

Изобретение относится к криобиологии и может найти применение при исследовании процессов, происходящих в охлаждаемых биологических объектах.

Наиболее близким к заявляемому является способ определения фазового состояния воды в биообъектах с помощью световой микроскопии, основанный на изменении оптической плотности жидкой фазы при ее кристаллизации или изменении вращения плоскости поляризации света [1].

Недостатками способа являются низкая точность и информативность.

Эти недостатки обусловлены следующим.

Образцы перед исследованием обрабатывают фиксирующими и красящими растворами, которые вносят погрешности в определение фазовых состояний, соответствующих определенным температурам и временным интервалам.

В случае исследования тканей готовят их ультратонкие срезы, при этом кинетика кристаллизации воды в таких срезах может существенно отличаться от кинетики кристаллизации в объемных образцах как за счет поверхностных эффектов, так и за счет воздействия на жидкие фракции фиксирующих и красящих препаратов. Кроме этого, происходит маскировка процессов внутриклеточной кристаллизации внеклеточным льдом. Все это снижает точность получаемой информации.

Способ не позволяет осуществлять непрерывную регистрацию фазового состояния биообъектов в процессе их охлаждения и нагрева, что делает способ малоинформативным.

В основу изобретения поставлена задача создать такой способ определения фазового состояния биологических объектов при криоконсервации, в котором изменения в процессе подготовки образца к исследованию и определение нового параметра позволили бы регистрировать кинетику структурных и фазовых переходов и однозначно отражать фазовое состояние объекта и фазовые переходы, обеспечивая таким образом высокую точность и информативность способа.

Эта задача решается тем, что в способе определения фазового состояния биологических объектов при криоконсервации, включающем охлаждение образца и последующую регистрацию его физических характеристик, согласно изобретению, к охлажденному образцу прикладывают внешние деформирующие напряжения, затем проводят отогрев образца, при этом в процессе непрерывного отогрева регистрируют его термопластическую деформацию.

Заявляемый способ позволяет регистрировать кинетику структурных и фазовых переходов, что повышает точность и информативность способа,

Кроме этого, способ обеспечивает высокую достоверность получаемой информации за счет возможности измерения пластических характеристик, однозначно отображающих фазовое состояние объекта и кинетику фазового перехода.

Способ поясняется следующим примером.

Образцы тканей головного мозга, сердца, печени, почек, желудка, поперечно-полосатой мышцы крысы и эритроциты человека, инкубированной с 30%-ным водным раствором глицерина, объемом 0,5 см помещали в устройство для изучения упруго-пластических свойств замороженных растворов и биообъектов и охлаждали со скоростью 4 град/мин до -170°C с последующей стабилизацией температуры в течение 10 мин. Затем к исследуемым образцам тканей прикладывали

деформирующие напряжения $\sigma = 400 \text{ г/мм}^2$, а к образцам из эритроциты - 200 г/мм^2 . Величина деформирующих напряжений выбиралась такой, чтобы, с одной стороны, не вызывать пластической деформации образца при конечной температуре охлаждения, а с другой - обеспечивать оптимальную разность в скорости пластического течения образца при происходящих в нем фазовых переходах. После приложения деформирующих напряжений осуществляли отогрев исследуемых образцов со скоростью 1 град/мин с одновременной регистрацией термопластической кривой в координатах $\varepsilon = \varepsilon(T)$ при $\varepsilon = \text{const}$, где

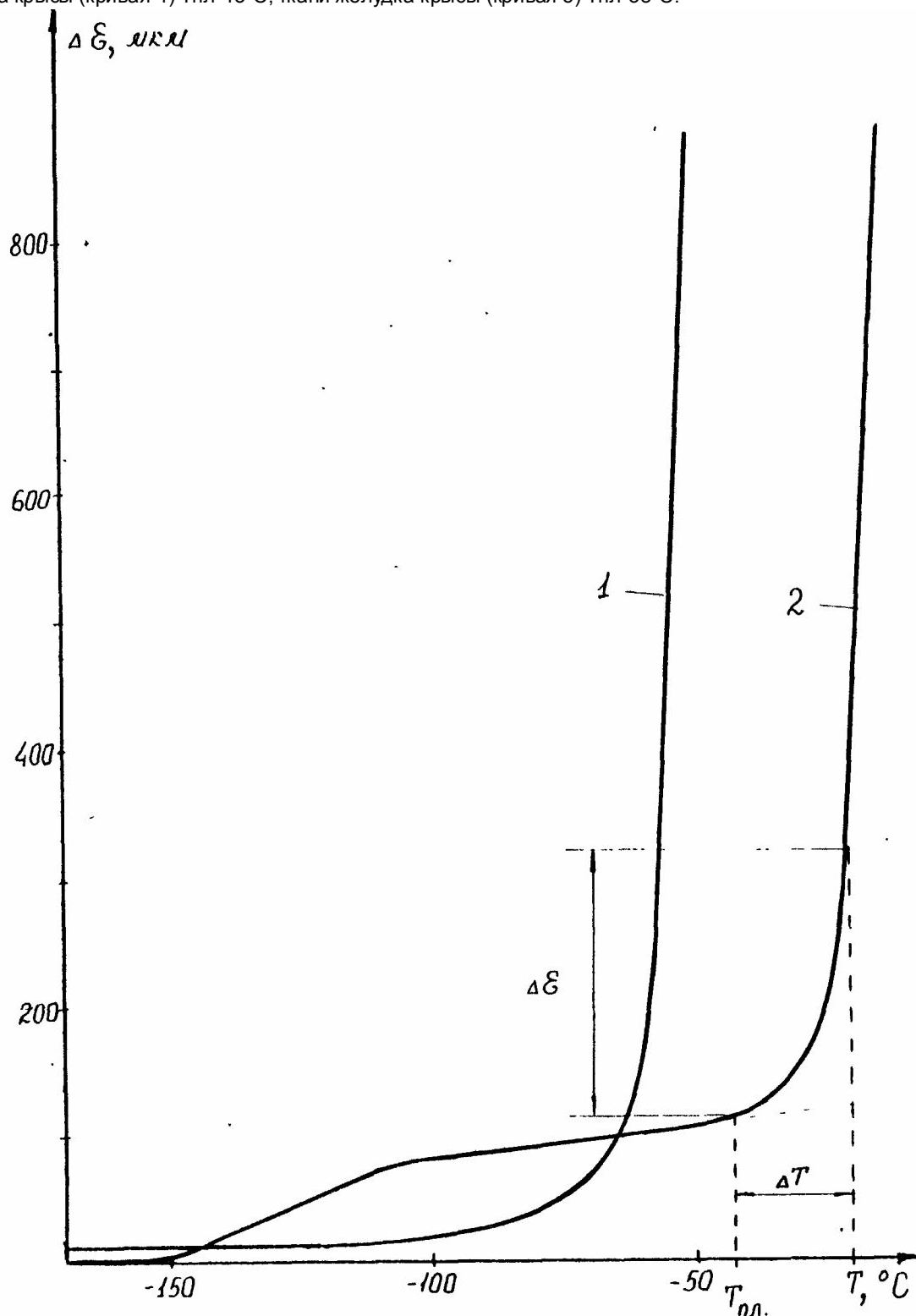
ε - деформация образца;

σ - прикладываемое деформирующее напряжение.

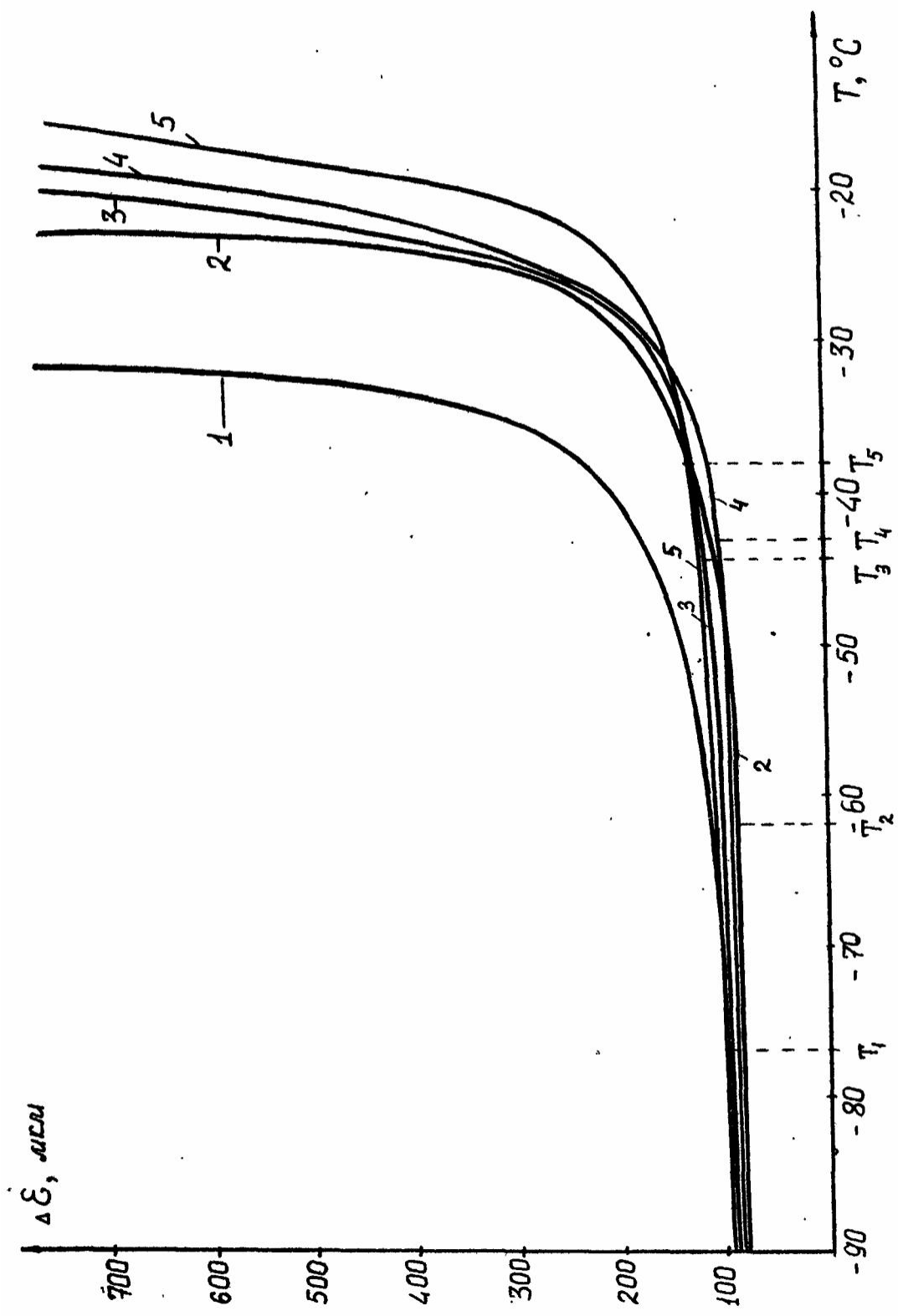
Термопластические кривые были получены для всех вышеуказанных образцов. Типичный вид таких кривых для клеточных суспензий показан на примере эритроциты (фиг. 1, кривая 1), для тканей на примере поперечно-полосатой мышцы (фиг. 1, кривая 2). Представленные кривые имеют ярко выраженный многостадийный характер, причем каждая из стадий соответствует определенному фазовому состоянию биообъекта. Это связано с тем, что упруго-пластические характеристики отдельных фракций образца при их переходе от жидкого к кристаллическому или застеклованному состоянию изменяется на несколько порядков по абсолютной величине. Соответственно изменяется сопротивление ткани внешним напряжением, а значит и ее суммарная пластическая деформация $\varepsilon \Delta t$, происходящая под действием этих напряжений за определенный промежуток времени Δt . В свою очередь, изменения величины $\Delta \varepsilon \Delta t$, сопровождающие фазовые переходы в исследуемых образцах, приводят к характерным перегибам на термопластических кривых, что крайне упрощает процедуру определения температурных интервалов существования определенных фазовых состояний биообъектов.

Согласно полученным кривым (фиг. 2), в интервале температур $-180... -150^{\circ}\text{C}$ образцы тканей находятся в закристаллизованном состоянии с высокостабильной структурой. Диффузионные и рекристаллизационные процессы в этом интервале температур в них подавлены, в результате чего скорость нарастания пластической деформации с повышением температуры здесь практически равна нулю. При температуре выше -150°C в замороженных тканях начинаются рекристаллизационные процессы, которые протекают вплоть до температур -80°C . На графике (фиг.1, фиг.2) эта стадия характеризуется нарастанием деформации $\sigma \Delta t$ с повышением температуры. Скорость деформации здесь пропорциональна интенсивности протекания рекристаллизационных процессов. После

завершения рекристаллизации структура образца вновь стабилизируется, что отражается на термопластических кривых уменьшением скорости пластической деформации. Таким образом, область протекания рекристаллизационных процессов выделена на термопластической кривой специфическим перегибом и хорошо определяется экспериментально. При дальнейшем повышении температуры начинаются процессы расстеклования биополимерных комплексов и плавления образовавшихся в образцах кристаллов льда, которые сопровождаются резким увеличением пластичности образцов. Температура начала этих процессов $T_{пл}$ для разных тканей может сильно отличаться (фиг. 2). Так, для тканей головного мозга (кривая 1) $T_{пл} - 77^{\circ}\text{C}$, для ткани почки крысы (кривая 2) $T_{пл} - 62^{\circ}\text{C}$, ткани сердца крысы (кривая 3) $T_{пл} - 44,5^{\circ}\text{C}$, ткани поперечно-полосатой мышцы бедра крысы (кривая 4) $T_{пл} - 43^{\circ}\text{C}$, ткани желудка крысы (кривая 5) $T_{пл} - 38^{\circ}\text{C}$.



Фиг. 1



Фиг. 2.