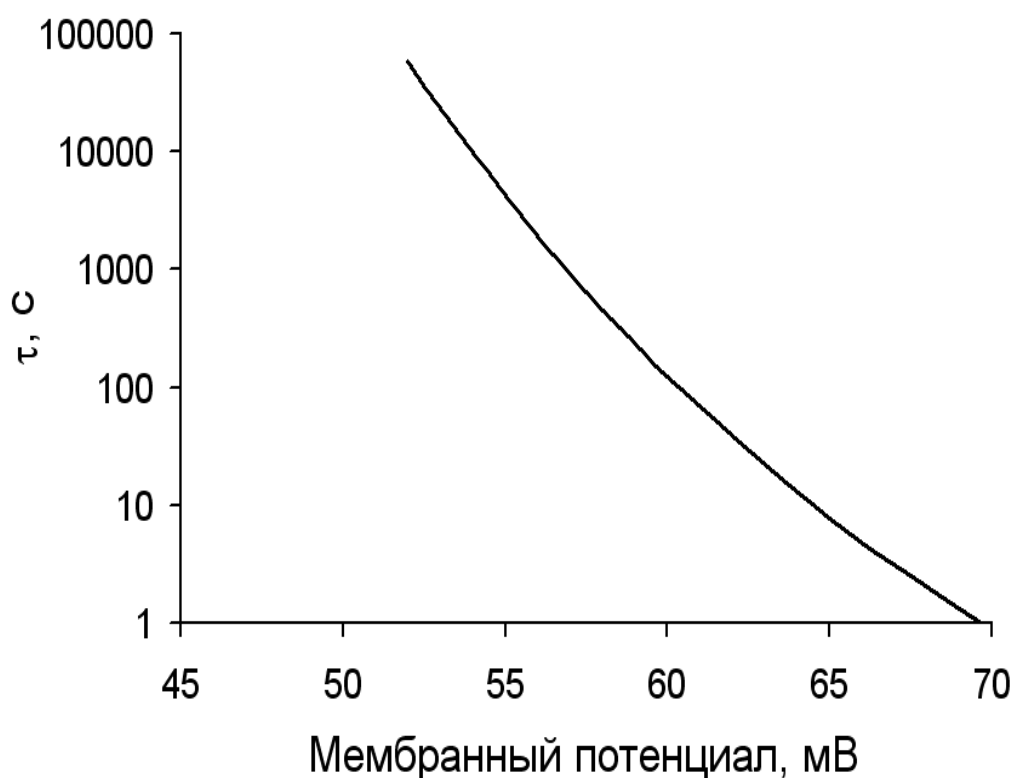


Рис. 3.2.2. Зависимость среднего времени образования поры в клеточной мембране от приложенного к ней мембранного потенциала.

Совместим полученные в предыдущем разделе расчеты зависимости продолжительности экспозиции клеток при разных значениях мембранного потенциала в процессе их замораживания (рис. 3.1.17) и зависимость, представленную на предыдущем рисунке (рис. 3.2.2). Смещенные таким образом кривые представлены на рис. 3.2.3.

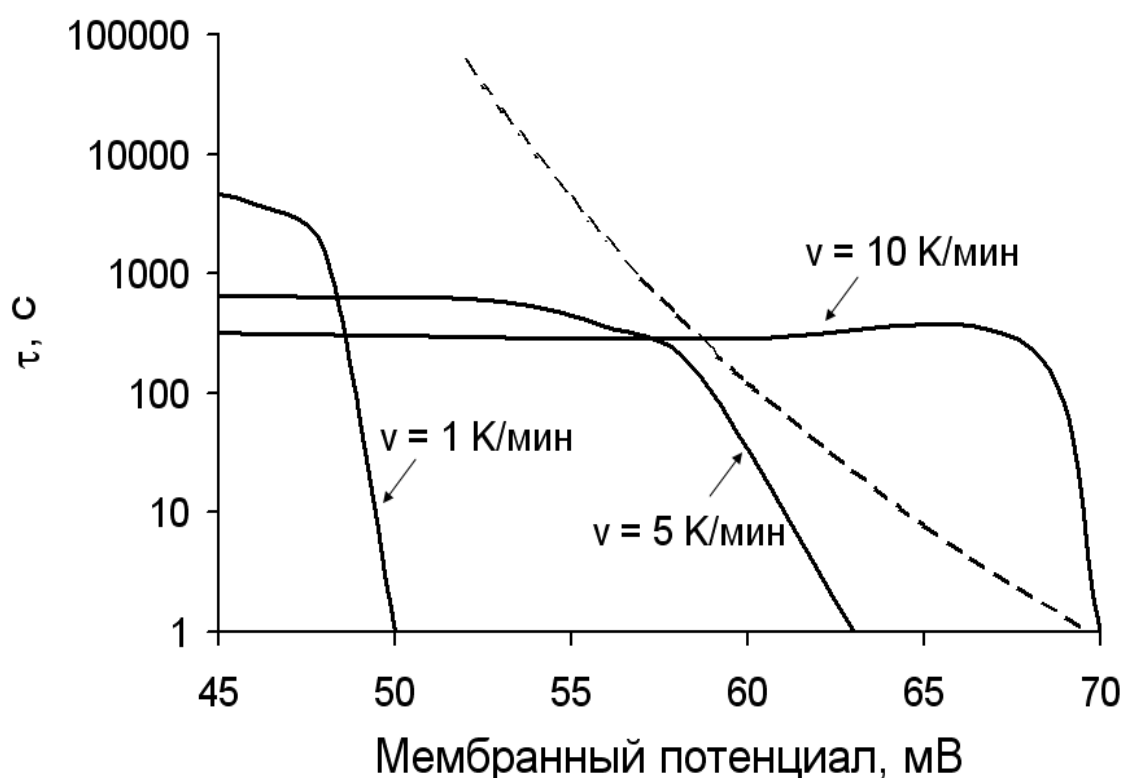


Рис. 3.2.3. Зависимость среднего времени образования поры в клеточной мембране от приложенного к ней мембранного потенциала при охлаждении двуклеточного эмбриона мыши с учетом сил гидратационного отталкивания.

Понятно, что критерием повреждения клеток при замораживании путем электрического пробоя их мембран является пересечение соответствующей данному режиму замораживания кривой со штриховой линией. Очевидно, что если при охлаждении двуклеточного эмбриона мыши под защитой 1 М раствора диметилсульфоксида скорость охлаждения превышает значение 5 К/мин., его мембрана повреждается путем электрического пробоя, тогда как при меньших скоростях охлаждения электрического пробоя мембран не происходит. Как видно из графика при скорости охлаждения 10 К/мин электрический пробой мембраны в среднем возникает через 320 с.

Таким образом, использование созданной модели для анализа явлений, которые происходят в результате низкотемпературного консервирования, позволяет определить причины влияния скорости охлаждения на электрический пробой клеточных мембран.

Использованный нами алгоритм компьютерного расчета условий криоконсервирования, при которых наступает электрический пробой мембран, является универсальным и может быть для любой клеточной суспензии.

Материалы подраздела 3.2 опубликованы в работах [180 – 185].

3.3. Экспериментальное изучение электрического пробоя двухклеточных эмбрионов мыши до и после экспозиции в криозащитных растворах и после полного цикла криоконсервирования методом витрификации

Основной мишенью действия неблагоприятных факторов криоконсервирования являются плазматические мембраны клеток, поэтому расширение набора клеточных параметров, которые бы отражали состояние мембран на различных этапах протокола криоконсервирования является актуальной задачей современной криобиологии. Известно, что напряжение, при котором происходит электрический пробой мембран, может быть информативным параметром, так как изменения в структуре мембраны под действием различных факторов отражаются на значении критического напряжения электрического пробоя [6].

В задачу исследований этого раздела входило изучение влияния различных этапов протокола криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль – сахарозной среде на электрическую проводимость двухклеточных эмбрионов мыши. Экспериментально методом импульсной кондуктометрии было изучено влияние на электрическую проводимость двухклеточных эмбрионов мыши экспозиции клеток в криозащитной среде и полного этапа криоконсервирования методом витрификации. В первой серии

экспериментов эмбрионы после 5–минутной экспозиции в 10%–м растворе этиленгликоля были экспонированы в этиленгликоль–сахарозной среде (30% ЭГ + 0,7 М раствор сахарозы) в течение 1,5 и 3 минут. Во второй серии экспериментов двухклеточные эмбрионы мыши, после 5–минутной экспозиции в 10%–м растворе ЭГ и экспозиции в этиленгликоль–сахарозной среде в течение 1,5 мин и 3 мин подверглись охлаждению до температуры 77 К, хранению в жидком азоте в течение 7 дней, последующему отогреву при 311 К и отмывке клеток от криопротектора.

На рис. 3.3.1 и 3.3.2 представлены экспериментальные данные зависимости удельной электрической проводимости отдельных двухклеточных эмбрионов мыши контрольной группы от напряженности электрического поля. Как видно, электропроводность эмбрионов монотонно повышается по мере увеличения амплитуды прямоугольных импульсов электрического поля. При этом наблюдаются флуктуации величины проводимости, которые свидетельствуют о незначительных спонтанных колебаниях радиуса мембранных пор вблизи значения, которое соответствует локальному минимуму свободной энергии плазматических мембран бластомеров. При относительно небольших значениях напряженности поля $0,5\text{--}1 \times 10^5$ В/м электрическая проводимость отдельных эмбрионов характеризуется близкими значениями. По мере увеличения амплитуды подаваемого импульса значения проводимости для отдельных эмбрионов характеризуются большим разбросом, что отражает индивидуальные особенности эмбрионов на действие электрического поля (рис. 3.3.1, а).

Значения электрической проводимости начиная с напряженности поля $1,2 \times 10^5$ В/м достоверно ($p \leq 0,05$) превышают начальные значения (рис. 3.3.2), что свидетельствует о нарастающей порации плазматических мембран эмбрионов [7].

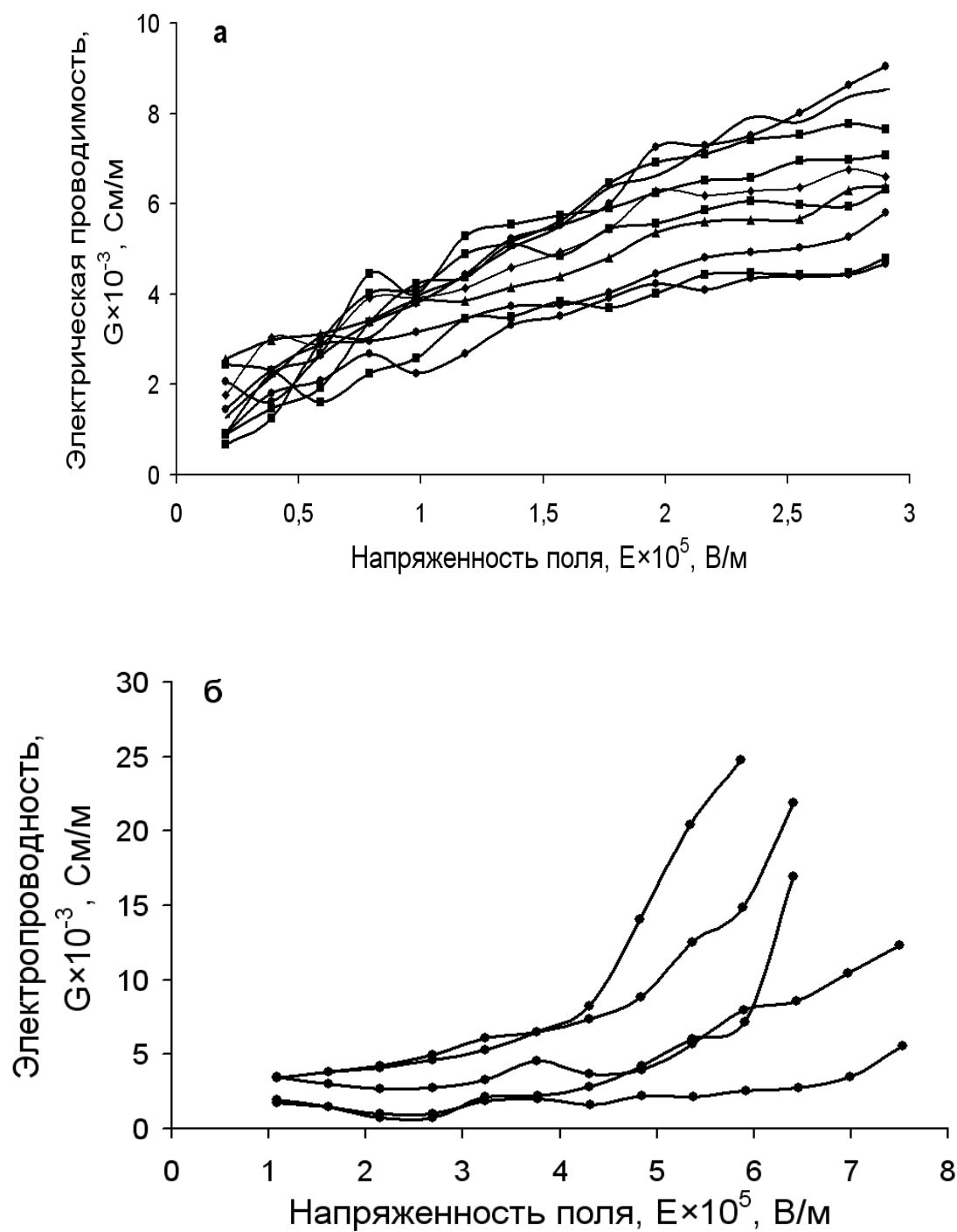


Рис. 3.3.1. Характерные зависимости удельной электрической проводимости отдельных двухклеточных эмбрионов мышцы контрольной группы от напряжения ИЭП: а – в диапазоне напряженности ИЭП $0,2\text{--}3 \times 10^5$ В/м; б – в диапазоне напряженности ИЭП $1\text{--}8 \times 10^5$ В/м.

В этом диапазоне напряженностей электрического поля необратимого электрического пробоя и лизиса бластомеров не наблюдалось, что свидетельствует о достаточно высокой устойчивости двухклеточных эмбрионов мыши контрольной группы к действию импульсов электрического поля.

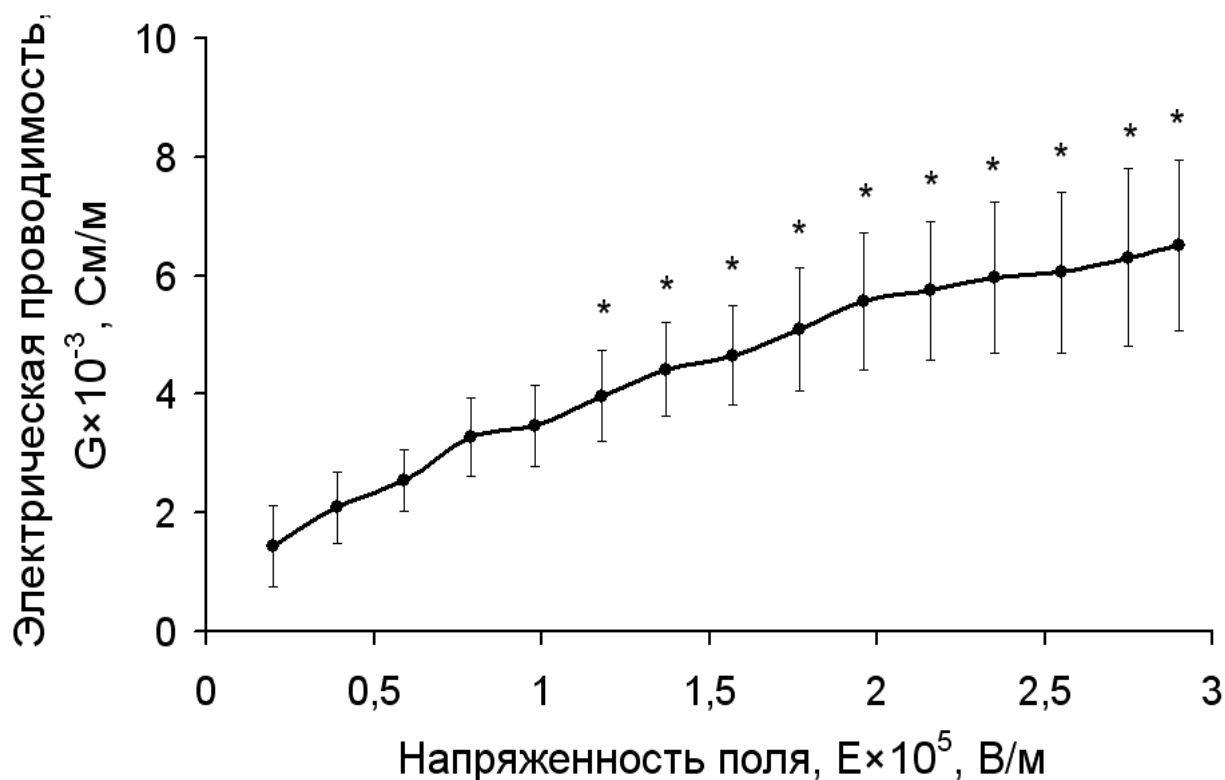


Рис. 3.3.2. Усредненная зависимость удельной электрической проводимости двухклеточных эмбрионов мыши контрольной группы от напряжения ИЭП. Примечание: * — статистически достоверное отличие по сравнению с электропроводностью при напряженности поля $0,2 \times 10^5$ В/м, $p \leq 0,05$.

При превышении значений напряженности поля 3×10^5 В/м для большинства эмбрионов наблюдается резкий рост проводимости, что свидетельствует о развитии необратимого электрического пробоя. При этом наблюдается лизис бластомеров (рис. 3.3.1, б).

Под напряженностью электрического поля на рис. 3.3.1 и далее имеется в виду величина $\Delta\phi/L$, где $\Delta\phi$ – разность электрического потенциала между электродами электропоратора, L – расстояние между электродами.

Как видно из представленных данных, в области напряженностей поля $0,2\text{--}3 \times 10^5$ В/м средние значения электрической проводимости двуклеточных эмбрионов этой группы при увеличении амплитуды подаваемого импульса меняются в диапазоне значений $((1,4 \pm 0,6) \div (6,5 \pm 1,4)) \times 10^{-3}$ См/м (рис. 3.3.2).

Рис. 3.3.3 и 3.3.4 иллюстрируют характер изменения электропроводности эмбрионов I-й экспериментальной группы, для которой время экспозиции клеток в этиленгликоль–сахарозной среде составило 1,5 минуты.

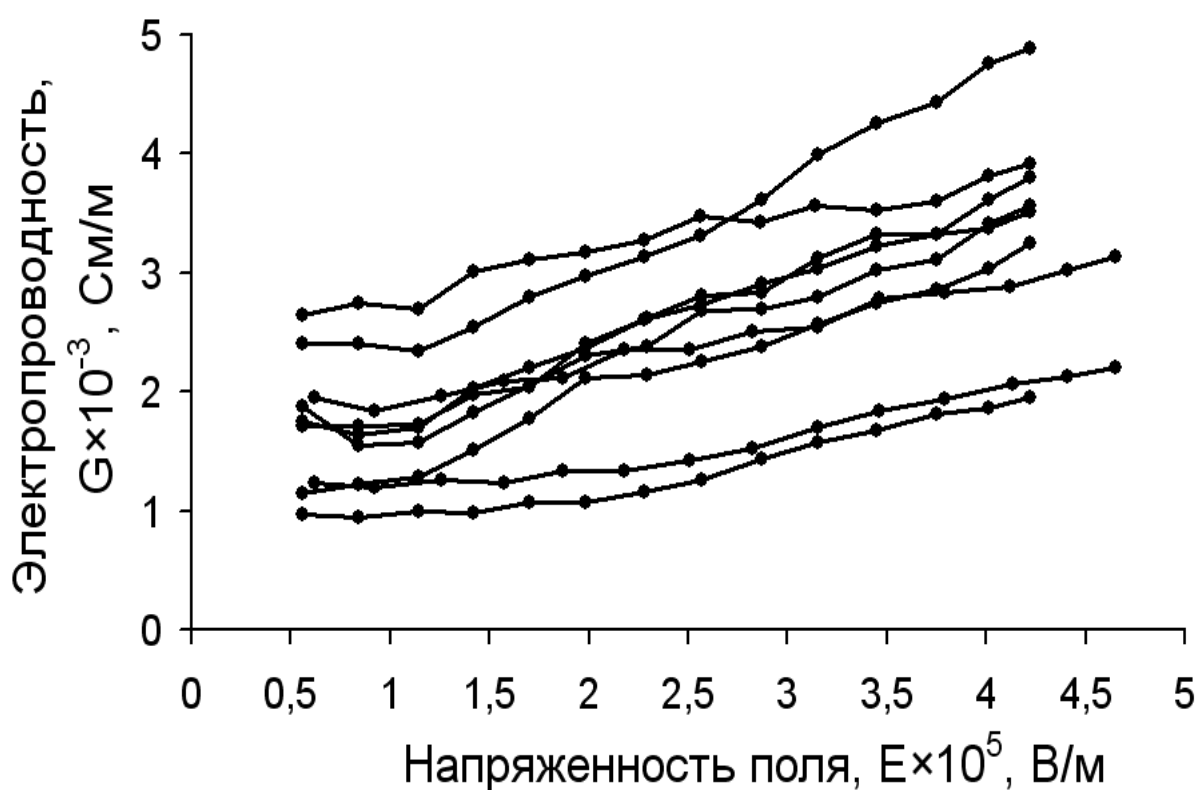


Рис. 3.3.3. Характерные зависимости электрической проводимости отдельных двуклеточных эмбрионов мыши от напряженности электрического поля после полутораминутной экспозиции в среде витрификации.

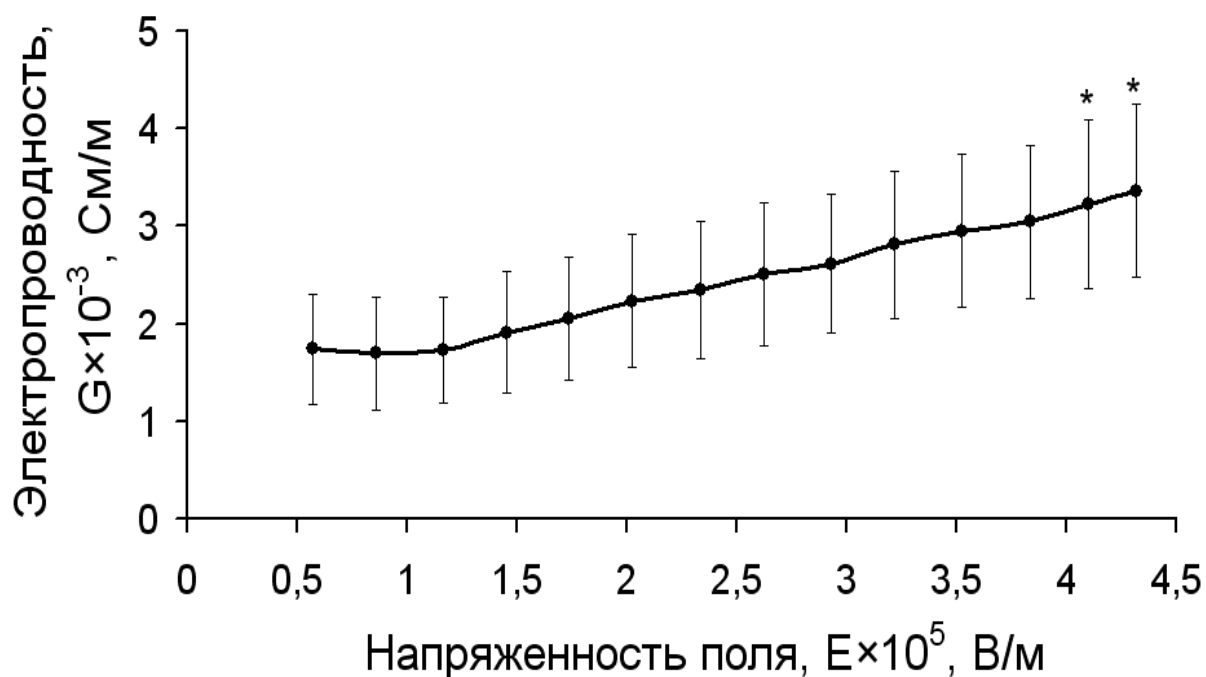


Рис. 3.3.4. Усредненная зависимость электрической проводимости двухклеточных эмбрионов мыши от напряженности электрического поля после полутораминутной экспозиции в среде витрификации. Примечание: * — статистически достоверное отличие по сравнению с электропроводностью при напряженности поля $0,5 \times 10^5$ В/м, $p \leq 0,05$.

Как видно из представленных данных зависимость электропроводности от напряженности поля носит также монотонно возрастающий характер, близкий к линейному.

Достоверное превышение ($p \leq 0,05$) значений электрической проводимости, эмбрионов, определенных при $4 - 4,5 \times 10^5$ В/м, начальных значений этого параметра (определенных при $0,5 \times 10^5$ В/м) свидетельствует о равномерной порации плазматических мембран эмбрионов без нарушения их структурной целостности.

Средние значения удельной электрической проводимости этой группы практически совпадают со значениями электропроводности эмбрионов контрольной группы и находятся в диапазоне $((1,7 \pm 0,6) \div (3,4 \pm 0,9)) \times 10^{-3}$ См/м (рис. 3.3.4). Полученные результаты свидетельствуют о неповреждающем действии криозащитного раствора на структуру плазматических мембран эмбрионов мыши в данных условиях. Следует отметить, что эмбрионы этой экспериментальной группы, демонстрируют устойчивость к действию электрического импульса вплоть до 5×10^5 В/м, что можно объяснить стабилизирующим действием криопротектора на плазматические мембраны эмбрионов (рис. 3.3.3).

Криопротекторы, оказывают сложное воздействие на клетки. Криопротекторы могут адсорбироваться на плазматической мембране, тем самым увеличивая ее эффективную толщину, взаимодействовать с липидными компонентами, гидрофильными и гидрофобными участками молекул белков, проникать внутрь мембранного бислоя, тем самым изменяя электроизоляционные характеристики плазматической мембраны.

На рис. 3.3.5 и 3.3.6 представлены измеренные нами зависимости электрической проводимости отдельных эмбрионов мыши от напряженности электрического поля после их трехминутной экспозиции в среде витрификации.

В этом случае средние численные значения проводимости эмбрионов в диапазоне напряженностей поля $0,5\text{--}3,5 \times 10^5$ В/м менялись в диапазоне значений $(1,9 \pm 0,4) \div (5,0 \pm 1,7)) \times 10^{-3}$ См/м. Значения электрической проводимости эмбрионов этой группы, определенные при $0,5 \times 10^5$ В/м были недостоверно, но несколько выше по сравнению со значениями электропроводности эмбрионов контрольной и I-й экспериментальной групп (рис. 3.3.6).

Кроме того, когда напряженность электрического поля между электродами превышала значение $3,5 \times 10^5$ В/м, наблюдался резкий рост электрической проводимости значительной части эмбрионов, сопровождающийся лизисом бластомеров, что свидетельствует о необратимом электрическом пробое их плазматических мембран (рис. 3.3.5).

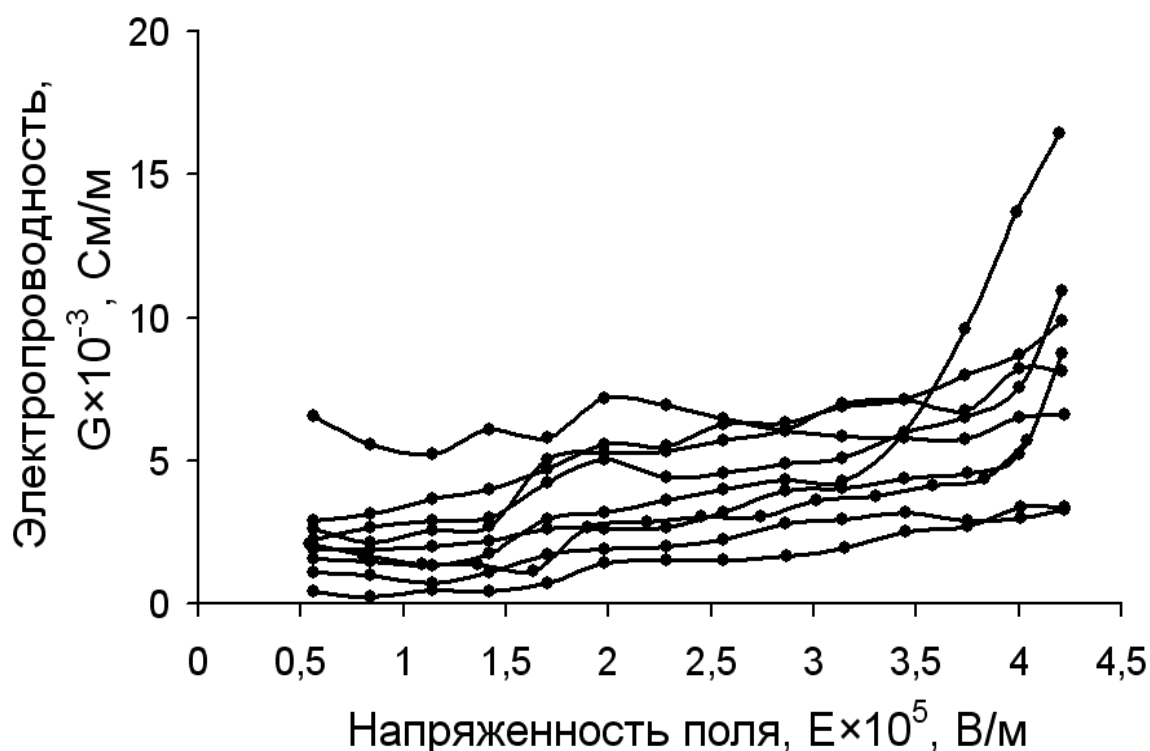


Рис. 3.3.5. Характерные зависимости удельной электрической проводимости отдельных двухклеточных эмбрионов мыши от напряжения ИЭП после трехминутной экспозиции в среде витрификации.

Значения проводимости, определяемые при $2,5 - 3,5 \times 10^5 \text{ В/м}$ достоверно ($p \leq 0,05$) превышают значения, полученные при малых значениях напряженностей поля ($0,5 \times 10^5 \text{ В/м}$). В диапазоне напряженностей $1,4 - 2 \times 10^5 \text{ В/м}$ на кривой проводимости (рис. 3.3.6) появляется участок с точкой перегиба, характерный для слияния бластомеров, как было показано в работе [186].

Можно предположить, что при структурных нарушениях мембраны, которые могут иметь место при длительной экспозиции эмбрионов в среде консервирования, может меняться количество и характер распределения мембранных пор, индуцированных внешним электрическим полем.

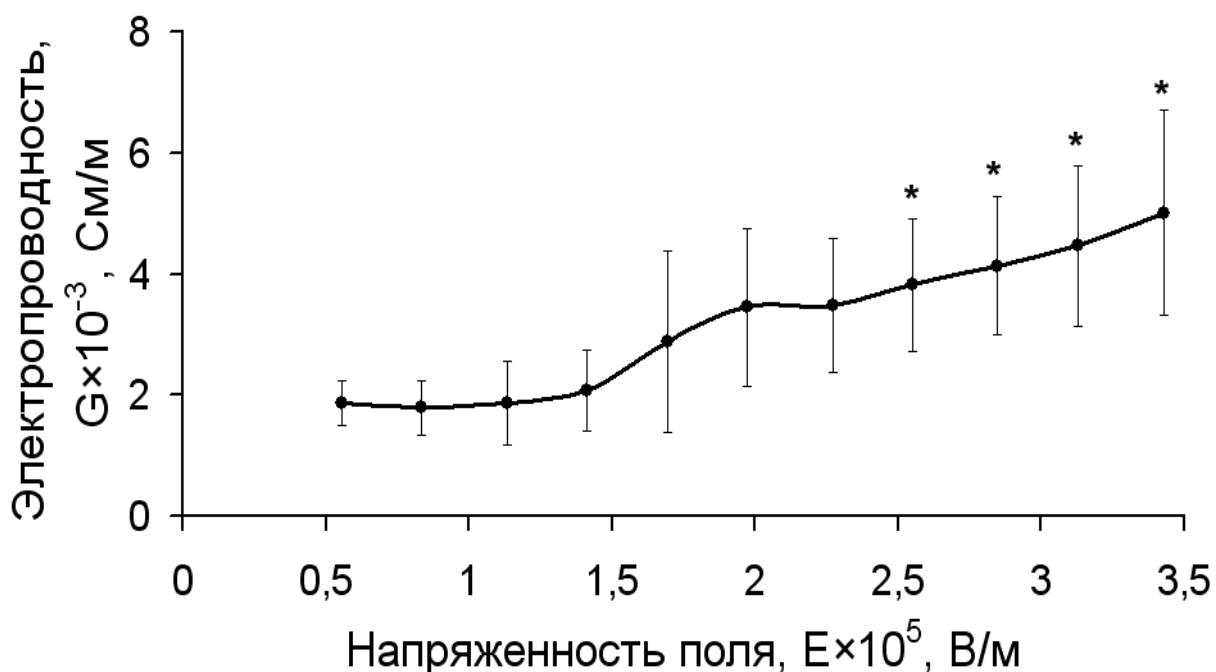


Рис. 3.3.6. Усредненная зависимость удельной электрической проводимости отдельных двуклеточных эмбрионов мыши от напряжения ИЭП после 3-минутной экспозиции в среде витрификации. Примечание: * – статистически достоверное отличие по сравнению с электропроводностью при напряженности поля $0,5 \times 10^5$ В/м, $p < 0,05$.

В следующей серии экспериментов определяли электрическую проводимость и устойчивость двуклеточных эмбрионов мыши к действию импульсов электрического поля после полутораминутной и трехминутной экспозиции в этиленгликоль–сахарозной среде, охлаждения до 77 К, хранения при температуре жидкого азота в течение 7 дней, отогрева на водяной бане при температуре 311 К и отмывки клеток от криопротектора.

На рис. 3.3.7 и 3.3.8 приведены зависимости электрической проводимости двуклеточных эмбрионов от напряженности электрического поля после полутораминутной экспозиции в этиленгликоль – сахарозной среде и последующего охлаждения – отогрева.

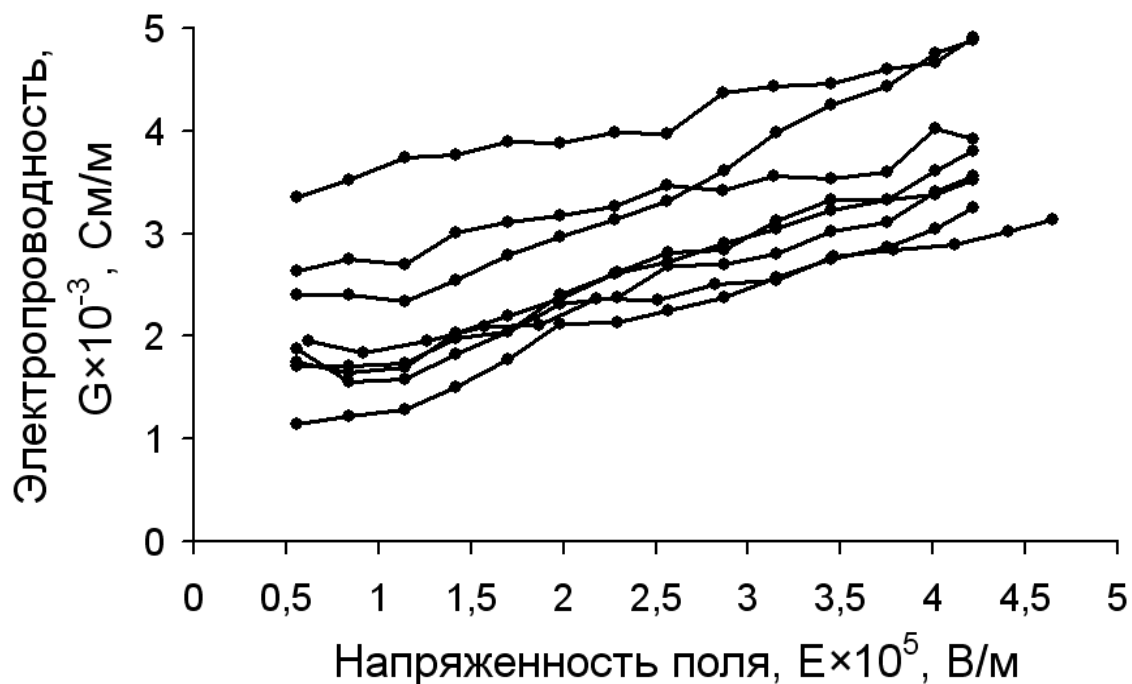


Рис. 3.3.7. Характерные зависимости электрической проводимости отдельных двуклеточных эмбрионов мыши от ИЭП после 1,5–минутной экспозиции клеток в этиленгликоль–сахарозной среде и быстрого охлаждения–отогрева.

Удельная электрическая проводимость эмбрионов этой группы изменялась в следующих пределах: $((2,1 \pm 0,7) \div (3,9 \pm 0,7)) \times 10^{-3}$ См/м. Необратимый электрический пробой и лизис бластомеров не наблюдался (рис. 3.3.8). Достоверное различие ($p \leq 0,05$) между начальными (при $0,5 \times 10^5$ В/м) и конечными (при $4,5 \times 10^5$ В/м) значениями электрической проводимости эмбрионов свидетельствует о нарастающей порации мембран эмбрионов в ответ на увеличение амплитуды электрического импульса.

Следует отметить, что начальные значения электрической проводимости (при $0,5 \times 10^5$ В/м) эмбрионов данной группы достоверно выше ($p \leq 0,05$) значений электропроводности контрольной группы и на уровне тенденции значений этого параметра эмбрионов I–й группы (рис. 3.3.8), что

свидетельствует об изменении электроизоляционных свойств плазматических мембран эмбрионов на этапах охлаждения и отогрева, что в свою очередь можно объяснить изменением кинетики образования мембранных пор и времени их жизни вследствие фазовых переходов мембранных липидов [76].

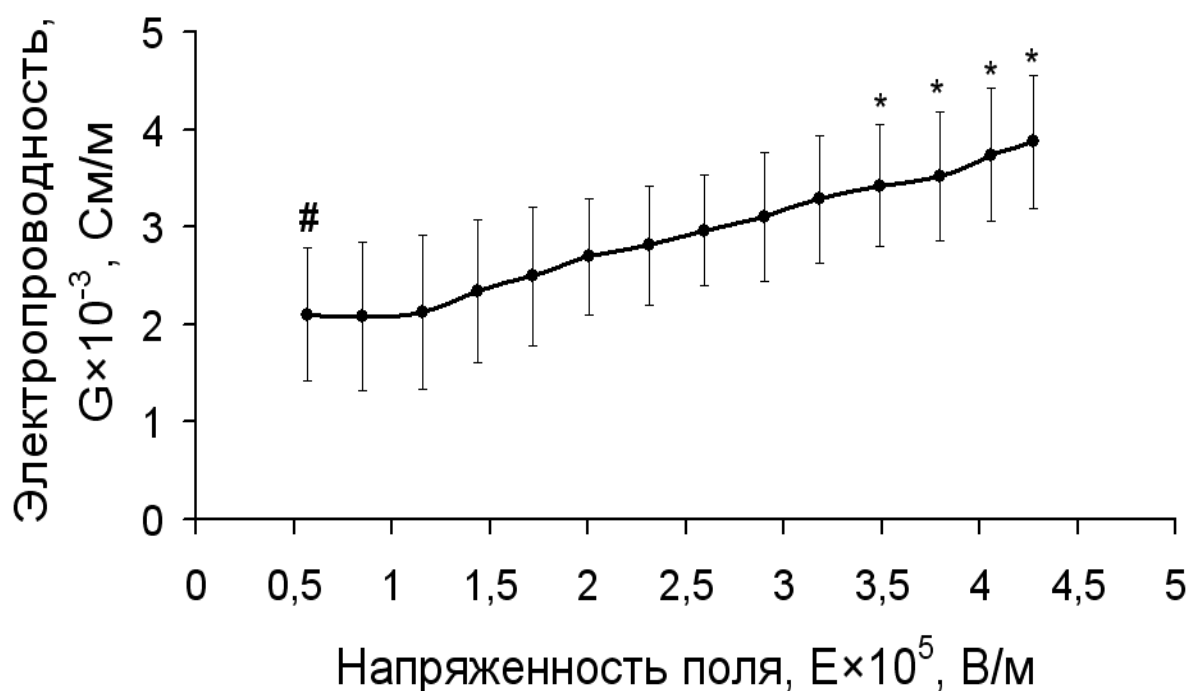


Рис. 3.3.8. Усредненная зависимость электрической проводимости двуклеточных эмбрионов мыши от ИЭП после 1,5–минутной экспозиции клеток в этиленгликоль–сахарозной среде и быстрого охлаждения – отогрева. Примечание: # – статистически достоверное отличие по сравнению с контролем; * – с электропроводностью при напряженности поля $0,5 \times 10^5$ В/м, $p \leq 0,05$.

Рис. 3.3.9 и 3.3.10 иллюстрируют характер изменения электропроводности эмбрионов IV–й экспериментальной группы.

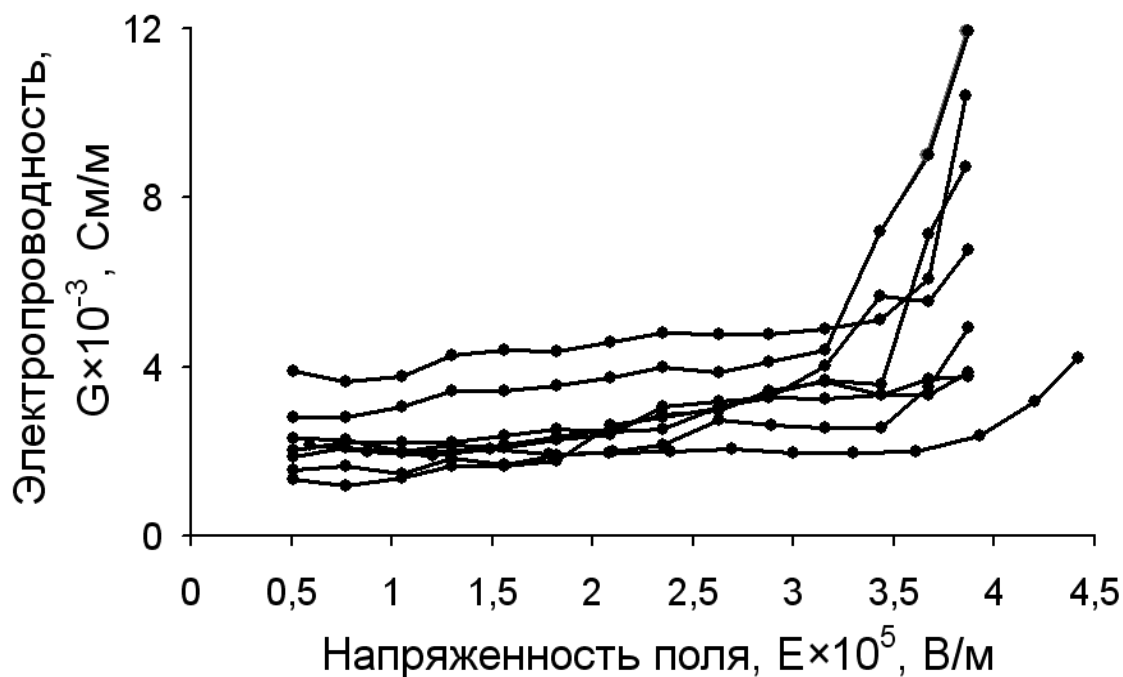


Рис. 3.3.9. Характерные зависимости удельной электрической проводимости отдельных двуклеточных эмбрионов мыши от напряжения ИЭП после 3-минутной экспозиции в среде витрификации и быстрого охлаждения–отогрева.

Перед криоконсервированием клетки выдерживали в среде витрификации 3 минуты. Электропроводность эмбрионов в диапазоне от $0,5$ до 3×10^5 В/м изменялась в пределах $((2,3 \pm 0,9) \div (3,4 \pm 1,2)) \times 10^{-3}$ См/м (рис. 3.3.10). Начальные значения электрической проводимости эмбрионов (определенные при $0,5 \times 10^5$ В/м) после трехминутной экспозиции и быстрого охлаждения – отогрева достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с электропроводностью эмбрионов контрольной группы, недостоверно ($p \geq 0,05$), но существенно выше значений электрической проводимости эмбрионов I-й экспериментальной группы и выше на уровне тенденции значений этого параметра эмбрионов II-й группы.

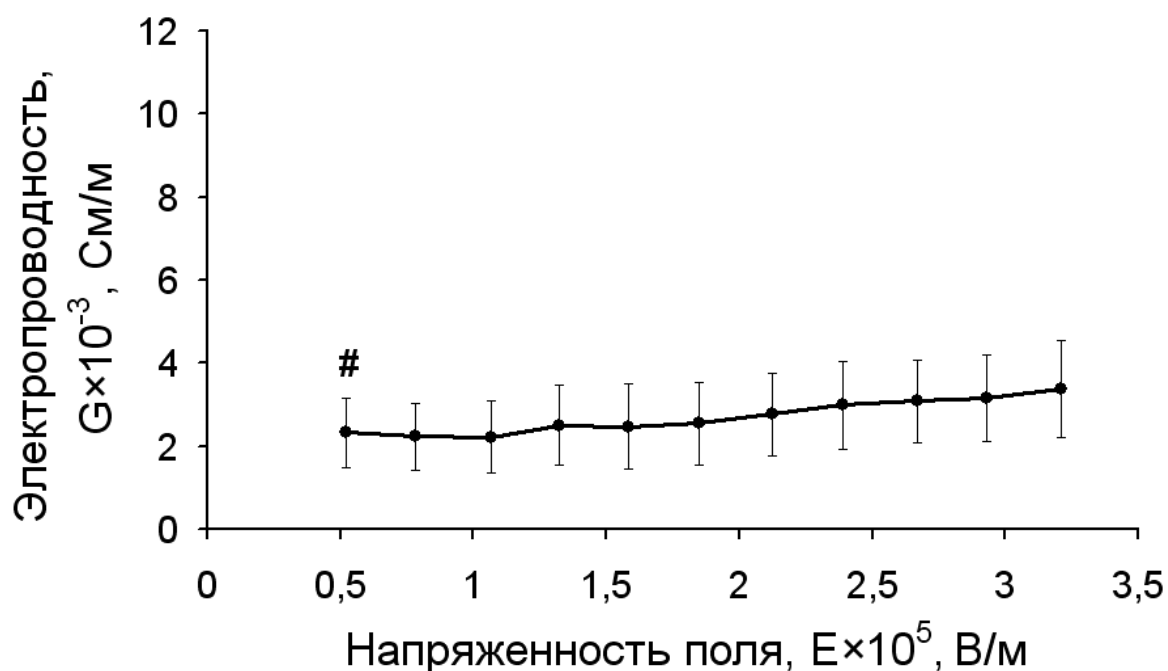


Рис. 3.3.10. Усредненная зависимость удельной электрической проводимости отдельных двухклеточных эмбрионов мыши от напряжения ИЭП после 3–минутной экспозиции в среде витрификации и быстрого охлаждения – отогрева. Примечание: # – статистически достоверное отличие по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$

По достижении напряженности электрического поля значения 4×10^5 В/м электропроводность всех клеток этой экспериментальной группы резко увеличивалась за счет необратимого электрического пробоя мембраны, что приводило к лизису и разрушению бластомеров.

Отсутствие достоверного различия между начальными (при $0,5 \times 10^5$ В/м) и конечными (при $3,5 \times 10^5$ В/м) значениями электрической проводимости (рис. 3.3.10) может свидетельствовать о структурных нарушениях мембран эмбрионов, вызванных как действием чрезмерной экспозиции в этиленгликоль–сахарозной среде, так и этапов охлаждения – отогрева.

В работе [157] было показано, что длительность экспозиции эмбрионов мыши в этиленгликоль – сахарозной среде перед погружением в жидкий азот

существенно влияет на морфофункциональную сохранность эмбрионов. Увеличение экспозиции от 1,5 до 3 мин в среде криоконсервирования приводит к снижению количества развившихся эмбрионов в условиях *in vitro* за счет увеличения доли апоптотических эмбрионов.

Анализ полученных и литературных данных показывает, что этап экспозиции в этиленгликоль – сахарозной среде является наиболее критическим этапом протокола криоконсервирования двухклеточных эмбрионов мышей методом витрификации, оказывающим влияние на структуру и целостность их плазматических мембран, что проявляется в увеличении их электрической проводимости по сравнению с физиологической нормой и нарушении устойчивости к действию импульсного электрического поля. Увеличение времени экспозиции от 1,5 до 3 мин приводит к снижению устойчивости мембран эмбрионов к действию приложенного поля, что отражается в явлении необратимого электрического пробоя. По-видимому, увеличение электрической проводимости плазматических мембран после действия криозащитных растворов может быть следствием изменения проницаемости мембраны для ионов и нарушения ионного гомеостаза, если время экспозиции в этих растворах превышает оптимальное значение. Это согласуется с литературными данными. Ранее методом электронно – зондового микроанализа было показано, что при увеличении времени экспозиции 2–клеточных эмбрионов мыши в этиленгликоль–сахарозной среде от 1,5 до 3 мин происходит трехкратное снижение цитоплазматической концентрации основных неорганических элементов – калия и натрия [187, 188]. Снижение внутриклеточной концентрации этих элементов после экспозиции в среде замораживания приводит к нарушению интегральной целостности мембраны и ее связи с цитоскелетными структурами, что отражается в резком возрастании электрической проводимости и наблюдаемом необратимом электрическом пробое мембраны при воздействии импульсного электрического поля.

Материалы подраздела 3.3 опубликованы в работах [189–199].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Физико – математическое и компьютерное моделирование уже многие годы успешно применяется в области криобиологии для решения множества прикладных и фундаментальных задач. Благодаря этим методам исследования на основе полученных расчетов можно прогнозировать, какие протоколы криоконсервирования являются более эффективными, и тем самым заменить часть реальных экспериментов теоретическими расчетами. Созданная модель учитывает скорость охлаждения, состав криозащитной среды, геометрические и транспортные характеристики клеток, а также позволяет оценить изменение мембранного потенциала клеток. Поэтому физико – математическая модель трансмембранного переноса веществ и электропорации клеток при замораживании клеточной суспензии может быть использована для анализа и трактовки результатов различных криобиологических экспериментов и для прогнозирования оптимальных протоколов криоконсервирования.

В настоящее время явление электропорации клеточных мембран широко применяется не только в прогрессивных биотехнологических и медицинских технологиях, но является актуальным с криобиологической точки зрения. 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. Также на основе модели электрического пробоя клеточных мембран теоретически рассчитано время, за которое происходит электрический пробой мембран при том или ином мембранном потенциале. Например, результаты компьютерного моделирования для конкретных клеток (ооциты и двухклеточные эмбрионы мыши) показывают, что при их замораживании в криозащитном растворе «1 М ДМСО – 0,15 М NaCl – вода» электроизоляционные свойства

цитоплазматических мембран ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши нарушаются при скоростях охлаждения, превышающих 5 К/мин.

Экспериментальная часть работы посвящена изучению условий возникновения обратимого и необратимого электрического пробоя двухклеточных эмбрионов мыши методом электрокондуктометрии. Показано, что устойчивость эмбрионов к электропробою остается практически неизменной в процессе криоконсервирования по стандартному режиму. В случае отклонения (увеличения времени экспозиции) от оптимальных условий, происходит снижение стойкости мембран к электрическому пробую, что подтверждается резким ростом проводимости при напряженности поля $>3,5 - 4 \times 10^5$ В/м. Следовательно, метод электропорации может быть использован как экспресс–тест для оценки сохранности барьерной функции биологических мембран после действия на них экстремальных факторов.

Таким образом, в результате проведенных теоретических и экспериментальных исследований разработана физико–математическая модель, позволяющая наряду с процессами массопереноса в системе «клетка – окружающая среда» оценивать изменение мембранного потенциала на различных этапах низкотемпературного консервирования.

Получены экспериментальные доказательства возможного нарушения электроизоляционных свойств цитоплазматических мембран не только при действии внешнего электрического поля, но и за счет гиперполяризации мембран, возникающей в процессе замораживания.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе представлено теоретическое обобщение и новое решение научной задачи, которое заключается в определении условий нарушения электроизоляционных свойств цитоплазматических мембран при низкотемпературном консервировании клеток. Путем компьютерного моделирования показано, что такие нарушения могут быть вызваны увеличением мембранного потенциала вследствие роста внеклеточной концентрации солевого раствора. Увеличение концентрации внутриклеточного раствора приводит к уменьшению мембранного потенциала, что способствует защите клеток.

1. 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.

2. Теоретически доказано, что учет сил гидратационного отталкивания между липидами в стенке гидрофильной поры, приводит к уменьшению значений мембранного потенциала клеток, при которых происходит нарушение электроизоляционных свойств их цитоплазматических мембран.

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

4. Теоретические расчеты показали, 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 $-50 \div -80$ мВ, что может стать причинной электрического пробоя мембран.

5. Установлено, что теоретически рассчитанная величина напряженности электрического поля на мембранах клеток при замораживании достигает уровня (10^7 В/м), что превышает экспериментально установленный критический порог напряженности поля (4×10^5 В/м), при котором происходит нарушение электроизоляционных свойств цитоплазматических мембран.

6. Показано, что экспозиция двухклеточных эмбрионов мыши в этиленгликоль – сахарозной среде на протяжении 1,5 минут не приводит к необратимому электрическому пробоя 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.

7. Экспериментально установлено, что 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trimarchi J. R. Noninvasive measurement of potassium efflux as an early indicator of cell death in mouse embryos / J. R. Trimarchi, L. Lui, P. J. S. Smith, D. L. Keefe // *Biol. Reprod.* – 2000. – V. 63, №3. – P. 851–857.
2. Pogorelov A. G. Changes in intracellular potassium and sodium content of 2-cell mouse embryos induced by exposition to vitrification concentrations of ethylene glycol / A. G. Pogorelov, I. I. Katkov, E. I. Smolyaninova, D. V. Goldshtein // *Cryo – Letters.* – 2006. – V. 27, №2. – P. 87 – 98.
3. Физические основы низькотемпературного консервирования клеточных суспензий / Е. А. Гордиенко, Н. С. Пушкаръ. – К.: Наук. думка, 1994. – 140 с.
4. Steponkus P. L. Possible role of transient electric fields in freeseing-induced membrane destabilization / P. L. Steponkus, D. G. Stout, J. Wolf, V. E. Loveloe // *J. Membr. Biology.* – 1985. – P. 191 – 198.
5. Zimmermann U. Electric field mediated fusion and related electrical phenomena / U. Zimmermann // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – V. 694, №3. – P. 227 – 277.
6. Chizmadzhev Yu. A. Electric breakdown of bilayer lipid membranes / Yu. A. Chizmadzhev, L. V. Chernomordik, V. F. Pastushenko, I. G. Abidor // *Totals of science and technology. The membrane biophysics.* – 1982. – V. 2. – P. 161 – 266.
7. Weaver J. C. Theory of electroporation: a review / J. C. Weaver, Yu. A. Chizmadzhev // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1996. – V.41, №2. – P. 135 – 160.
8. Toner M. Water transport and estimated transmembrane potential during freezing of mouse oocytes / M. Toner, E. G. Cravalhot, D. R. Armant // *J. Membrane Biol.* – 1990. – V. 115. – P. 261 – 272.
9. Toner M. Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells / M. Toner, E. G. Cravalhot, M. Karel // *J. Appl. Phys.* – 1990. – V. 67. – P. 1582 – 1593.

10. Cole K. S. Membranes, ions and impulses. A chapter of classical biophysics / K. S. Cole. – California University of California Press, Ltd. – London, 1972. – 569 p.
11. Pucihar G. Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electroporabilized cells / G. Pucihar, T. Kotnik, D. Miklavcic, J. Telssie // *Biophys J.* – 2008. – V. 95, №6. – P. 2837 – 2848.
12. Маркин В. С. Индуцированный ионный транспорт / В. С. Маркин, Ю. А. Чизмаджев. – М.: Наука, 1974. – 251 с.
13. Электрическая прочность мембран митохондрий / Ю. А. Владимиров, О. М. Парнев, Е. А. Аннабердыева и др. // *Биол. мембраны.* – 1984. – Т.1, №4. – С. 428 – 434.
14. Zimmermann U. Dielectric breakdown of cell membranes / U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Riemann // *Biophys J.* – 1974. – V. 14, №11. – P. 881 – 899.
15. Tsong T. Y. Electroporation of cell membrane / T. Y. Tsong // *Biophys. J.* – 1991. – V. 60, №2. – P. 297 – 306.
16. Pliquett U. High electrical field effects on cell membranes / U. Pliquett, R. P. Joshi, V. Shidhara, K. H. Schoenbach // *Bioelectrochem.* – 2007. – V. 70, №2. – P. 275 – 282.
17. Coster H. G. L. Direct demonstration of dielectric breakdown in the membranes of *Valonia ultricularis* / H. G. L. Coster, U. Zimmermann // *Z. Naturforsch.* – 1975. – V. 30. – P. 77 – 79.
18. Chang D. C. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy / D.C. Chang., N. S. Reese // *Biophys. J.* – 1990. – V. 58, №1. – P. 1 – 12.
19. Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence microscope / K. Kinoshita, I. Ashikawa, N. Saita et. al. // *Biophys. J.* – 1988. – V. 53, №6. – P. 1015 – 1019.
20. Guide to electroporation and electrofusion / D. C. Chang., B. M. Chassy, J. A. Saunders, A. E. Sowers. – London, Academic Press, Inc., 1992. – 571 p.

21. Teissie J. Mechanisms of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of?) knowledge / J. Teissie // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – V. 1724, №3. – P. 270 – 280.
22. Li J. Numerical simulation of molecular uptake via electroporation / J. Li, H. Lin // *Bioelectrochemistry.* – 2011. – V. 82. – P. 10 – 21.
23. Kotnik T. Lighting-triggered electroporation and electrofusion as possible contributors to natural horizontal gene transfer / T. Kotnik // *Physics of life reviews.* – 2013. – V. 10, №3. – P. 351 – 370.
24. Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates / E. Fattori, M. Cappelletti, I. Zampaglione et. al. // *J. Gene Med.* – 2005. – V. 7, №2. – P. 228 – 236.
25. Intracellular tracking of single-plasmid DNA particles after delivery by electroporation / C. Rosazza, A. Buntz, T. Rieb et. al. // *Mol. Ther.* – 2013. – V. 21, №12. – P. 2217 – 2226.
26. Mechanism of in vivo DNA transport into cells by electroporation: electrophoresis across the plasma membrane may not be involved / F. Liu, S. Heston, L. M. Shollenberger et. al. // *J. Gene Med.* – 2006. – V. 8, №3. – P. 353 – 361.
27. Arabsolghar R. Optimal electroporation condition for small interfering RNA transfection into MDA – MB – 468 cell line / R. Arabsolghar, M. Rasti // *Iran J. Med. Sci.* – 2012. – V. 37, №3. – P. 187 – 193.
28. Combined pulse electroporation – a novel strategy for highly efficient transfection of human and mouse cells / T. Stroh, U. Erben, A. A. Köhl et. al. // *PLoS One.* – 2010. – V. 5, №3. – P. 1 – 8.
29. Antibody-mediated drug delivery systems: concepts, technology, and applications / Y. Pathak, S. Benita. – USA, 2012. – 528 p.
30. Rui M. Transfer of anti-TFAR19 monoclonal antibody into HeLa cells by in situ electroporation can inhibit the apoptosis / M. Rui, Y. Chen, Y. Zhang, D. Ma // *Life Sci.* – 2002. – V. 71, №15. – P. 1771 – 1778.

31. Quantification of propidium iodide delivery using millisecond electric pulses: experiments / M. M. Sadik, J. Li, J. W. Shan et. al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – V. 1828, №4. – P. 1322 – 1328.
32. Breton M. Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments / M. Breton, L. M. Mir // *Bioelectromagnetics.* – 2012. – V. 33. – P. 106 – 123.
33. Reigada R. Electroporation of heterogeneous lipid membranes / R. Reigada // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – V. 1838, №3. – P. 814 – 821.
34. Stämpfli R. Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a Ranvier node / R. Stämpfli // *An. Acad. Bras. Ciens.* – 1958. – V. 30. – P. 57 – 63.
35. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores / R. W. Glaser, S. L. Leikin, L. V. Chernomordik et. al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – V. 940, №2. – P. 275 – 287.
36. Cell membrane electroporation — Part 1: The phenomenon / T. Kotnik, P. Kramar, G. Pucihar et. al. // *IEEE Electr. Insul. M.* – 2012. – V. 28, № 5. – P. 14 – 23.
37. Golberg A. Nonthermal irreversible electroporation: fundamentals, applications, and challenges / A. Golberg, M. L. Yarmush // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* – 2013. – V. 60. – P. 707 – 714.
38. Lado H. H. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms / H. H. Lado, A. E. Yousef // *Microbes. Infect.* – 2002. – V. 4, №4. – P. 443 – 440.
39. Jin T. Z. Upscaling from benchtop processing to industrial scale production: more factors to be considered for pulsed electric field food processing / T. Z. Jin, M. Guo, H. Q. Zhang // *J. Food Eng.* – 2015. – V. 146. – P. 72 – 80.
40. Mahnič-Kalamiza S. Electroporation in food processing and biorefinery / S. Mahnič-Kalamiza, E. Vorobiev, D. Miklavčič // *J. Membr. Biol.* – 2014. – V. 247, № 12. – P. 1279 – 1304.
41. Tarek M. Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation / M. Tarek // *Biophys. J.* – 2005. – V. 88, №6. – P. 4045 – 4053.

42. Aune T. E. V. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed / T. E. V. Aune, F. L. Aachmann // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – V. 85. – P. 1301 – 1313.
43. Research on industrial-scale electroporation devices fostering the extraction of substances from biological tissue / M. Sack, J. Sigler, S. Frenzel et. al. // *Food Eng. Rev.* – 2010. – V. 2, №2. – P. 147 – 156.
44. Physical and structural changes in liquid whole egg treated with high-intensity pulsed electric fields / R. Marco-Molés, M. A. Rojas – Graü, I. Hernando et. al. // *J. Food Sci.* – 2011. – V. 76, №2. – P. 257 – 264.
45. Qin B. L. Nonthermal pasteurization of liquid foods using high – intensity pulsed electric fields / B. L. Qin, U. R. Pothakamury, G. V. Barbosa – Cánovas, B. G. Swanson // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 1996. – V. 36, №6. – P. 603 – 627.
46. Walkling-Ribeiro M. Microbial inactivation and shelf life comparison of 'cold' hurdle processing with pulsed electric fields and microfiltration, and conventional thermal pasteurisation in skim milk / M. Walkling – Ribeiro, O. Rodríguez – González, S. Jayaram, M. W. Griffiths // *Int. J. Food Microbiol.* – 2011. – V. 144, №3. – P. 379 – 386.
47. Inactivation of *Escherichia coli* in a tropical fruit smoothie by a combination of heat and pulsed electric fields / M. Walkling – Ribeiro, F. Noci, D. A. Cronin et. al. // *J. Food Sci.* – 2008. – V. 73, №8. – P. 395 – 399.
48. Enhancement of electroporation facilitated immunogene therapy via T-reg depletion / P. F. Forde, M. Sadadcharam, L. J. Hall et. al. // *Cancer Gene Ther.* – 2014. – V. 21, №8. – P. 349 – 354.
49. Skin electroporation for transdermal drug delivery: the influence of the order of different square wave electric pulses / B. Zorec, S. Becker, M. Reberšek et. al. // *Int. J. Pharm.* – 2013. – V. 457, №1. – P. 214 – 223.
50. Pegoraro C. Transdermal drug delivery: from micro to nano / C. Pegoraro, S. MacNeil, G. Battaglia // *Nanoscale.* – 2012. – V. 4, №6. – P. 1881 – 1894.

51. Безуглый А. П. Аквафорез – возможности неинвазивной мезотерапии / А. П. Безуглый // Нувель эстертик. – 2008. – №6. – С. 170 – 179.
52. Electroporation and its application / N. Skolucka, J. Saczko, M. Kotulska et. al. // Pol. Merkur. Lekarski. – 2010. – V. 28, № 168. – P. 501 – 504.
53. Brüggermann U. Low–oxigen–affinity red cells produced in a large volume, continuous – flow electroporation system / U. Brüggermann, E. C. Roux, J. Hunnig, C. Nicolau // Transfusion. – 1995. – V. 35, №6. – P. 478 – 486.
54. Neil G. A. Electrofusion / G. A. Neil, U. Zimmermann // Methods Enzymol. – 1993. – V. 220. – P. 174 – 196.
55. Cell electrofusion using nanosecond electric pulses / L. Rems, M. Ušaj, M. Kandušer et. al. // Sci. Rep. – 2013; 3; 3382. DOI: 10.1038/srep03382.
56. Чайлахян Л. М. Электростимулируемое слияние клеток в клеточной инженерии / Л. М. Чайлахян, Б. Н. Вепринцев, Т. А. Свиридова, В. А. Никитин // Биофизика. – 1987. – Т. 32, № 5. – С. 874 – 887.
57. Свиридова Т. А. Метод локального электрослияния пронуклеусов с энуклеированной зиготой / Т. А. Свиридова, Л. М. Чайлахян, В. А. Никитин, Б. Н. Вепринцев // Доклады АН СССР. – 1987. – Т. 295, №1. – С. 241 – 244.
58. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells of dairy cow / J. Goto, K. Kaneyama, S. Kobayashi et. al. // Animal. Sci. J. – 1999. – V. 70, №4. – P. 243 – 245.
59. In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype / S. Arat, J. Gibbons, J. Rzućidło et. al. // Biol. Reprod. – 2002. – V. 66, №6. – P. 1768 – 1774.
60. Fulka J. Jr. Electrofusion of mammalian oocytes and embryonic cells / J. Jr. Fulka, R. M. Moor, J. Fulka // Methods Mol. Biol. – 1995. – V. 48. – P. 309 – 316.

61. Finaz C. Electrofusion. A new, highly efficient technique for generating somatic cell hybrids / C. Finaz, A. Lefevre, J. Teissié // *Exp. Cell Res.* – 1984. – V. 150, №2. – P. 477 – 482.
62. Curnow E. C. Electrofusion of two-cell bovine embryos for the production of tetraploid blastocysts in vitro / E. C. Curnow , I. M. Gunn, A. O. Trounson // *Mol. Reprod. Dev.* – 2000. – V. 56, №3. – P. 372 – 377.
63. Mouse cloning and somatic cell reprogramming using electrofused blastomeres / A. Riaz, X. Zhao, X. Dai et. al. // *Cell Res.* – 2011. – V. 21, №5. – P. 770 – 778.
64. Production of cloned sei whale (*Balaenoptera borealis*) embryos by interspecies somatic cell nuclear transfer using enucleated pig oocytes / E. Lee, M. M. U. Bhuiyan, H. Watanabe et. al. // *J. Vet. Sci.* – 2009. – V. 10, № 4. – P. 285 – 292.
65. Zimmermann U. Electrical breakdown, electroporabilization and electrofusion / U. Zimmermann // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 1986. – V. 105, №1. – P. 176 – 256.
66. Zimmermann U. Principles of electrofusion and electroporabilization /U. Zimmermann, H. B. Urnovitz // *Methods Enzymol.* – 1987. – V. 151. – P. 194 – 221.
67. Generation and developmental characteristics of porcine tetraploid embryos and tetraploid/diploid chimeric embryos / W. He, Q. Kong, Y. Shi et. al. // *Genomics Proteomics Bioinform.* – 2013. – V. 11, №5. – P. 327 – 333.
68. Potter H. Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation / H. Potter // *Anal. Biochem.* – 1988. – V. 174, №2. – P. 361 – 373.
69. Electrofusion of zona-free mouse embryonic cells in electrolytes and their development in vitro / A. S. Elsheikh, Y. Takahashi , H. Tanaka et. al. // *Jpn. J. Vet. Res.* – 1995. – V. 43, №3 – 4. – P. 125 – 134.
70. Маленко Г. П. Развитие in vitro реконструированных эмбрионов крупного рогатого скота, активированных в разные сроки после электрослияния / Г.

- П. Маленко, А. В. Комиссаров, О. И. Степанов // Изв. Российской. Акад. наук. – 2010. – №5. – С. 527 – 534.
71. Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells / A. Ogura, K. Inoue, K. Takano et. al. // Mol. Reprod. Dev. – 2000. – V. 57, №1. – P. 55 – 59.
 72. Вепринцев Б. Н. Консервация генетических ресурсов / Б. Н Вепринцев, Н. Н Ротт // Природа. – 1978. – №11. – С. 10 – 21.
 73. Смирнов А. А. Необратимое повреждение липидных бислойных мембран в состоянии электрического пробоя / А. А. Смирнов, А. В. Путвинский, Д. И. Рощупкин, Ю. А. Владимиров // Биофизика. – 1981. – Т. 26, вып. 1. – С. 140 – 142.
 74. Владимиров. Ю. А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз / Ю. А. Владимиров // Биол. мембраны. – 2002. – Т. 19, №5. – С. 356 – 377.
 75. Чекурова Н. Р. Действие криопротектора на электрические характеристики клеточной мембраны эмбрионов мыши / Н. Р. Чекурова, А. Н. Кислов, Б. Н. Вепринцев // Криобиология. – 1990. – №1. – С. 25 – 29.
 76. Биофизика / В. Ф. Антонов, А. М. Черныш, В. И. Пасечник и др. – М.: ВЛАДОС, 2000. – 157 с.
 77. Гурина Т. М. Стандартизация процесса криоконсервирования дрожжей *SACCHAROMYCES BOULARII* для использования в коллекциях и банках промышленных штаммов микроорганизмов / Т. М. Гурина, И. П. Высеканцев, О. М. Бабинец // Микробиол. журнал. – 2013. – Т. 75, №5. – С. 33 – 39.
 78. Общая биофизика / М. В. Волькенштейн. – М.: Наука, 1978. – 592 с.
 79. McCleskey R. B. Electrical conductivity of electrolytes found in natural waters from (5 to 90)°C / R. B. McCleskey // J. Chem. Eng. Data. – 2011. – V. 56, №2. – P. 317 – 327.

80. Goldman D. E. Potential, impedance and rectification in membranes / D. E. Goldman // *J. Gen. Physiol.* – 1943. – V. 27, №1. – P. 37–50.
81. Electroporation and electrofusion in cell biology / E. Neumann, A. E. Sowers, C. A. Jordan. – NY.: Plenum Press, 1989. – 436 p.
82. Basic features of a cell electroporation model: illustrative behavior for two different pulses / R. S. Son, K. S. Smith, T. R. Gowrishankar et. al. // *J. Membr. Biol.* – 2014. – V. 247, №12. – P. 1209 – 1228.
83. Smith K. C. Transmembrane molecular transport during versus after extremely large, nanosecond electric pulses / K. C. Smith, J. C. Weaver // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – V. 412, №1. – P. 8 – 12.
84. YiKuen Lee. Review of micro/nano technologies and theories for electroporation of biological cells / Lee YiKuen, Deng PeiGang // *Sci. China Phys. Mech. Astron.* – 2012. – V. 55, №6. – P. 996 – 1003.
85. Fernández M. L. Size – controlled nanopores in lipid membranes with stabilizing electric field / M. L. Fernández, M. Risk, R. Reigada, P. T. Vernier // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2012. – V. 423, №2. – P. 325 – 330.
86. Kinoshita K. Voltage – induced pore – formation and hemolysis of human erythrocytes / K. Kinoshita, T. Y. Tsong // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1977. – V. 471. – P. 227 – 242.
87. Nanosecond, high – intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells / S. J. Beebe, P. M. Fox, L. J. Rec et. al. // *FASEB J.* – 2003. – V. 17. – P. 1493 – 1495.
88. Levine Z. A. Life cycle of an electropore: field – dependent and field – independent steps in pore creation and annihilation / Z. A. Levine, P. T. Vernier // *J. Membr. Biol.* – 2010. – V. 236. – P. 27 – 36.
89. Tovar O. Electroporation and recovery of cardiac cell membrane with rectangular voltage pulses / O. Tovar, L. Tung // *Am. J. Physiol.* – 1992. – V. 263. – P. 1128 – 1136.

90. Dual-view microscopy with a single camera: real-time imaging of molecular orientations and calcium / K. Kinoshita, H. Itoh, S. Ishiwata et. al. // J. Cell Biol. – 1991. – V. 115. – P. 67 – 73.
91. Induction of calcium-dependent, localized cortical granule break-down in sea-urchin eggs by voltage pulsation / D. P. Rossignol, G. L. Decker, W. J. Lennarz et. al. // Biochim. Biophys Acta. – 1983. – V. 763. – P. 346 – 355.
92. Silve A. Demonstration of cell membrane permeabilization to medium-sized molecules caused by a single 10 ns electric pulses / A. Silve, I. Leray, L. M. Mir // Bioelectrochem. – 2012. – V. 87. – P. 260 – 264.
93. Rols M. P. Electroporation of mammalian cells / M. P. Rols, J. Teissie // Biophys. J. – 1990. – V. 58, №5. – P. 1089 – 1098.
94. Baker P. F. A high voltage technique for gaining rapid access to the interior of secretory cells / P. F. Baker, d. E. Knight // J. Physiol. – 1978. – V. 284. – P. 30P – 31P.
95. Baker P. F. Influence of anions on exocytosis in leaky bovine adrenal medullary cells / P. F. Baker, d. E. Knight // J. Physiol. – 1979. – V. 296. – P. 106P – 107P.
96. Mekid H. In vivo cell electrofusion / H. Mekid, L. M. Mir // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1524. – P. 118 – 130.
97. Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research / J. Gehl // Acta Physiol. Scand. – 2003. – V. 177, №4. – P. 437 – 447.
98. Advanced electroporation techniques in biology and medicine / A. G. Pakhomov, D. Miklavčič, M. S. Markov. – NY. CRC Press, 2010. – 528 p.
99. Schwan H. P. Electrical properties of tissue and cell suspensions / H. P. Schwan // Adv. Biol. Med. Phys. – 1957. – №5. – P. 147 – 209.
100. Kotnik T. Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields – a method for theoretical analysis and its application / T. Kotnik, D. Miklavcic, T. Slivnik // Bioelectrochem. Bioenerg. – 1998. – V. 45. – P. 3 – 16.

101. Kotnik T. Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells / T. Kotnik, D. Miklavčič // *Biophys. J.* – 2000. – V. 79, №2. – P. 670 – 679.
102. Яковенко С. А. Электропоратор клеточных мембран с цифровой генерацией импульсов произвольной формы / С. А. Яковенко, Б. В. Трубицин // *Биофизика.* – 2003. – Т. 48, вып. 3. – С. 480 – 498.
103. Shigimaga V. A. Pulsed conductometer for biological cells and liquid media / V. A. Shigimaga // *Measurement techniques.* – NY.: Springer New York. – 2013. – V. 55, №11. – P. 1294 – 1300.
104. Lojewska Z. Analysis of the effect of medium and membrane conductance on the amplitude and kinetics of membrane potentials induced by externally applied electric fields / Z. Lojewska, D. L. Farkas, B. Ehrenberg, L. M. Loew // *Biophys. J.* – 1989. – V. 56, №1. – P. 121 – 128.
105. Rems L. Induced transmembrane voltage during cell electrofusion using nanosecond electric pulses / L. Rems, D. Miklavčič, G. Pucihar // *IFMBE Proceedings.* – 2014. – V. 41. – P. 896 – 899.
106. Hibino M. Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential / M. Hibino., M. Shigemori., H. Itoh et. al. // *Biophys. J.* – 1991. – V. 59, №1. – P. 209 – 220.
107. DeBruin K. A. Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential / K. A. DeBruin, W. Krassowska // *Biophys. J.* – 1999. – V. 77, №3. – P. 1213 – 1224.
108. Knisley S. B. Transmembrane potential at the ends of ventricular myocytes during electroporation by field stimulation / S. B. Knisley // *PACE.* – 1994. – V. 17. – P. 838.
109. Krassowska W. Theory of electroporation / W. Krassowska, J. C. Neu // *Card. Bioelect. Therapy.* – 2009. – P. 133 – 161.
110. Theoretical and experimental analysis of electroporated membrane conductance in cell suspension / D. O. H. Suzuki, A. Ramos, M. C. M. Ribeiro

- et. al. // IEEE Transactions on Biomed. Eng. – 2011. – V. 58, №12. – P. 3310 – 3318.
111. Electroporation – based technologies for medicine: principles, applications, and challenges / M. L. Yarmuch, A. Golberg, G. Serša et. al. // Ann. Rev. Biomed. Eng. – 2014. – V. 16. – P. 295 – 320.
 112. Variability of the minimal transmembrane voltage resulting in detectable membrane electroporation / L. Towhidi, T. Kotnik, G. Pucihar et. al. // Electromagn. Biol. Med. – 2008. – V. 27, №4. – P. 372 – 385.
 113. Joshi R. P. Bioelectric effects of intense ultrashort pulses / R. P. Joshi, K. H. Schoenbach // Crit. Rev. Biomed. Eng. – 2010. – V. 38, №3. – P. 255 – 304.
 114. Freeman S. A. Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore–pore separation / S. A. Freeman, M. A. Wang, J. C. Weaver // Biophys. J. – 1994. – V. 67, №1. – P. 42 – 56.
 115. A brief overview of electroporation pulse strength–duration space: a region where additional intracellular effects are expected / J. C. Weaver, K. C. Smith, A. T. Esser et. al. // Bioelectrochem. – 2012. – V. 87. – P. 236 – 243.
 116. Теория упругости / Л.Д. Ландау, Е.М. Лифшиц. – М.: Наука, 1967. – 246 с.
 117. Маркин В. С. Статистика пор в бислойных липидных мембранах / В. С. Маркин, М. М. Козлов // Биология мембран. – 1985. – Т. 2. – С. 205 – 223.
 118. Markin V. S. Membrane fusion: stalk model revisited / V. S. Markin, J. P. Albanesi // Biophys. J. – 2002. – V. 82, №2. – P. 693 – 712.
 119. Weaver J. C. Electroporation In: Biological and Medical Aspects of Electromagnetic Fields / J. C. Weaver, Yu. Chizmadzhev. – NY.: CRC Press. – 2007. – P. 293 – 321.
 120. Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electroporabilized myeloma cells / S. C. Djuzenova, U. Zimmermann, H. Frank et. al. // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – V. 1284, №2. – P. 143 – 152.

121. Hibino M. Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential / M. Hibino, H. Iroh, K. Kinosita // *Biophys. J.* – 1993. – V. 64, №6. – P. 1789 – 1800.
122. Gabriel B. Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane / B. Gabriel, J. Teissie // *Biophys. J.* – 1997. – V. 73, №5. – P. 2630 – 2637.
123. Tekle E. Electro – permeabilization of cell membranes: effect of the resting membrane potential / E. Tekle, R. D. Astumian, P. B. Chock // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1990. – V. 172, № 1. – P. 282 – 287.
124. Schoenbach K. H. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses / K. H. Schoenbach, S. J. Beebe, E. S. Buescher // *Bioelectromag.* – 2001. – V. 22. – P. 440 – 448.
125. Batista Napotnik T. Nanosecond electric pulses cause mitochondrial membrane permeabilization in Jurkat cells / T. Batista Napotnik, Y. H. Wu, M. A. Gundersen et. al. // *Bioelectromag.* – 2012. – V. 33, №3. – P. 257 – 264.
126. Sugar I. P. Model of cell electrofusion: membrane electroporation, pore coalescence, and percolation / I. P. Sugar, E. G. Forster, E. Neumann // *Biophys. Chem.* – 1987. – V. 26. – P. 321 – 335.
127. Electric breakdown of bilayer membranes: I. The main experimental facts and their qualitative discussion / I. G. Abidor, V. B. Arakelyan, L. V. Chernomordik et. al. // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1979. – V. 6. – P. 37 – 52.
128. Pastushenko V. F. Electric breakdown of bilayer membranes: II. Calculation of the membrane lifetime in the steady – state diffusion approximation / V. F. Pastushenko, Yu. A. Chizmadzhev, V. B. Arakelyan // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1979. – V. 6. – P. 53 – 62.
129. Chizmadzhev Yu. A. Electric breakdown of bilayer membranes: III. Analysis of possible mechanisms of defect origin / Yu. A. Chizmadzhev, V. B. Arakelyan, V. F. Pastushenko // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1979. – V. 6. – P. 63 – 70.

130. Pastushenko V. F. Electric breakdown of bilayer membranes: IV. Consideration of the kinetic stage in the case of the single-defect membrane / V. F. Pastushenko, Yu. A. Chizmadzhev, V. B. Arakelyan // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1979. – V. 6. – P. 71 – 79.
131. Arakelyan V. B. Electric breakdown of bilayer membranes: V. Consideration of the kinetic stage in the case of the membrane containing an arbitrary number of defects / V. B. Arakelyan, Yu. A. Chizmadzhev, V. F. Pastushenko // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1979. – V. 6. – P. 81 – 87.
132. Pastushenko V. F. Electric breakdown of bilayer membranes: VI. A stochastic theory taking into account the processes of defect formation and death: membrane lifetime distribution function / V. F. Pastushenko, V. B. Arakelyan, Yu. A. Chizmadzhev // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1979. – V. 6. – P. 89 – 95.
133. Pastushenko V. F. Electric breakdown of bilayer membranes: VII. A stochastic theory taking into account the processes of defect formation and death: statistical properties / V. F. Pastushenko, V. B. Arakelyan, Yu. A. Chizmadzhev // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1979. – V. 6. – P. 97 – 104.
134. Мембранный транспорт / А. Котык, К. Яначек. – М., Мир, 1980. – 341 с.
135. Фізика біомембран / Є. О. Гордієнко, В. В. Товстяк – К.: Наук. думка, 2009. – 272 с.
136. Weaver J. C. Decreased bilayer stability due to transmembrane potentials / J. C. Weaver, R. A. Mintzer // *Phys. Lett.* – 1981. – V. 86A. – P. 57 – 59.
137. Powell K. T. Transient aqueous pores in bilayer membranes: a statistical theory / K. T. Powell, J. C. Weaver // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1986. – V. 15. – P. 211 – 227.
138. Теория абсолютных скоростей и реакций / С. Глесетон, К. Лейдлер, Г. Эйринг. Пер. с англ. под ред. акад. А. А. Баландина, Н. Д. Соколова, Москва, 1948. – 583 стр.
139. Ионная избирательность клеточных мембран / А. А. Лев. – Л.: Наука, 1975. – 323 с.

140. Чизмаджев Ю. А. Ионный транспорт через селективные каналы биологических мембран / Ю. А. Чизмаджев, С. Х. Айтьян // М.: ИНТ, серия Биофизика мембран. – 1982. – Т. 2. – С. 5 – 81.
141. Автоколебания в системах с конечным числом степеней свободы / П. С. Ланда. – М.: Наука, 1980. – 300 с.
142. Electroporation: A unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and mechanical rupture in artificial planar bilayer membranes / A. Barnett, J. C. Weaver // Bioelectrochem. Bioenerg. – 1991. – V. 25. – P. 163 – 182.
143. Гордієнко О. І. Механізми проникання кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів / О. І. Гордієнко, Є. О. Гордієнко, Т. П. Ліннік, А. М. Компанієць // Проблеми кріобіології. – 2002. – №4. – С. 9 – 15.
144. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко. – К. Наук. думка, 1982. – 255 с.
145. Грищенко В. И. О диэлектрическом пробое мембран при криоконсервировании биологических объектов / В. И. Грищенко, В. А. Моисеев, А. В. Зинченко // Докл. АН СССР. – 1989. – 308, №1. – С. 215 – 217.
146. Неравновесная термодинамика / С. Де Гроот, П. Мазур. Перевод с английского В. Т. Хозяинова. Под редакцией Д. Н. Зубарева. – М.: Мир, 1964. – 456 с.
147. Электродинамика сплошных сред / Л. В. Ландау, Е. М. Лифшиц. – М.: Наука, 1982. – 621 с.
148. Большие упругие деформации и нелинейная механика сплошной среды / А. Грин, Дж. Адкинс. – М.: Мир, 1965. – 455 с.
149. Механика и термодинамика биологических мембран / И. Ивенс, Р. Скейлак. – М.: Мир, 1982. – 304 с.
150. Понтрягин Л. С. Асимптотическое поведение решений систем дифференциальных уравнений с малым параметром при больших

- производных / Л. С. Понтрягин // Изв. АН СССР. Серия матем. – 1957. – V. 21, №5. – С. 605 – 626.
151. Базилевский М. В. Современные теории химических реакций в конденсированной фазе / М. В. Базилевский, В. И. Фаустов // Успехи химии. – 1992. – Т. 61, №7. – С. 1185 – 1223.
152. Численные методы / А. А. Самарский, А. В. Гулин. – М.: Наука, 1989. – 430 с.
153. Биология развития млекопитающих. Методы / Под ред. М. Манк. – М.: Мир, 1990. – 406 с.
154. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / Перший національний конгрес з біоетики, Київ, 2001 р. // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, №1. – С. 142 – 145.
155. Сверхбыстрое замораживание эмбрионов крыс и коров без «классической эквилибрации» / В. В. Исаченко, В. И. Грищенко, Ф. И. Осташко и др. // Проблемы криобиологии. – 1994. – №3. – С. 3 – 6.
156. Выживаемость эмбрионов мышей после сверхбыстрого замораживания разными способами с использованием различных криопротекторов / А. С. Кривохарченко, Л. И. Вильянович, Г. А. Серобян и др. // Проблемы репродукции. – 1995. – №4. – С. 13 – 18.
157. Анализ влияния различных этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль – сахарозной среде на жизнеспособность 2–клеточных эмбрионов мыши / Е. И. Смольянинова, О. В. Пишко, Е. Г. Лисина и др. // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, №4. – С. 385 – 393.
158. Шигимага В. А. Определение проводимости эмбриональных клеток животных / В. А. Шигимага // Проблемы бионики. – 2003. – Вып. 59. – С. 60 – 64.
159. Законы и формулы физики / В. Е. Кузьмичев. – К.: Наук. думка, 1989. – 862 с.

160. Закс Л. Статистическое оценивание / Л. Закс. – М.: статистика, 1976. – 598 с.
161. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications / P. Mazur // *Am. J. Physiol.* – 1984. – V. 247, №3, Pt 1. – P. 125 – 142.
162. Leibo S. P. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing / S. P. Leibo, P. Mazur, S. C. Jackowski // *Exp. Cell Res.* – 1974. – V. 89, №1. – P. 79 – 88.
163. Тихонов А. Н. Системы дифференциальных уравнений, содержащие малые параметры при производных / А. Н. Тихонов. – Матем. сборник. – 1952. – V. 73, №3. – С. 575 – 586.
164. Численные методы для физиков – теоретиков / В. А. Ильина, П. К. Силаев – Москва – Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2004. – Т. 2. – 133 с.
165. Fahy G. M. Analysis of “solution effects” injury. Equations for calculation phase diagram v information for the ternary systems NaCl – dimethylsulfoxide – water and NaCl – glycerol – water / G. M. Fahy // *Biophys. J.* – 1980. – V. 32, №2. – P. 837 – 850.
166. Cocks F. H. Phase diagram relationships in cryobiology / F. H. Cocks, W. E. Brower // *Cryobiology.* – 1974. – V. 11, №4. – P.340 – 358.
167. Тодрин А. Ф. Теплофизические свойства криопротекторов / А. Ф. Тодрин, Л. И. Попивненко, С. Е. Коваленко // *Проблемы криобиологии* – 2009. – Т. 19, №2. – С. 163 – 176.
168. Leibo S. P. Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova / S. P. Leibo. // *J. Membrane Biol.* – 1980. – №53. – P. 179 – 188.
169. Water and DMSO membrane permeability characteristics of in-vivo- and in-vitro-derived and cultured murine oocytes and embryos/ R. T. Pfaff, J. Liu, D. Gao et. al. // *Mol. Human Reprod.* – 1998. – №4. – P. 51 – 59.

170. Пишко О. В. Влияние концентраций этиленгликоля на проницаемость мембран одно- и двухклеточных эмбрионов мыши // Проблемы криобиологии. – 2004. – №2. – С. 56 – 61.
171. Power R. D. Ion transport and permeability in the mouse egg / R. D. Power, J. T. Tupper // Exp. Cell. Res. – 1975. – №91. – P. 413 – 421.
172. Смольянинова Е. И. Особенности развития осмотической реакции яйцеклеток и эмбрионов мыши в гипертонических растворах электролита и криопротекторов: дис. ... кандидата биол. наук: 03.00.22 / Смольянинова Евгения Ивановна. – Х., 1994. – 163 с.
173. Гольдштейн Д. В. Изменение цитоплазматического Na^+/K^+ -баланса у двухклеточного эмбриона / Д. В. Гольдштейн, В. Н. Погорелова, А. Г. Погорелов // Цитология. – 2007. – Т. 49, №8. – С. 680 – 684.
174. Emery B. R. Hamster oocyte membrane potential and ion permeability vary with preantral cumulus cell attachment and developmental stage / B. R. Emery, R. L. Miller, D. T. Carrell // BMC Devel. Biol. – 2001. – P. 1 – 14.
175. Стриха О. А. Теоретическая модель трансмембранного переноса веществ при замораживании клеточной суспензии / О. А. Стриха, Е. И. Смольянинова, Е. А. Гордиенко // Біофізичний вісник. – 2013. – Т.30, №2. – С. 66 – 73.
176. 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.
177. Intermolecular and surface forces / J. N. Israelachvili. – USA, Academic Press, Trird edition, 2011. – 674 P.
178. Solomon A. K. The aqueous pore in red cell membrane: band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water / A. K. Solomon // Biomembranes and cell function. – 1983. – V. 414. – P. 97 – 124.

179. Gordienko O. I. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols / O. I. Gordienko, T. P. Linnik, E. O. Gordienko // *Bioelectrochemistry*. – 2004. – V. 62, №2. – P. 115 – 118.
180. 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.
181. 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., 26 – 30 квітня 2011 р.: матеріали конф.* – Севастополь: Севастопольський національний технічний університет, 2011. – С. 29.
182. Стріха О. А. Удосконалена модель електропорації клітинної мембрани / О. А. Стріха, Є. О. Гордієнко // *V з'їзд українського біофізичного товариства, Луцьк, 22 – 25 червня 2011 р.: тези доповідей.* – Луцьк: Волинський національний університет, 2011. – С. 123.
183. Стріха О. А. Аналіз особливостей електричного пробоя клітин на основі моделі в'язкопружкої поведінки клітинних мембран / О. А. Стріха, Є. О. Гордієнко // *Актуальні питання біологічної фізики та хімії: VII Міжн. науково-технічна конф., 23 – 27 квітня 2012 р.: матеріали конф.* – Севастополь: Севастопольський національний технічний університет, 2012. – С. 77.
184. 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.
185. 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, October 6 – 9, 2013: Theses.* – Hannover, Germany, 2013. – P. 49.

186. Шигимага В. О. Біотехнічний комплекс імпульсної кондуктометрії і електроманіпуляції з клітинами тварин: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора техн. наук: спец. 05.11.17 «Біологічні та медичні прилади і системи» / В. О. Шигимага. – Харків, 2014. – 36 с.
187. Влияние среды замораживания на жизнеспособность и катионный состав ранних эмбрионов мыши / Е. И. Смольянинова, А. Г. Погорелов, Е. Г. Лисина и др. // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, №3. – С. 3 – 10.
188. Pogorelov A. G. Changes in intracellular potassium and sodium content of 2-cell mouse embryos induced by exposition to vitrification concentrations of ethylene glycol / A. G. Pogorelov, I. I. Katkov, E. I. Smolyaninova, D. V. Goldshtein // Cryo – Letters. – 2006. – V. 27, №2. – P. 87 – 98.
189. Електрична провідність ембріонів мишей доімплантаційних стадій розвитку після гормональної стимуляції яєчників тварин / Є. І. Смольянінова, О. А. Стриха, В. О. Шигимага та ін. // Biotechnologia Acta. – 2013. – V. 6, №1. – P. 105 – 112.
190. Влияние этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль – сахарозной среде на электрическую проводимость 2-клеточных эмбрионов мыши / Е. И. Смольянинова, В. А. Шигимага, О. А. Стриха и др. // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №3. – С. 228 – 239.
191. Электрическая проводимость как диагностический параметр оценки качества ооцитов и эмбрионов млекопитающих в биотехнологических операциях / Е. И. Смольянинова, В. А. Шигимага, О. А. Стриха и др. // Биофизика живой клетки. – 2014. – Т. 10. – С. 193 – 195.
192. Вплив ступеня зрілості на електричну провідність ооцитів мишей / Є. І. Смольянінова, В. О. Шигимага, А. О. Колеснікова та ін. // Біологія тварин. – 2015. – Т. 17, №1. – С. 118 – 125.
193. Стріха О. А. Вплив гормональної стимуляції та стадії розвитку на електропровідність ооцитів та ранніх ембріонів миші / О. А. Стріха, Є. І. Смольянінова, В. О. Шигимага // Біологічні дослідження молодих вчених в

- Україні: X Всеукр. наук. конф. студентів та молодих науковців, 28 – 29 жовтня 2010 р.: матеріали конф. – Київ: Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, 2010. – С. 85 – 86.
194. 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., 26 – 30 квітня 2011 р.: матеріали конф. – Севастополь: Севастопольський національний технічний університет, 2011. – С. 37 – 38.
 195. Влияние гиперстимуляции яичников и стадии развития на электрическую проводимость эмбрионов мыши доимплантационных стадий развития / Е. И. Смольянинова, В. А. Шигимага, А. А. Колесникова и др. // Актуальні питання біологічної фізики та хімії: VII Міжн. науково–технічна конф., 26 – 30 квітня 2011 р.: матеріали конф. – Севастополь: Севастопольський національний технічний університет, 2011. – С. 36 – 37.
 196. The effect of ovary hormone stimulation on mouse oocyte and early embryo electric conductivity / O. A. Strikha, E. I. Smolyaninova, E. O. Gordienko et. al. // 8–th EBSA European Biophysics Congress, August 23 – 27, 2011: Theses. – Budapest, Hungary, 2011. – V. 40. – S240.
 197. Влияние различных этипов криоконсервирования методом витрификации на морфофункциональные и электрические параметры ранних эмбрионов мыши / Е. И. Смольянинова, О. А. Стриха, В. А. Шигимага и др. // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №3. – С. 275.
 198. Стриха О. А. Импульсная кондуктометрия как экспресс – тест для оценки состояния 2–клеточных эмбрионов мыши / О. А. Стриха // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №2. – С. 174.
 199. Стриха О. А. Определение удельной электрической проводимости ооцитов мыши в растворах сахарозы и проникающих криопротекторов методом импульсной кондуктометрии / О. А. Стриха, Е. И. Смольянинова // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. – 21, №2. – С. 206.