

Н. С. ПУШКАРЬ, Ю. А. ИТКИН, Е. А. ГОРДИЕНКО, В. Л. БРОНШТЕЙН

ПРИЧИНА И МЕХАНИЗМ ТЕМПЕРАТУРНОГО ШОКА

(Представлено академиком И. М. Лифшицем 23 XII 1974)

Температурным шоком называется явление повреждения клеток, наблюдающееся при быстром охлаждении клеточных суспензий и других биологических объектов. Область, в которой таковой проявляется, заключена в интервале температур *in vivo* до температуры, при которой начинается кристаллизация в данном объекте. При построении определенной системы взглядов мы исходили из того, что она должна объяснить следующие факты (¹⁻⁵): 1) повреждение или гибель клеток наступает лишь при резком падении температуры в объекте, тогда как медленное понижение температуры в тех же пределах не вызывает этого явления; 2) сверхбыстрое охлаждение не приводит к температурному шоку; 3) более сильное действие температурного шока при одной и той же скорости охлаждения проявляется в зоне температур от 5° до 0°; 4) при заданной скорости охлаждения существует такой минимальный диапазон охлаждения, что если температура меняется лишь в его пределах, то температурный шок не наблюдается; 5) по мере снижения скорости охлаждения указанный в предыдущем пункте минимальный диапазон растет; 6) при резком повышении температуры температурный шок менее выражен.

В качестве модели клетки принимаем открытую (т. е. обменивающуюся с окружающей средой веществом и энергией) систему, состоящую из сферической неодинаково проницаемой для разных веществ мембраны толщиной δ и области, ограниченной внутренней поверхностью мембраны, термодинамические параметры которой характеризуют реальную протоплазму. Феноменологические уравнения, описывающие процессы переноса через мембрану в n -компонентной системе, если отсутствует внешнее поле и химические реакции, имеют вид (⁶)

$$\begin{aligned} j_q &= -S(\Lambda_{qq}\Delta T/T^2 + \Lambda_{qm}(\Delta\mu_m)_{T,P}/T + \Lambda_{qv}\Delta P/T), \\ j_k' &= -S(\Lambda_{kq}\Delta T/T^2 + \Lambda_{km}(\Delta\mu_m)_{T,P}/T + \Lambda_{kv}\Delta P/T), \\ j_v &= -S(\Lambda_{vq}\Delta T/T^2 + \Lambda_{vm}(\Delta\mu_m)_{T,P}/T + \Lambda_{vv}\Delta P/T), \end{aligned} \quad (1)$$

где ΔT , ΔP и $\Delta\mu_m$ — соответственно разности между значениями температуры, давления и химического потенциала m -го растворенного вещества у внешней и внутренней поверхности мембраны; S — площадь поверхности мембраны; j_q — приведенный поток тепла; j_k' — приведенный поток k -го растворенного вещества, равный $j_k - c_k j_w / c_w$ (j_k — поток растворенного вещества, j_w — поток воды, c_k и c_w — массовые концентрации k -го растворенного вещества и воды); j_v — объемный поток, равный $j_k v_k + j_w v_w$ (v_k и v_w — удельные объемы растворенного вещества и воды).

Кинетические коэффициенты удовлетворяют соотношениям Онсагера и связаны с используемыми на практике коэффициентами (^{7, 8}) следующим образом: $-\Lambda_{vv}/T = L_p$ — коэффициент фильтрации; $-c_w v_w \Lambda_{iv} / c_i \Lambda_{vv} = \sigma_i$ — коэффициент избирательности мембраны для i -го растворенного вещества; $W_i = -R_0 T c_w \Lambda_{ii} / \rho c_i T$, где $W_i = K_i + c_i \sigma_i L_p R_0 T / v_w$, K_i — коэффициент проницаемости мембраны для растворенного вещества; ρ — плотность раствора; R_0 — газовая постоянная.

Предполагается, что мембрана живой клетки, когда последняя находится в нормальных для нее условиях, имеет форму, близкую к равновесной.

Поэтому при оводнении или обезвоживании клетки, например, в гипотонических или гипертонических средах, в мембране возникают напряжения, стремящиеся вернуть ее в равновесное положение. Возникающее при растяжении сферической клетки радиальное напряжение согласно закону Гука пропорционально относительному изменению клеточного объема

$$\Delta P = \varepsilon \kappa, \quad (2)$$

где $\kappa = (V_0 - V)/V_0$, а V_0 — объем, соответствующий равновесной форме. Коэффициент пропорциональности ε играет роль модуля упругости ⁽⁹⁾. В случае растяжения при малых отклонениях объема от равновесного ε можно считать постоянным. Необходимо, однако, отметить, что при обез-

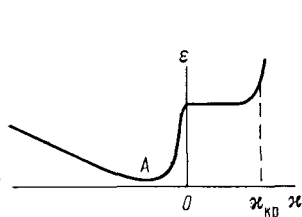


Рис. 1

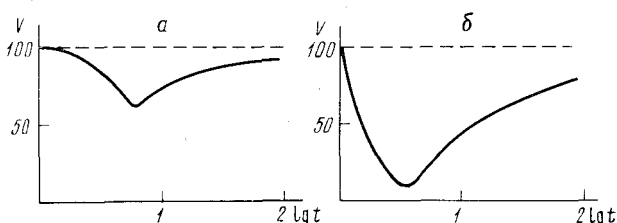


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость модуля упругости мембраны от относительного объема

Рис. 2. Зависимость жизнеспособности ядерных клеток крови, подвергаемых быстрому охлаждению, от времени экспозиции в гипотонической среде. а — разбавление 2 : 1, б — разбавление 1 : 1

воживании клетка стремится деформироваться путем изгиба при минимальном растяжении мембраны, что энергетически выгодно ⁽¹⁰⁾. Возникающие при этом напряжения в мембране должны быть значительно меньшими, чем при аналогичном значении κ в случае растяжения. Тем не менее, сохраняя в качестве определения модуля 2, мы подразумеваем, что зависимость ε от κ для реальной клетки имеет вид, показанный на рис. 1.

Температурный перепад, возникающий на мембране при охлаждении внешней по отношению к клетке среде с постоянной скоростью $\dot{T}$, можно оценить, интегрируя уравнение

$$\frac{\partial}{\partial t}(rT) = a \frac{\partial^2}{\partial r^2}(rT), \quad (3)$$

где a — коэффициент температуропроводности протоплазмы, с граничными условиями $\frac{\partial T}{\partial r}(0, t) = 0$, $T(0, t) \neq \infty$, $-\frac{\partial T}{\partial r}(R, t) + H[T_0 + \dot{T}t - T(R, t)]$, где

$H = \lambda_m/\lambda$, $\lambda_m = \Lambda_{qq}/T^2$ — коэффициент теплопроводности мембраны; λ — коэффициент теплопроводности протоплазмы; R — радиус клетки. Оказывается, что ΔT достаточно быстро становится равной

$$\Delta T = \dot{T} R c_p / 3 \lambda_m, \quad (4)$$

где c_p — теплоемкость протоплазмы.

Относительное изменение объема клетки, связанное с падением температуры, если в начальный момент времени клетка находилась в равновесии с внеклеточным раствором, определяется из уравнения

$$\kappa + (L_p S / V_0) (\varepsilon + \pi_0) = S \Lambda_{vq} R c_p \dot{T} / V_0 \Lambda_{qq}, \quad (5)$$

где π_0 — начальное осмотическое давление внеклеточного раствора. При этом мы учли, что при практически используемых скоростях охлаждения все вещества с большой точностью можно считать непроницаемыми, за исключением растворителя. Решение (5) есть

$$\kappa = -[R_p T c_p \Lambda_{vq} \dot{T} / 3 \Lambda_{vq} \Lambda_{qq} (\varepsilon + \pi_0)] \left\{ 1 - \exp \left[-\frac{L_p S t}{V_0} (\varepsilon + \pi_0) \right] \right\}. \quad (6)$$

Если время охлаждения клеточной суспензии до начала кристаллизации равно $[(L_p S/V_0)(\epsilon + \pi_0)]^{-1}$ или больше, то относительный объем клетки достигает значения

$$\kappa_{\max} = -R\Lambda_{vq}\rho c_p T\dot{T}/3\Lambda_{vv}\Lambda_{qq}(\epsilon + \pi_0), \quad (7)$$

а соответствующий перепад давления при этом составляет

$$\Delta P_{\max} = -R\Lambda_{vq}Tc_p\epsilon\dot{T}/3\Lambda_{vv}\Lambda_{qq}(\epsilon + \pi_0). \quad (8)$$

Мы полагаем, что причиной температурного шока при резком охлаждении является превышение критического перепада давления на мембране $\Delta P_{кр}$ при растяжении ее объемным потоком. При этом предполагается, что $\Lambda_{vq} < 0$ (это соответствует обычному случаю взаимного увлечения переносимых компонентов⁽⁸⁾).

С помощью выражения 8 и выдвинутых представлений легко объяснить общие закономерности температурного шока. При сверхбыстром охлаждении, когда

$$|\dot{T}|/\delta T \gg (L_p S/V_0)(\epsilon + \pi_0) \quad (9)$$

(δT — интервал изменения температуры), перепад давления не достигает критического значения, поскольку в этом случае клетка не успевает прореагировать на приложенную термодинамическую силу вплоть до начала кристаллизации. Если неравенство 9 не выполняется, то увеличение скорости охлаждения приводит к увеличению $\Delta P_{\max}$, и когда $\Delta P_{\max} \geq \Delta P_{кр}$, мембрана повреждается. При этом критический перепад давления, приводящий к гибели клеток, достигается лишь в случае превышения определенной, критической скорости охлаждения, определяемой равенством

$$\Delta P_{кр} = \left(-\frac{V_0}{4S}\right) [\Lambda_{vq}\epsilon\rho c_p T\dot{T}_{кр}/\Lambda_{vv}\Lambda_{qq}(\epsilon + \pi_0)]. \quad (10)$$

Тот факт, что при резком повышении температуры, аналогичном резкому понижению ее, температурный шок менее выражен, объясняется обсуждавшейся ранее «несимметричностью» $\epsilon = \epsilon(\%)$ (рис. 1).

Теоретические представления хорошо согласуются с проведенными нами экспериментами, в которых суспензия ядерных клеток крови человека в плазме охлаждалась со скоростями от 1°/мин. до 450°/мин в диапазоне температур от 25° до 5—0° в парах жидкого азота или непосредственным погружением в жидкий азот, а затем отогревалась в водяной бане при 37°, после чего определялась жизнеспособность клеток методом суправитального окрашивания 1% раствором эозина по Шреку. Скорость и интервал охлаждения регистрировались с помощью отградуированного потенциометра и термопары «медь — константан». Спай последней помещался в центре цилиндрической полиэтиленовой ампулы. Во всех опытах не отмечено достоверного снижения жизнеспособности ядерных клеток крови в процентах от контроля.

Во второй серии экспериментов суспензия ядерных клеток крови разбавлялась дистиллированной водой в отношении 2:1 и 1:1, а затем пробы по 1 мл, выдержанные в гипотонической среде разное время от 1 мин. до 2 час. охлаждались со скоростью 450°/мин в тех же, что и в предыдущих опытах, пределах. Результаты экспериментов приведены на рис. 2. Пунктирными линиями показана зависимость жизнеспособности клеток (в процентах от контроля) от времени выдержки в гипотонической среде без последующего охлаждения. Повреждения, вызываемые собственно выдержкой в гипотонических средах, за время опыта оказываются незначительными (гибель клеток в конце опыта составляет 3—5%). Сплошные линии

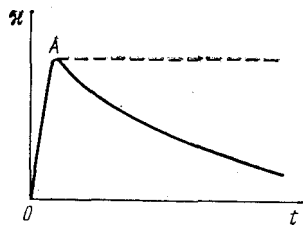


Рис. 3. Зависимость относительного клеточного объема от времени экспозиции клеток в гипотонической среде

описывают зависимость жизнеспособности охлажденных со скоростью 450°/мин (в указанных ранее пределах) ядерных клеток крови после предварительной выдержки их в гипотонических средах от 2 мин. до 2 час.

Отметим сходство кривых жизнеспособности клеток после отогрева с кривой изменения клеточного объема от времени при выдерживании клеточной суспензии в гипотонической среде (¹¹) (рис. 3). Такое сходство, возможно, указывает на наличие критического $\chi_{кр}$, или, что то же $\Delta P_{кр}$. По-видимому, минимум жизнеспособности соответствует случаю, когда в результате выдержки в гипотонической среде размер клеток оказывается достаточно близким к критическому, но все же меньше, чем таковой, так что без последующего охлаждения лизис не наступает. Эффект дополнительного увеличения объема клеток за счет охлаждения оказывается достаточным, чтобы в случае разбавления суспензии до охлаждения в отношении 2 : 1 привести к гибели 40% клеток, а при разбавлении 1 : 1 привести к гибели практически всех клеток. Жизнеспособность после отогрева в конце второго опыта (рис. 3) достигает лишь 80%, поскольку восстановление первоначального объема с течением времени после достижения максимального объема происходит медленно, так что по истечении опыта объем клеток еще достаточно близок к критическому.

Предотвращение температурного шока может быть достигнуто предварительным (до охлаждения) обезвоживанием клеток путем суспендирования их в раствор, содержащий криофиллактин в такой концентрации, что уменьшение объема, происходящее при этом, не вызывает повреждения клеток само по себе. При последующем охлаждении, приводящем к оводнению клетки, критический перепад давления достигаться не будет. Следует отметить, что эффективность защиты любым (хорошо или плохо) проникающим в клетки криофиллактиком будет медленно падать, начиная с момента достижения максимального обезвоживания клеток, причем тем быстрее, чем больше коэффициент проницаемости клеточной мембраны для криофиллактика. Поэтому слишком большое время инкубации клеток в растворе пусть даже плохо проникающего криофиллактика снижает защитное действие последнего по отношению к температурному шоку.

Институт проблем криогенной биологии и медицины
Академии наук СССР
Харьков

Поступило
19 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ф. И. Осташко, Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей, Киев, «Урожай», 1968. ² Ф. И. Осташко, О природе холодового удара живчиков, В сб.: Искусственное осеменение с/х животных, Харьков, 1963. ³ Ф. И. Осташко, Причины и механизм холодового удара клеток (половых), Междунаро. с/х журн., № 3, 106 (1964). ⁴ В. Ф. Сахно, Е. М. Платов, А. Н. Успенский, Глубокое замораживание спермы быков, М., 1969. ⁵ И. В. Смирнов, К вопросу о холодовом ударе спермиев, Научн. тр. Киевск. опытной станции животноводства, 7, 1961. ⁶ С. de Groot, П. Мазур, Неравновесная термодинамика, М., «Мир», 1964. ⁷ O. Kedem, A. Katchalsky, Biochim. et biophys. acta, v. 27, 229 (1958). ⁸ A. Katchalsky, Membrane Transport and Metabolism, N. Y.—London, 1961, p. 69. ⁹ T. C. Broyer, Physiol. Plant., Copenhagen, v. 5, 459 (1952). ¹⁰ Л. Д. Ландау, Е. М. Lifшиц, Теория упругости, М., «Наука», 1965. ¹¹ I. R. Philip, Plant. Physiol. Lancaster, v. 33, 264 (1958).