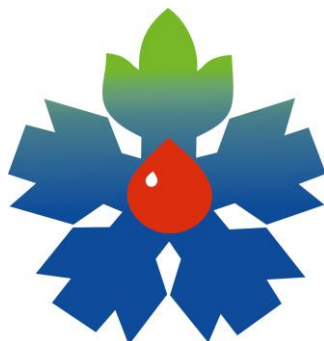


**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**



**ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ФАКТОРИ ТА
МЕХАНІЗМИ КРІОПОШКОДЖЕНЬ БІООБ'ЄКТІВ**

Методичні рекомендації для самостійної роботи
аспірантів 1 курсу
галузь знань 09 Біологія
спеціальність 091 Біологія
Дисципліна «Теоретичні основи кріобіології»

Харків 2022

Рецензенти: Т.М. Гуріна – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник; провідний науковий співробітник відділу кріомікробіології; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України.

В.П. Берест – доктор фізико-математичних наук, доцент; завідувач кафедри молекулярної і медичної біофізики факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна.

Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол №_9_ від 29.09.2022 р.)

Фізико-хімічні фактори та механізми кріопошкоджень біооб'єктів: Методичні рекомендації для самостійної роботи аспірантів 1 курсу (галузь знань 09 Біологія, спеціальність 091 Біологія) з дисципліни «Теоретичні основи кріобіології» / *Нардід О.А., Пахомов О.В., Гордієнко О.І., Кулешова Л.Г., Божкова Ю.О.* / [Електронний ресурс] – Х.: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 2022. – 31 с.

У методичних рекомендаціях розглядаються теоретичні питання кріобіологічної науки: теорії та механізми кріопошкодження, фазові переходи у водному середовищі та біомембранах, термодинамічні закономірності процесу кристалізації, процеси масопереносу між клітиною і середовищем на різних етапах кріоконсервування, зв'язок коефіцієнтів проникності клітинних мембран для води та кріопротектору з оптимальними режимами кріоконсервування клітин.

Для здобувачів вищої освіти на третьому освітньо-науковому рівні (доктор філософії).

ЗМІСТ

<i>Пусковий механізм кріопошкоджень</i>	2
<i>Позаклітинна кристалізація</i>	2
<i>Внутрішньоклітинна кристалізація</i>	4
<i>Рекристалізація</i>	6
<i>Евтектична кристалізація</i>	8
<i>Механічні пошкодження</i>	9
<i>Ефекти концентрованих розчинів</i>	10
<i>Дегідратація - регідратація</i>	12
<i>Фазові переходи мембран</i>	14
<i>Зміна концентрації водневих іонів (pH)</i>	15
<i>Електростатичні ефекти</i>	16
<i>Сульфгідрильна гіпотеза</i>	16
<i>Температурний шок</i>	17
<i>Постгіпертонічний лізис</i>	17
<i>Перекисне окиснення</i>	19
<i>Двофакторна теорія кріопошкоджень</i>	21
<i>Мультифакторна теорія кріопошкоджень</i>	22
<i>Контрольні питання</i>	24
<i>Література</i>	26

1. Пусковий механізм кріопошкоджень

Заморожування-відігрів біологічних об'єктів і наступні за цим кріопошкодження безпосередньо пов'язані зі змінами агрегатного стану та фазовими переходами вмісту клітин і тканин, а також навколишнього водного середовища (Рис. 1).

Агрегатний стан – це стан речовини або тіла, що залежить від температури і тиску, що характеризується здатністю або нездатністю зберігати об'єм і форму, наявністю або відсутністю далекого та ближнього порядку. Зміни агрегатного стану супроводжується стрибкоподібними змінами вільної енергії, ентропії, густини та інших фізичних властивостей. Виділяють три основних агрегатних стан речовин: *твердий, рідкий та газоподібний*.

Фазовий перехід – перехід речовини з однієї термодинамічної фази до іншої при зміні зовнішніх умов (наприклад, температури). Прикладами фазових переходів може бути: плавлення – кристалізація; сублімація – десублімація та ін. Оскільки вода становить приблизно 70% маси тканин тварин, то переходи води з рідкого стану в тверде при заморожуванні, а потім знову в рідке при розморожуванні, значним чином впливають на цілісність клітин і тканин. Тобто, дегідратація, утворення кристалів льоду або аморфної фази всередині та поза клітиною, зростання кристалів, перекристалізація та танення – центральні процеси, що відбуваються під час заморожування-відігріву. Отже, саме *зміна агрегатного стану* є пусковим механізмом формування цілого каскаду факторів та процесів кріопошкоджень. Ця концепція, що пусковим механізмом кріопошкоджень при заморожуванні є формування льоду, була висловлена ще в середині минулого століття Б. Люїє.

Характер кристалізації рідкої фази біологічних об'єктів та наявність комплексу кріопошкоджуючих факторів та процесів істотно залежать від методів та швидкостей заморожування та відтавання. Найбільш повно вони виявляються за повільних швидкостей заморожування біологічних об'єктів.

2 Позаклітинна кристалізація

Зниження температури рідких біологічних систем нижче критичних значень спочатку призводить до затвердіння позаклітинної рідини. Залежно від швидкості охолодження та використання кріопротекторів, в результаті кристалізаційного процесу можуть утворюватися як крупнокристалічні, так і дрібнокристалічні структури льоду. Початок позаклітинної кристалізації значною мірою визначається рівнем переохолодження розчину, температурним градієнтом в системі, що охолоджується, і швидкістю тепловідведення. Названі фактори багато в

чому визначають швидкість зростання, ступінь дисперсності та вид льоду, що утворюється.

При охолодженні рідини процес кристалізації починається за наявності зародків кристалів. Структура води включає льдоподібні структури – кластери, що здатні стати зародками кристалів. Зі зниженням температури частка кластерів та їх агрегатів збільшується. Зародки кристалів можуть з'явитися за участю домішок, наприклад, білків, метаболітів тощо. Перетворення на здатні до зростання кристалічні зародки енергетично не вигідно без переохолодження. *Переохолодження*, в даному випадку, – це зниження температури рідини нижче температури кристалізації. Температура кристалізації води за нормальних умов 0°C , відповідно рідина повинна переохолодитися нижче цієї температури для того, щоб із зародків кристалів сформувався повноцінний кристал – лід. Таким чином, досягнення системою певного рівня переохолодження є неодмінною умовою виникнення зародків кристалів. Швидкість утворення зародків кристалів, як було зазначено раніше, прямо пропорційна рівню переохолодження.

При позаклітинній кристалізації зростання кількох кристалів призводитиме до зниження концентрації рідкої фази води, збільшуючи гіпертонічність розчину навколо клітини. Висока концентрація речовин, оточуючих клітину, є наслідком позаклітинного кристалоутворення і називається *ефектом розчину*. Зростання позаклітинного кристала відбуватиметься як за рахунок виморожування води поза клітиною, так і за рахунок тієї води, яка виходить із клітини. Це веде до дегідратації, зменшення об'єму клітини та пошкодження клітинної мембрани, що також негативно позначається на виживанні клітини. Крім того, зовнішні кристали льоду, що ростуть, можуть вести до механічного пошкодження клітин (Рис. 1).

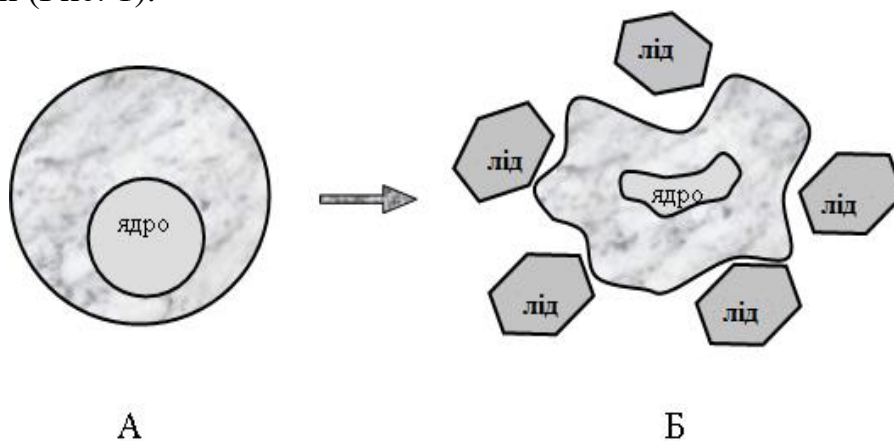


Рис. 1. Зростання позаклітинних кристалів та дегідратація клітини при заморожуванні. А – клітина в ізотонічному розчині до заморожування. Б – клітина у замороженому стані, оточена кристалами льоду у гіпертонічному розчині.

Збереження заморожених клітин може залежати і від структури льоду, що утворюється. При утворенні крупнокристалічних структур відбувається концентрування клітин у каналах між кристалами льоду. Тісний контакт клітин може стати причиною їхньої агрегації.

Позаклітинна кристалізація на початкових її етапах може якийсь час відігравати певну роль у захисті клітин від появи в них кристалів внутрішньоклітинного льоду.

3. Внутрішньоклітинна кристалізація

Слідом за зовнішньою кристалізацією настає внутрішньоклітинна кристалізація води (Рис.2, 3), яка багато в чому визначається швидкістю охолодження.

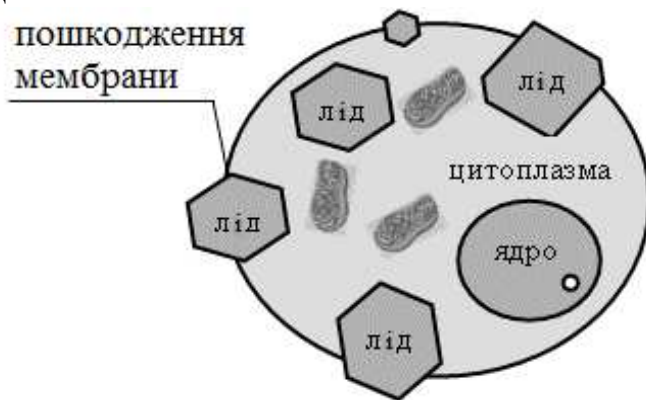


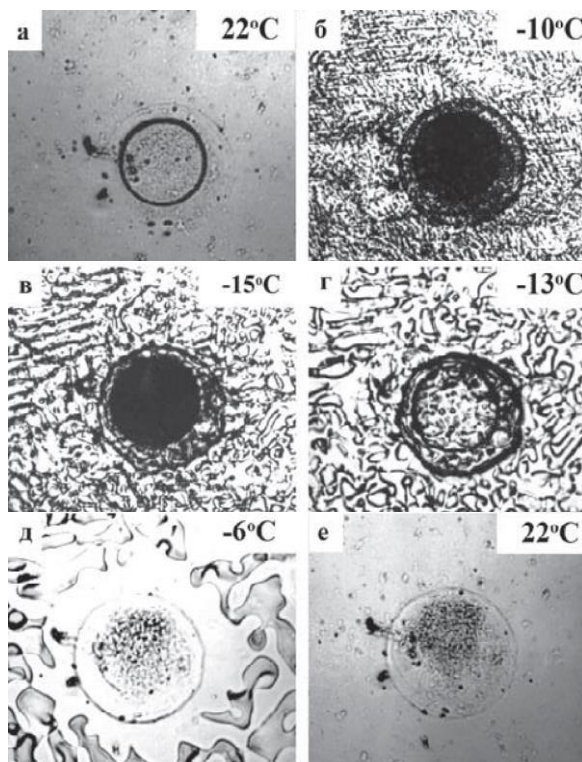
Рис. 2. Внутрішньоклітинна кристалізація при заморожуванні.

Однак для різних видів клітин швидкості, при яких може спостерігатись внутрішньоклітинна кристалізація, відрізняються в десятки разів. Це зумовлено відмінностями в розмірах клітин, проникності їх мембран для води, а також складових мембрани і цитозолу. Утворення внутрішньоклітинного льоду залежить не тільки від швидкості охолодження, а й від ступеня переохолодження системи.

Внутрішньоклітинний лід може утворюватися при значному переохолодженні шляхом спонтанного зародкоутворення. Своєрідною «затравкою» для внутрішньоклітинного льоду може бути позаклітинний лід. Передбачається, що кристали льоду, контактуючи з мембраною клітини, викликають їхню фізичну деформацію, в результаті якої в мембрані можливе формування розривів і фактично наскрізне проростання позаклітинного льоду через мембрани. Не виключається можливість, що контакт позаклітинного льоду із зовнішньою поверхнею мембрани індукуює в ній структурні зміни, внаслідок яких внутрішня поверхня мембрани стає ефективним каталізатором внутрішньоклітинного льоду. В якості зовнішнього кристалу може виступати і сусідня клітина з внутрішньоклітинним льодом. У даному випадку лід у клітині, що закристалізовалась, розглядається як позаклітинний по відношенню до

сусідньої клітини, а білки плазматичної мембрани, взаємодіючи з позаклітинним льодом, виступають як каталізatori внутрішньоклітинного зародкоутворення.

При внутрішньоклітинному льодоутворенні збереження клітин залежить як від сумарного внутрішньоклітинного об'єму кристалів льоду, так і від їх фактичного розміру. Внутрішньоклітинна кристалізація часто розглядається як одна з причин летальних наслідків для клітини. Механізм пошкодження в даному випадку можна продемонструвати на прикладі скляної пляшки з водою, виставленої на мороз. Вона може тріснути, оскільки при замерзанні об'єм кристалічної води стає більше, ніж рідкої, давлючи на скляні стіни пляшки. Подібне пошкодження може відбуватися з клітинами.



Позаклітинний лід

Внутрішньоклітинна кристалізація

Рис. 3. Фотографії, що демонструють кінетику формування льоду та зміни клітин при повільному заморожуванні та відтаванні у фізіологічному розчині. На фото видно, що із зміною температури модифікується структура та розміри кристалів як позаклітинного, так і внутрішньоклітинного льоду. Рекристалізація льоду реєструється як при заморожуванні, так при відігріванні.

а – інтактна клітина; б, в – заморожування (утворення позаклітинного та внутрішньоклітинного льоду); г – відігрів (рекристалізація льоду); д – плавлення льоду; е – відігріта та пошкоджена внутрішньоклітинним льодом клітина.

Застосування кріопротекторів сприяє помірній дегідратації клітин, знижує точку кристалізації розчинів, чим значно перешкоджає передчасному появі кристалів льоду. Збільшення швидкості зневоднення клітин також один з механізмів їх захисту від виникнення внутрішньоклітинного льоду. Наприклад, було показано, що штучна експресія аквапоринів у мембранах клітин, що збільшує водний обмін, у ряді випадків суттєво покращує здатність клітин переносити заморожування.

Однак, повна картина пошкоджень клітин при заморожуванні (зокрема внутрішньоклітинним льодом) досі залишається не до кінця ясною.

4. Рекристалізація

У кріобіології під рекристалізацією розуміють процес *укрупнення (добудови)* кристалів льоду в ході кріоконсервації. Цей процес має одну основу – недобудовані, нестабільні структури льоду, які мають тенденцію до укрупнення. При високих швидкостях охолодження температура зразка падає настільки швидко, що формування стабільного льоду просто не встигає завершитися після досягнення температури нижче мінус 160°C.

Зазвичай рекристалізація льоду відбувається в діапазоні температур від мінус 80 до мінус 160°C, причому при заморожуванні так і при відігріванні. Розрізняють рекристалізацію *спонтанну та індуковану*.

Спонтанна рекристалізація відбувається при охолодженні, при цьому сформовані на початковому етапі охолодження кристалічні структури починають перебудовуватися та укрупняються, формуючи більш стабільний лід (рис. 4).

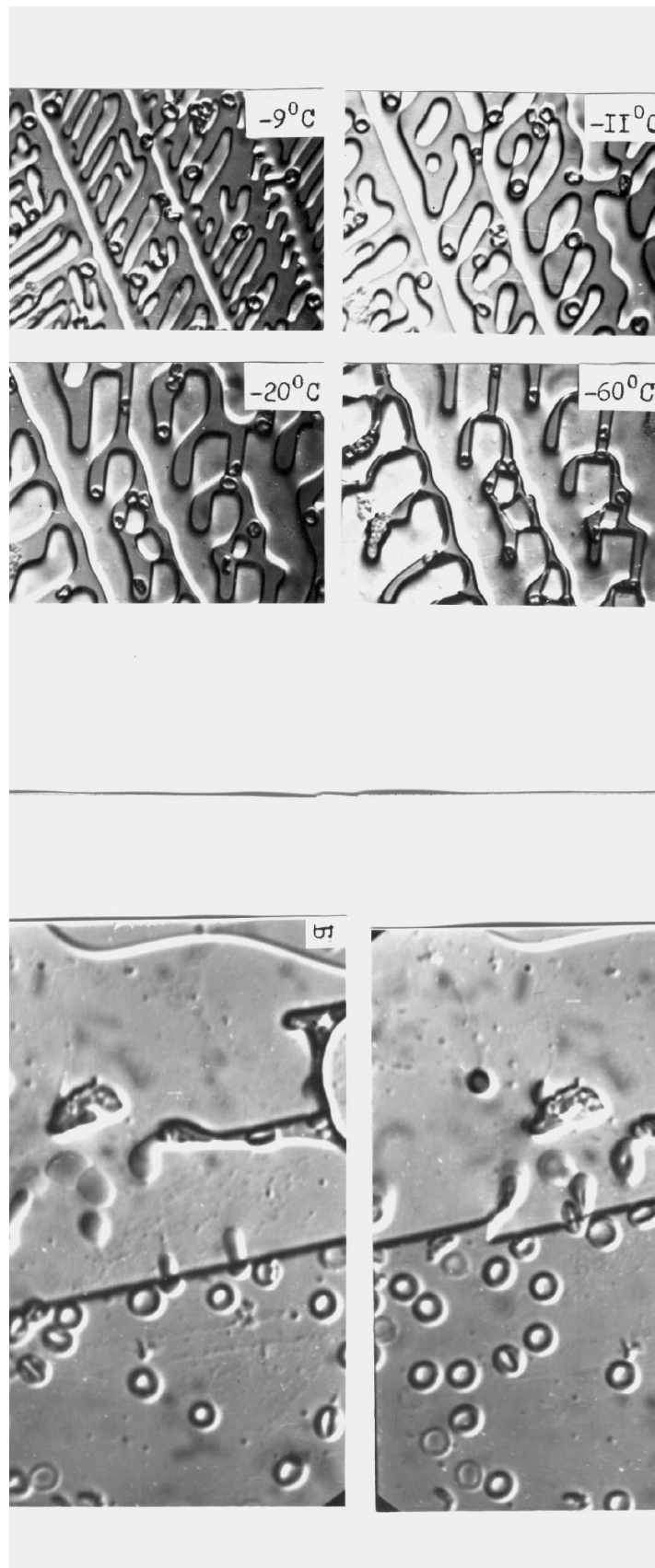


Рис. 4. Фотографії спонтанної рекристалізації та укрупнення дрібнокристалічної структури льоду при повільному заморожуванні фізіологічного розчину.

Індукована рекристалізація відбувається при відігріванні. Хоча структури льоду при температурі нижче мінус 160°C відносно стабільні, при відігріванні вони можуть стати центрами рекристалізації (Рис.5).

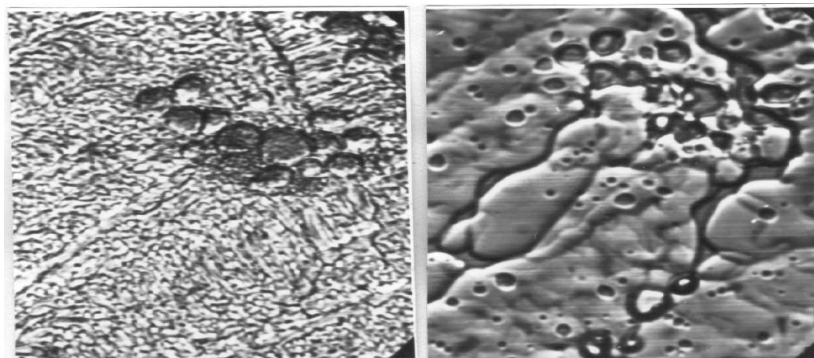


Рис. 5. Фотографії індукованої рекристалізації та укрупнення дрібнокристалічної структури позаклітинного льоду при повільному відігріванні.

Індукована рекристалізація відбувається головним чином у температурному діапазоні мінус 80 – мінус 160°C, але спостерігається і при більш високих температурах. При відігріванні процеси рекристалізації особливо інтенсивно протікають у швидко заморожених вітрифікованих системах, які мають ізотропність та аморфність структури та характеризуються нестійкістю затверділого стану. При відігріванні таких систем аморфний стан перетворюється на кристалічний. Цей процес супроводжується виділенням прихованої теплоти плавлення та короточасним стрибком температури, що легко виявляється методом диференціального термічного аналізу. Незалежно від швидкості відігріву, лід, що утворюється при цьому зі склоподібного стану, спочатку має кубічну форму, а потім трансформується у звичайний гексагональний лід.

Потенційно можливі пошкодження, спричинені індукованою рекристалізацією, особливо важливо враховувати при кріоконсервації шляхом вітрифікації. При вітрифікації розчин перебуває у метастабільному стані. Це збільшує можливість спонтанної кристалізації, особливо при повільному відігріві.

Рекристалізаційні процеси відіграють важливу роль у кріопошкодженні клітин, оскільки укрупнення кристалів льоду можуть призвести до механічних руйнувань структури клітини.

5. Евтектична кристалізація

Евтектика – це рідка система (розчин, розплав), яка при певному тиску перебуває в рівновазі з твердими фазами. Заморожування водних розчинів часто тягне концентрування розчинених речовин у залишковій рідкій фазі і осадження-агрегацію речовин при перевищенні їх між

розчинності. Перехід води з рідкого в твердий стан при зниженні температури відбувається до тих пір, поки концентрація розчиненої речовини не досягне певної для даної речовини величини, при якій весь розчин твердне в суцільну масу. Вона складається з прошарків льоду, розчиненої речовини та кристалогідратів цієї речовини. Таку застиглу масу, що складається із суміші твердих речовин, теж називають *евтектикою*. Затвердіння таких розчинів називається *евтектичною кристалізацією*. Температура, коли відбувається утворення тотальної твердої маси, називається *евтектичною температурою*, а відповідна концентрація розчину – *евтектичною концентрацією*. Евтектична температура для різних кріоконсервантів може суттєво відрізнятися, але зазвичай обмежується областю мінус 15 – мінус 25°C. Біологічні об'єкти, що потрапляють у такі умови заморожування-відтавання, піддаються додатковому суттєвому патологічному впливу.

Кількісні сторони замерзання розчинів описують закони Рауля, які стверджують, що зниження точки замерзання порівняно з чистим розчинником пропорційно кількості речовини у кількості розчинника. Еквімолярні кількості різних речовин, будучи розчиненими в тій самій кількості даного розчинника, знижують його точку замерзання на те саме число градусів. Зниження точки замерзання, відповідне розчиненню 1 моля речовини в 1000 г розчинника, є постійною величиною для даного розчинника та називається його *кріоскопічною константою*. Концентрація розчинених речовин, що призводить до найнижчої температури, при якій розчин знаходиться ще в рідкому стані, є *евтектичним розчином*. Як правило, по досягненню меж розчинності крім внутрішньо- і позаклітинної кристалізації води, ми маємо кристалізацію інших речовин, присутніх у клітині, та кріоконсервуючого розчину, що супроводжується випаданням кристалів солей, кристалогідратів та ін.

Характер евтектичної кристалізації залежить від композиції кріоконсервуючого розчину та істотно може впливати на живі об'єкти. Додавання в розчини, що заморожуються, таких ефективних кріопротекторів, як гліцерин, 1,2-пропандіол, ДМСО, ПЕГ, які здатні зв'язувати воду, призводить до того, що солі, які знаходяться в такому водно-кріопротекторному розчині, присутні там у вигляді складних комплексів. Затвердіючи в такому стані, вони мають помітно менший згубний вплив на біологічні об'єкти. Крім цього, кріопротектори здатні знижувати область евтектичної кристалізації, що дозволяє зберігати деякі об'єкти за помірно низьких температур.

6. Механічні пошкодження

Збільшення об'єму під час замерзання. У процесі заморожування об'єм кристалів води, що утворюються, стає більше, ніж початковий рідкий об'єм. Внаслідок цього всі мембрани, що оточують структури, які мають певні форми та об'єм, зазнають дуже сильного тиску. Таким чином,

лід може просто розчавити або розірвати клітину та її органели при внутрішньоклітинному кристалоутворенні.

Термодинамічна напруга. Наприклад, при охолодженні середовище кріоконсервування поблизу стінки контейнера, що містить біооб'єкт, у кожний момент часу буде холодніше, ніж центральна частина контейнера. Тобто відбувається формування температурних градієнтів. Враховуючи, що об'єм речовин за різних температур різний, присутність таких градієнтів може призводити до термодинамічних напруг, результатом чого може бути розрив клітин, розтріскування тканини та органу.

Здавлення. Частина клітин, захоплених у кристал льоду, виявляється замкненою. Це може призводити до значного зростання тиску всередині «крижаної капсули» та руйнування клітин. Так, ще на початку минулого століття Максимовим Н.І. було показано, що цитоплазма клітин замороженої рослини зазнає тиску з боку зростаючих у міжклітинниках або між протоплазмою та оболонкою клітин крижаних кристалів. Такі уявлення лежали в основі ранніх концепцій кріопошкодження біооб'єктів при заморожуванні, підкреслюючи роль і значення механічного пошкодження біооб'єктів поза- та внутрішньоклітинними кристалами льоду.

Пошкодження мембран та внутрішньоклітинних структур. Під механічними пошкодженнями розуміють також прямий ефект дії кристалів льоду, що викликає пошкодження плазматичної мембрани клітин та структурної організації внутрішньоклітинних структур внаслідок зростання кристалів. Плазматичні мембрани клітин можуть виявляти стійкість до кристалів льоду, що повільно зростають, але сильно пошкоджуватись у разі дуже швидкого (вибухового) росту кристалів, які іноді можуть пронизувати мембрани наскрізь. При цьому процеси рекристалізації, про які говорилося раніше, відіграють важливу роль у кріопошкодженні клітин, оскільки укрупнення кристалів, особливо внутрішньоклітинного льоду, може призвести до механічних руйнувань її структури.

7. Ефекти концентрованих розчинів

Ефекти розчинів – це вплив на клітини високих концентрацій речовин, що утворюються під час кріоконсервації. Клітини можуть бути оточені високими концентраціями різноманітних речовин у результаті виморожування води при формуванні позаклітинного льоду.

Розвиток методів кріомікроскопії дозволив встановити процеси, що протікають у клітинних суспензіях, що заморожуються. Було виявлено, що при повільних швидкостях заморожування більшість клітин відтісняється фронтом кристалізації та виявляється у звивистих рідких мікроканаллях, в яких знаходяться концентровані розчини солей. Використовуючи

кріомікроскопію, можна спостерігати, як клітини в каналах між кристалами льоду після стиснення починають набухати до розмірів, що значно перевищують вихідні. Подібним чином вони поведуться в гіпертонічних середовищах. Причиною набухання клітин у такому середовищі може бути різке підвищення проникності плазматичних мембран для позаклітинних розчинів, що призводить до зникнення концентраційних (і, отже, осмотичних) градієнтів на мембрані. В результаті починає діяти механізм, відомий як колоїдно-осмотичний лізис (Рис. 6).

На основі зроблених спостережень було сформульовано концепцію пошкодження клітин внаслідок дії «ефектів розчинів». Згідно з висунутою концепцією пошкодження клітин, провідним механізмом руйнування біооб'єкта, що заморожується, визнавалася дія гіперконцентрованих розчинів електролітів, метаболітів та інших речовин, що знаходяться в рідкій фазі, на структуру плазматичної мембрани клітин.

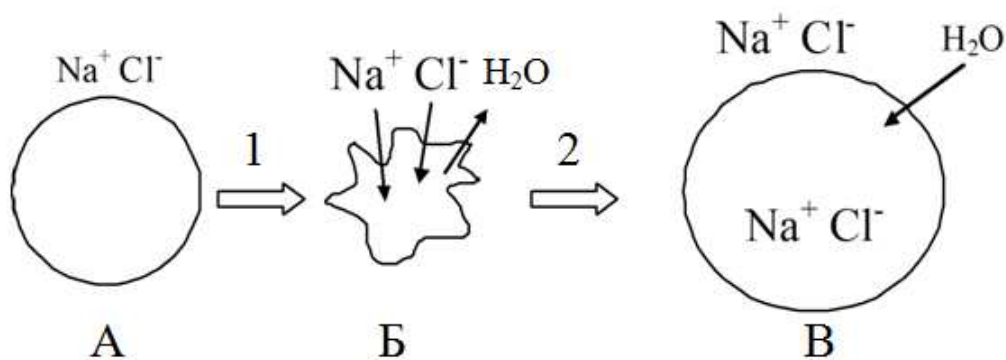


Рис. 6. Схема гіпертонічного (колоїдно-осмотичного) лізису клітин у процесі заморожування-обігріву в ізотонічному розчині NaCl. 1 – заморожування, 2 – відігрів. А – клітина перед заморожуванням, Б – зневоднена клітина, насичена NaCl, В – набрякла після відігріву клітина.

У 1953÷1955 роках були опубліковані роботи J. Lovelock, який звернув увагу на те, що збільшення концентрації кріопротектора (гліцерину) призводить не тільки до зменшення кількості льоду, що утворюється при кожній даній температурі, але і концентрації позаклітинної солі (NaCl). Було встановлено відповідність між температурами, за яких починається пошкодження еритроцитів, і температурами, за яких досягається концентрація 0,8М NaCl. Автор висловив гіпотезу, згідно з якою причиною кріопошкодження при повільному заморожуванні є ліотропна дія солей, що призводить до порушення співвідношення холестерин/фосфоліпіди у плазматичній мембрані. Гіпотеза Лавлока надалі неодноразово критикувалася щодо

причини пошкодження мембран, але її основа – наявність пошкоджуючої межі позаклітинної концентрації речовин і те, що головним локусом кріопошкодження є плазматична мембрана – знайшла відображення у подальшому розвитку теорій кріопошкодження та кріозахисту.

Основу ефектів розчину становлять так звані *ліотропні та хаотропні ефекти*.

Ліотропні ефекти – здатність іонів змінювати фізичні властивості розчинника, такі як в'язкість, поверхневий натяг, набухання полімерних молекул та їх висолення. Наприклад, було показано, деякі аніони здатні змінювати набухання таких полімерів як білки. Одні з них збільшують розчинність білків, інші навпаки зменшують. Ці аніони за ступенем їх впливу на розчинність білка можна розсортувати (ліотропні ряди, ряди Гофмейстера): $\text{CNS}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-}$. Роданіт (CNS^-) та йодид (I^-) – максимально збільшую набухання білка (наприклад, желатину) та сприяють його розчиненню, тоді як присутність сульфату (SO_4^{2-}) у розчині веде до зниження розчинності білків та їх преципітації, що становить сутність процесу висолювання білків.

Катіони також мають різну здатність осаджувати білки. У ряді $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$, літій (Li^+) має максимальну здатність осаджувати білки.

Хаотропний ефект – здатність певних речовин порушувати структурний порядок системи. Наприклад, такі речовини як сечовина і хлорид гуанідинію здатні витіснити воду, що знаходиться в гідратних оболонках білків та інших полімерів (*пов'язана вода*), а також руйнувати Ван-дер-Ваальсові зв'язки. Усе це призводить до втрати нативної фізіологічної конформації молекули полімерів.

Таким чином, збільшення концентрації іонів при формуванні льоду може призвести до прямого порушення ними клітинних структур.

8 Дегідратація-регідратація

На початковому етапі повільного заморожування суспензії клітин протікають процеси зародження, формування та зростання позаклітинних кристалів льоду із збереженням рідкого внутрішньоклітинного стану. Зовнішня кристалізація здійснюється за рахунок переходу в твердий стан позаклітинної води та частини об'ємної води клітин, що виходить з них в результаті осмотичного ефекту, що також використовується для добудови каркасу льоду. При цьому вміст клітки досить сильно концентрується. При такій дегідrataції клітин і гіперконцентрації солей та інших речовин, що виникає при цьому, відбувається порушення структури та функції внутрішньоклітинних органел (лізосом, мітохондрій, ендоплазматичного ретикулума), що мають мембранну будову.

Збільшення концентрації речовин призводить до порушення в'язко-еластичних властивостей мембран, знижує їх стійкість до осмотичного впливу і навіть втрати клітиною фрагментів мембран. Результатом цього є

проникнення позаклітинного середовища всередину клітини. Процес дегідратації сприяє також просторовому зближенню макромолекул та їх фізичному контакту, що робить свій внесок у прояві кріопшкодження.

Зниження концентрації вільної води, зрештою, веде до зменшення об'єму клітини. У 70-х роках минулого століття Г.Мерімен висунув так звану *теорію мінімального об'єму*. Він стверджував, що зменшення вмісту внутрішньоклітинної води саме по собі не є вирішальним фактором кріопшкодження. При цьому вирішальне значення має зниження об'єму клітини до певного критичного рівня – мінімального об'єму. По досягненню цього рівня бар'єрні властивості мембран різко падають. Вони стають проникними для молекул та іонів. Ушкодження при цьому, на думку автора, складається з двох етапів (Рис. 7).

На етапі заморожування (1 етап, дегідратація) збільшується проникність клітинної мембрани до концентрованого позаклітинного розчину. На етапі відігріву (2 етап, регідратація) еритроцити, опиняючись у середовищі з нижчою тонічністю, ніж їх вміст, набухають; їхня мембрана розтягується до утворення макропорів і розривів мембрани, через які відбувається втрата клітинами гемоглобіну у позаклітинне середовище. Іншими словами, при зниженні об'єму клітини до критичного рівня відбувалося різке зниження виживання клітин.

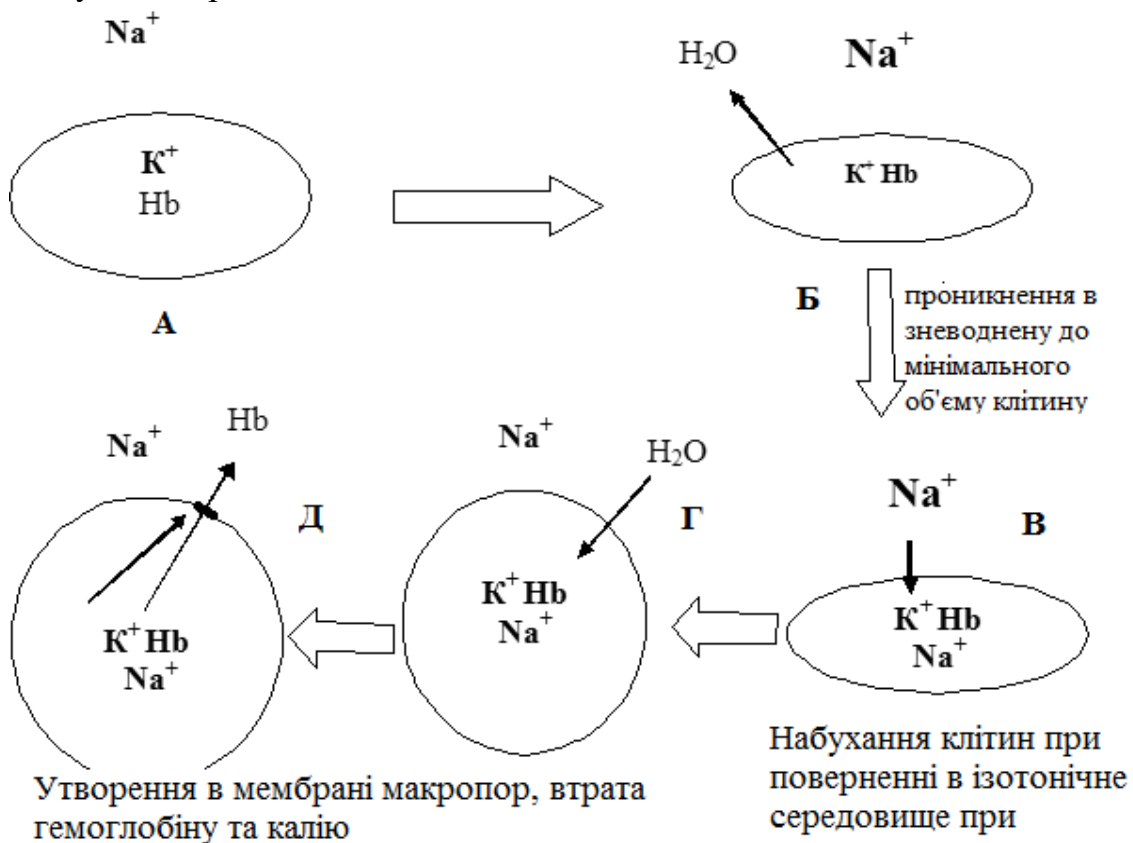


Рис.7. Ілюстрація гіпотези Мерімена на прикладі еритроцита. А – клітина перед заморожуванням, Б, В – дегідратована клітина, Г – набухання клітини при відігріванні, Д – пошкодження мембрани клітини.

9. Фазові переходи мембран.

Гіпотеза «мембранного пошкодження» запропонована Квіном П.Д., яка базується на термотропних фазових переходах ліпідів мембран (Рис. 8). За нормальних фізіологічних умов біологічні мембрани перебувають у рідкокристалічному стані, що необхідне для виконання функцій. Мембранні компоненти здатні обертатися і коливатися, дифундувати вздовж ліпідних моношарів, а також перескакувати з одного моношару в інший. При охолодженні агрегатний стан мембранного бішару змінюється: рідкокристалічна фаза перетворюється на гелеподібну. Внаслідок гетерогенності та складності складу мембран перехід у них відбувається не відразу по всьому об'єму, а то в одній, то в іншій її частині, загалом займаючи широкий інтервал температур. Вважається, що фазовий поділ ліпідів та білків призводить до утворення мікродефектів у структурі бішару на межах твердої та рідкої фаз. Внаслідок цього порушується транспортна та бар'єрна функція мембран. Агрегація білків при латеральному поділі мембраннозв'язаних компонентів веде до порушення функціонування мембранних ферментів. Витік з клітин біокатіонів та метаболітів через дефекти структури на межі розділу між дискретними твердими та рідкими доменами мембрани також може бути причиною пошкодження клітин.

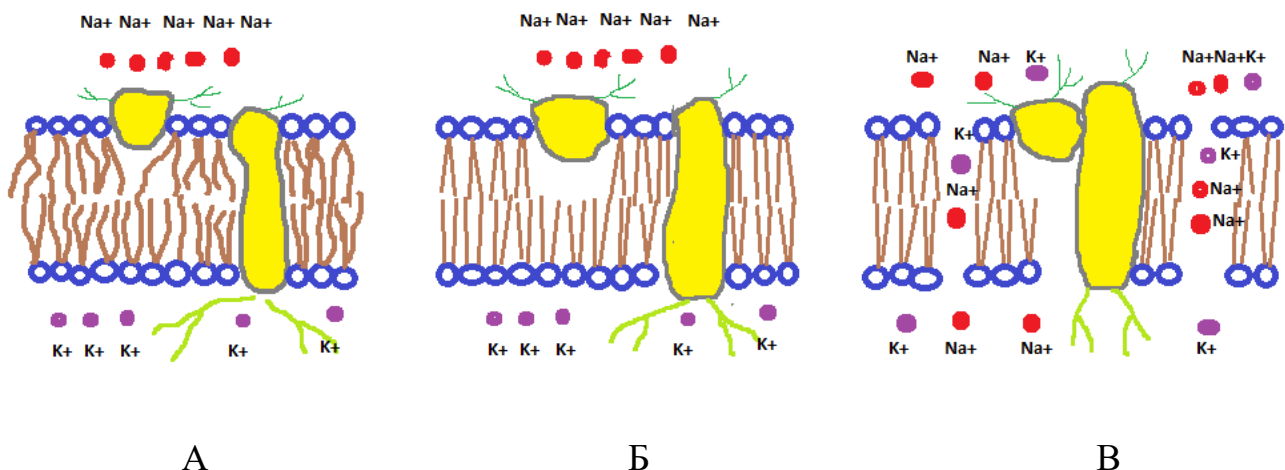


Рис. 8. Схема фазових переходів ліпідів у біологічних мембранах.
А – мембрана до охолодження; Б – затвердіння ліпідів та порушення білок-ліпідних взаємодій при охолодженні; С – латеральний поділ ліпідів, агрегація білків, формування трансмембранних дефектів та витік іонів.

Поділ мембранних компонентів може бути викликаний не тільки зниженням температури, але й деформацією плазматичних мембран у процесі зневоднення або зводнення клітин, що мають місце на різних етапах низькотемпературного консервування.

10. Зміна концентрації водневих іонів (рН)

Багато макромолекул, особливо це стосується білків, можуть виконувати свої функції лише у певних діапазонах рН. Надлишок іонів водню в кріоконсервуючому розчині призводить до протонування (приєднання H^+) певних функціональних груп, наприклад, карбоксильних груп бічних ланцюгів амінокислотних залишків, змінюючи їхній заряд. Це впливає на ступінь електростатичної взаємодії між групами в поліпептиді, зміну вторинної, третинної та четвертинної структур білка та як наслідок веде до денатурації білка та втрати функції.

Протонування головок ліпідів у мембранах також має велике значення. Наприклад, це впливає на температуру фазових переходів ліпідів у мембранах, а також веде до зміни властивостей фрагментів мембран, спричиняючи деформацію клітин.

Щоб пояснити, чому змінюється рН при заморожуванні потрібно знову повернутися до концепції висловленої Б. Люйе – пусковим механізмом кріопошкоджень при заморожуванні є формування льоду. Формування льоду, підвищення концентрації речовин, оточуючих клітини, та зниження температури – взаємопов'язані процеси. Відомо, що клітини, тканини, а також розчини для кріоконсервації містять велику кількість високо- та низькомолекулярних сполук. Деякі з цих сполук, наприклад, є компонентами буферних систем, наприклад, фосфатної та бікарбонатної системи. При підвищенні концентрації розчинених речовин у розчині, що оточує біологічний об'єкт, відбувається поступове осадження або кристалізація (евтектична кристалізація) компонентів цих буферних систем (особливо це стосується акцепторів протонів, наприклад, HPO_4^{2-} з формуванням кристалів Na_2HPO_4).

Було показано, що рН розчинів $NaCl$ і KCl , що містять компоненти фосфатної буферної системи, значно змінюється. Присутність $NaCl$ у цій системі веде до значного підвищення концентрації H^+ через зміну складу фосфатного буфера. Подібне відбувається і з іншими буферними системами – протейиновою, гемоглобіиновою та ін. Величина рН поблизу температури евтектичної кристалізації також зазнає значних змін.

На відміну від розчинів, що містять $NaCl$, розчини KCl меншою мірою впливають на рН. Вони взагалі схильні до залужування, ніж закислення. Тому деякі середовища для кріоконсервації містять малу кількість Na^+ , але високий вміст K^+ .

Таким чином, зсув рН кріоконсервуючих середовищ в кислу область при заморожуванні є наслідком зміни їх складу при кристалізації солей

11. Електростатичні ефекти

Виникнення електростатичних ефектів насамперед пов'язано з формуванням кристалів у розчині електролітів. У такій системі на межі

розділу «лід – рідка фаза» можуть виникати електричні поля внаслідок неоднакового захоплення льодом іонів різного знака. При цьому електроліти мають здатність адсорбуватися на поверхні кристала. На поверхні адсорбуються іони протилежного до тіла кристала знака у кількості пропорційному заряду на поверхні льоду.

Таким чином, на межі розділу між кристалічною поверхнею та розчином утворюється подвійний електричний шар. Утворення такого зарядженого шару призводить до появи електричного потенціалу. Величина цього потенціалу визначається концентрацією іонів, які є загальними для кристала і розчину. Вона може досягати 200мВ, що достатньо для того, щоб викликати пробій плазматичної мембрани клітини.

Зникнення меж між рідкою та твердою фазою в процесі кристалізації усуватиме потенціал, знижуючи ймовірність пошкодження клітин. Тому при розгляді даного фактора дуже важливо враховувати швидкість охолодження та відігріву біологічних об'єктів.

12. Сульфгідрильна гіпотеза

Одним з біохімічних механізмів кріопошкодження є окислення сульфгідрильних груп (-SH), результатом чого є формування міцного дисульфідного ковалентного зв'язку (-S-S-) всередині та між молекулами. Дж.Левіт у 1963 році звернув увагу на те, що заморожування речовин, що містять SH-групи, призводить до утворення S-S- зшивок. У результаті було висунуто таку гіпотезу: зниження температури призводить до оборотної денатурації білків, а зближення льодом денатурованих молекул може супроводжуватися їх незворотною агрегацією.

Спочатку йшлося про порушення в цитоплазмі клітин, потім автор переглянув свою концепцію та припустив можливість *утворення S-S-зшивок* у мембранній структурі. Такі зшивки, на думку автора, могли спричинити *порушення мембранної проникності*.

Таким чином, однією з причин кріопошкоджень, на думку Дж. Левіта, є просторове зближення макромолекул. Він був одним із тих, хто сформулював так звану *сульфгідрильну гіпотезу кріопошкоджень*. На користь цієї гіпотези свідчить стійкість рибонуклеази при заморожуванні-відтаванні, нативна конформація якої стабілізована -S-S- містками. Але рибонуклеаза стає кріолабільною після фотоокислення хоча б одного -S-S- зв'язку.

13. Температурний шок

Температурний або холодний шок може бути описаний як пошкодження клітин, яке розвивається після їх швидкого охолодження до температур нижче фізіологічних, але вище температури замерзання розчину.

Основні закономірності температурного шоку сформульовані в 1968 році Ф.І. Осташко:

- пошкодження і загибель клітин мають місце тільки при швидкому зниженні температури, повільне охолодження в тому ж температурному діапазоні для клітин безпечне;
- при заданій швидкості охолодження існує деякий мінімальний температурний діапазон, усередині якого шок не проявляється, але збільшення діапазону призводить до загибелі клітин;
- швидке нагрівання в тому ж діапазоні температур менш небезпечне для клітин, ніж швидке охолодження;
- надшвидке охолодження до шоку не призводить.

В даний час існують кілька механізмів, що описують дане явище. Одним із головних факторів є зміна стану мембранних ліпідів, а саме перехід ліпідів з рідкокристалічного в гелеподібний стан. Іноді це явище називається фазовим переходом ліпідів у мембранах або розшаруванням ліпідів, що веде до утворення трансмембранних ефектів. Денатурація мембранних ліпідів також робить свій внесок. Формування трансмембранних дефектів веде до перерозподілу іонів та інших осмотично активних компонентів усередині та поза клітиною, втрати цілісності мембрани та загибелі клітини. Температура фазових переходів ліпідів багато в чому залежить від складу мембрани кожного виду клітин. Отже, різні клітини різною мірою схильні до холодового шоку. Вони мають різні критичні температурні діапазони, в яких цей фактор кріопошкоджень може себе проявляти.

14. Постгіпертонічний лізис

Постгіпертонічний лізис є наслідком перенесення насичених гіпертонічними розчинами клітин у середовище меншої тоничності. Постгіпертонічний лізис може мати місце як у процесі відтавання заморожених суспензій клітин, так і у процесі їх відмивання від проникаючого кріопротектора. Причиною постгіпертонічного лізису при відігріванні є проникнення в клітини концентрованих заморожуванням позаклітинних солей. Рівень гемолізу еритроцитів після експозиції в умовах помірної гіпертонії ($\sim 1,2 \div 1,5M$) та повернення в ізотонічне середовище зростає зі збільшенням часу знаходження в гіпертонічному середовищі. Частковий захист від постгіпертонічного лізису може забезпечити швидкий вихід із клітини аніонів хлору, що здійснюється в обмін на аніони OH^- , що входять до клітини. Умовою такого виходу є створення спрямованого назовні градієнта аніонів Cl^- на мембрані. Цей швидкий обмін може супроводжуватися повільнішим обміном внутрішньоклітинного K^+ на H^+ (рис. 9).

Аналогічна картина спостерігається при високих концентраціях використання кріопротекторів. Постгіпертонічний лізис при поверненні

насичених кріопротектором клітин в ізотонічне середовище при розморожуванні та відмиванні може призводити до надмірного їх набухання та загибелі (Рис.10).

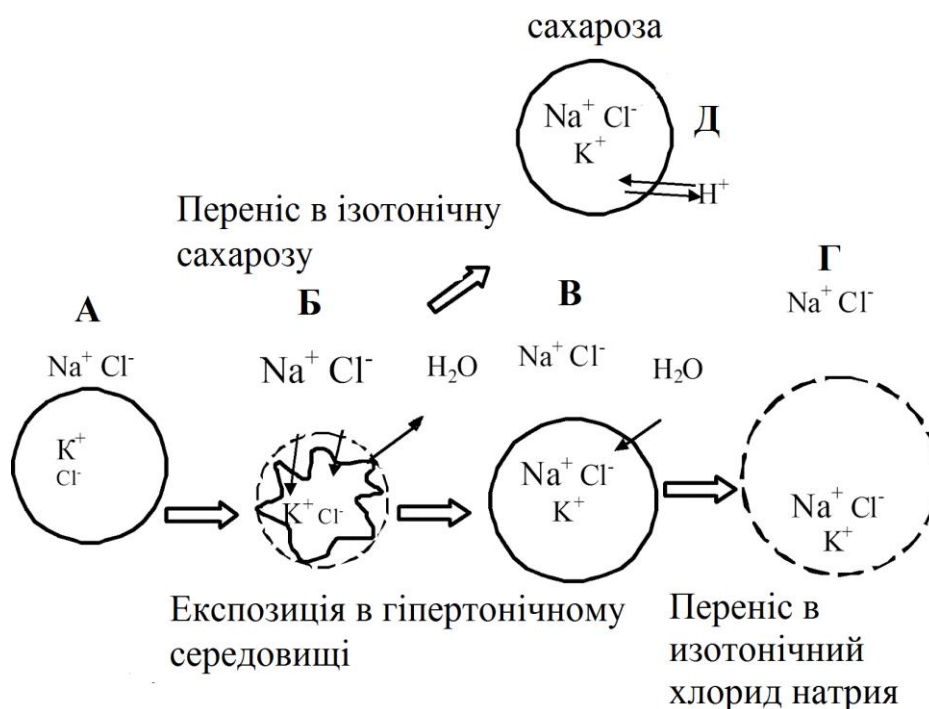


Рис.9. Схема ініціації та розвитку постгіпертонічного лізису клітин у розчинах хлористого натрію та його запобігання у розчині сахарози. А – вихідна клітина в ізотонічному середовищі, Б – дегідратована клітина в гіпертонічному середовищі, В – клітина, перенесена в ізотонічне середовище, Г – руйнування клітини в ізотонічному середовищі в результаті швидкої гідратації, Д – перенесення клітини в сахарозне середовище запобігає руйнуванню. 1 – перенесення клітини з ізотонічного середовища в гіпертонічне, 2 – перенесення клітини з гіпертонічного середовища в ізотонічне, 3 – швидке набухання клітини та руйнування цитоплазматичної мембрани.

Це підтверджує, що одним з головних об'єктів ушкоджень після заморожування-відтавання клітин прийнято вважати клітинну мембрану. Причиною загибелі клітин може стати утворення макроскопічних пір з наступним виходом з клітин великих молекул або надходження в клітину позаклітинних речовин, що порушує осмотичну рівновагу на мембрані і призводить до набухання клітини. Набухання може завершуватися утворенням макроскопічних пір, однак це не єдина причина руйнування клітинної структури. Можливо, що надмірне обводнення (особливо це стосується складніших організованих клітин, ніж еритроцит) становить

небезпеку як явище, що призводить до дезорганізації внутрішньоклітинної структури та більшості клітинних процесів.

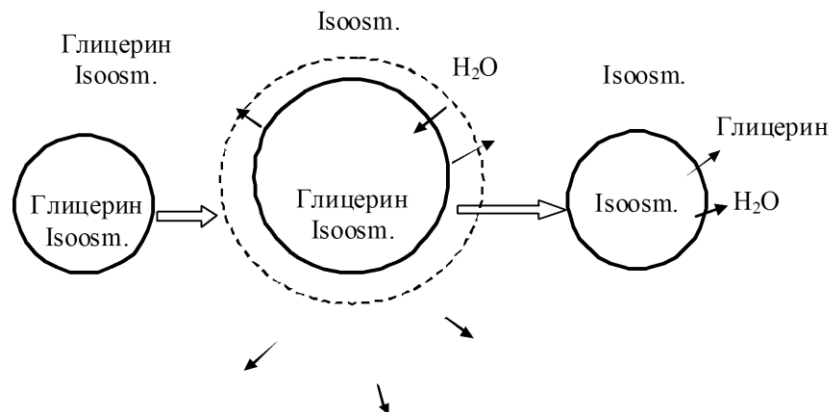


Рис. 10. Схема зміни об'єму клітини при видаленні кріопротектора з клітини. *А – клітина насичена гліцерином у середовищі з кріопротектором, Б – клітина в ізотонічному середовищі без гліцерину. Кріопротектор виходить із клітини, вода надходить у клітину. Клітина набухає і може розірватися, В – осмотично врівноважена з середовищем клітина, через час після переміщення в ізотонічне середовище. 1 – перенесення клітини із середовища з гліцерином в ізотонічне середовище без гліцерину. 2 – після виходу надлишку гліцерину клітина осмотично врівноважується та стабілізується.*

Таким чином, для виключення постгіпертонічного лізису, заморожування необхідно проводити так, щоб тривалість експозиції клітин у розчинах кріопротекторів та тривалість кристалізації в кожній точці були якнайменшими. Якщо ж цього забезпечити не вдається (найчастіше це дійсно неможливо), то після розморожування клітинної суспензії видаляти кріопротектор необхідно в кілька етапів, поступово знижуючи його концентрацію в відмиваючому розчині.

15. Перекисне окиснення

В органічних молекулах (включаючи ті, що входять до складу біологічних структур) електрони на зовнішній електронній оболонці розташовуються парами - одна пара на кожній орбіталі. Вільні радикали відрізняються від звичайних молекул тим, що у них на зовнішній електронній оболонці є неспарений (одиначний) електрон. Це робить радикали хімічно активними, оскільки радикал прагне або повернути собі недостатній електрон, відібравши його у навколишніх молекул, або віддати зайвий електрон. Реакції, у яких беруть участь вільні радикали, називають вільнорадикальними процесами.

Розвиток вільнорадикальних процесів неодноразово було показано після циклу заморожування-відтавання. Одним із проявів вільнорадикальних процесів є розвиток перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), що посилює пошкодження мембран після кріоконсервації (після відігріву).

Особливо активно ці процеси протікають у структурах, що містять каталізатори та ПОЛ-Fe-білки (наприклад, цитохроми, гемоглобін тощо). Так у мітохондріях важливу роль в ініціювання процесів ПОЛ відіграють гемінові (цитохром с) та негемінові залізо-сірчані білки електрон-транспортного ланцюга (наприклад, НАД-Н-Ко-с-редуктаза), а також активні форми кисню (O_2^-). Основними причинами, що ведуть до ініціювання процесів ПОЛ у ліпідному бішарі мембран при охолодженні та заморожуванні-відігріванні, є гіпоксія, ліотропна дія гіперконцентрованих солей та порушення структурної інтеграції мембрани, що призводить до стеричного зближення субстрату (ліпідів) та каталізаторів (Fe-вмісні білки) процесів ПОЛ. В результаті дії цих факторів при заморожуванні-відігріванні в мембранних функціях мікросом або мітохондрій відбувається надмірне накопичення аніон-радикалів O_2^- , які в присутності НАД-Н активують процеси ПОЛ. Продукти, що утворюються при ПОЛ, наприклад гідроперекис, є високогідрофільними сполуками, внаслідок чого вони ефективно гідратують бішар, розпушуючи мембрану. Процеси ПОЛ після заморожування до мінус $25^{\circ}C$ дуже активно розвиваються у внутрішній мембрані мітохондрій, ліпідний біслой якої збагачений поліненасиченими жирними кислотами і містить достатню кількість білків, що містять залізо. При розгалуженні ланцюгів ПОЛ йде розпад фосфоліпідів до проміжних (дієнові кон'югати) та кінцевих продуктів (малоновий діальдегід, епоксиди та ін.). При цьому вміст основних класів ліпідів у мембрані знижується, функція клітин або внутрішньоклітинних органел порушується. Процеси ПОЛ можуть протікати аж до мінус $25^{\circ}C$, тобто коли в крижаних каналцях зберігаються рідкі мікрофази, що містять концентровані розчини солей, які здійснюють хаотропну дію на структуру мембран і функцію віціальної води. Зниження вмісту фосфатидилхоліну і етаноламінофосфатиду у складі мембран мітохондрій веде до їх набухання, а надалі, в умовах дегідратації, що наростає, – до розпаду мембран на фрагменти, оскільки в цих умовах різко послаблюються гідрофобні ліпід-ліпідні та ліпід-білкові взаємодії.

Одним з головних джерел вільних радикалів є електронтранспортний ланцюг мітохондрій. Як правило, при витоку електрона з електронтранспортного ланцюга утворюється супероксид аніон (O_2^{*-}). Імовірність, виток електрона зростає при пошкодженні мембран в результаті охолодження-нагріву. Як представник вільних радикалів, O_2^{*-} може взаємодіяти з ліпідами мембран, особливо з фрагментами

ненасичених жирнокислотних залишків, що входять до складу ліпідів. Це призводить до формування пероксил-радикалів жирнокислотних залишків, окислення частини молекули ліпиду, порушення її структури, функції та цілісності мембрани, посилюючи кріопошкодження.

16. Двофакторна теорія кріопошкоджень

При вивченні залежності безпеки біологічних об'єктів у процесі охолодження було показано, що сохранисть об'єктів максимальна лише за певної швидкості охолодження. Незважаючи на те, що для різних клітин оптимальна швидкість заморожування різна, дослідження впливу швидкості на безпеку показало, що для всіх вона має куполоподібну форму. Так для еритроцитів це ~ 3000 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, для клітин культури китайського хом'ячка – 100 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, для дріжджів – 10 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, для яйцеклітин миші – $0,1$ $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Швидкості охолодження вище або нижче оптимальної безпосередньо були пов'язані з різними типами кріопошкоджень, багато з яких було викладено вище. У зв'язку з цим П. Мейзур була запропонована, так звана *двофакторна гіпотеза кріопошкодження*. Загалом вона може бути описана наступним чином (рис. 11):

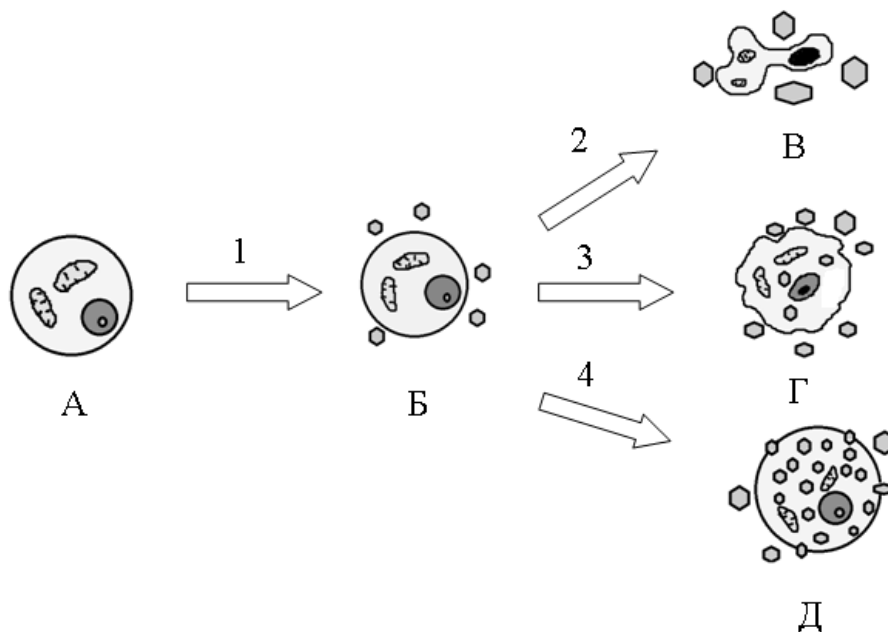


Рис. 11 Схема об'ємних та структурних порушень клітин при різних швидкостях заморожування. Оптимальні швидкості охолодження, що дозволяють уникнути два основних фактори кріопошкоджень. 1,2 – зміна клітини при низьких швидкостях охолодження, вплив «ефектів розчину», формування переважно позаклітинних кристалів; 1,3 – «оптимальна швидкість» – з мінімальним впливом «ефектів розчинів» та незначним внутрішньоклітинним кристалоутворенням; 1,4 – висока швидкість охолодження, з формуванням значних внутрішньоклітинних

кристалів льоду. *А – вихідна клітина перед заморожуванням при температурі 20°C, Б – формування кристалів льоду на початковому етапі заморожування при температурі нижче 0°C, В – клітина після повільних режимів заморожування, Г – клітина після оптимального режиму заморожування, Д – клітина після швидких режимів заморожування.*

При швидкостях нижче оптимальних біологічні об'єкти надто довго знаходяться під впливом високих концентрацій електролітів, високої осмолярності, змінених параметрів середовища, такими як рН, в'язкість, іонна сила та ін., які лежать в основі ефектів розчину, або *першого фактора*. Наприклад, осмотичність середовища може зростати у 20 разів.

При швидкостях охолодження вище оптимальної, підвищується ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації, зважаючи на те, що клітини не встигають втратити достатню кількість води. Це *другий фактор*.

Для зменшення кріопошкоджень явищами першого типу треба збільшити швидкість охолодження суспензії, що заморожується, так як їх пошкоджуючий ефект зростає зі збільшенням часу їх впливу, але з іншого боку швидкість охолодження повинна бути меншою, щоб зменшити пошкодження явищами другого типу.

Литваном було запропоновано альтернативну двофакторну гіпотезу. Вона бере до уваги вплив двох факторів. Перший це надмірна дегідратація клітин при швидкості охолодження нижче оптимальної. Другий фактор - це пошкодження мембран в результаті надмірно високої швидкості охолодження. Формування внутрішньоклітинного льоду у цій теорії розглядається не як фактор ушкодження мембран, а скоріше як наслідок їх ушкодження. Тобто при порушенні цілісності мембрани позаклітинний лід може проростати всередину клітини через трансмембранні дефекти.

17. Мультифакторна теорія кріопошкоджень

У 70-ті роки минулого століття для пояснення кріопошкоджень, Лозіна-Лозинський Л.К. і Прайбор Д. висунули мультифакторну теорію кріопошкоджень. Ця теорія називає кілька причин ушкоджень чи загибелі клітин. Наприклад, ця теорія бере до уваги композицію середовищ використовуваних при кріоконсервації, тип кріопротектора, час контакту біологічного об'єкта з цими середовищами, час експозиції клітин при температурах, які значно нижчі за фізіологічні, а також процес заморожування, процес відігріву і т.д. Вплив цих параметрів на виживання клітин може бути різним у процесі кріоконсервування. Наприклад, перебування еритроцитів при низьких температурах або гіпертонічних розчинах перед заморожуванням, може значно збільшити їх збереження. У цих умовах вони можуть втрачати частину води, стаючи більш стійкими до дії негативних температур.

Також було відзначено, що пошкоджуваність клітин посилювалась при збільшенні часу їх експонування при температурах нижче 0°C, а також внаслідок їх критичного переохолодження. Велике значення при цьому має факт присутності або відсутності в заморожуваному середовищі кріопротекторів, їх концентрація, здатність проникати (або не проникати) через плазматичну мембрану. Звертається увага, що одні й самі види холодних впливів можуть викликати у одних клітинах оборотні пошкодження мембран, а інших – незворотні руйнування. Це великою мірою залежить від сили пошкоджуючих чинників і будови клітинної мембрани. Але пошкодження клітин після переохолодження завжди сильніше, ніж після їхнього прямого заморожування без попереднього переохолодження. Виявлено, що кількість пошкоджених і не здатних до зростання клітин набагато вища після їх попереднього переохолодження. Автори цієї концепції вважають, що фактор часу, який не враховується двофакторною теорією кріопошкоджень, а також сам факт сильного переохолодження клітин є причинами порушення бар'єрних властивостей мембрани для іонів та води, а також інших фізіологічних показників плазматичної мембрани.

Отже, ця теорія враховує дію багатьох факторів у процесі кріоконсервації. Деякі з цих факторів можуть потенціювати або послаблювати ті чи інші фактори кріопошкоджень. Однією з переваг цієї теорії порівняно з двофакторною теорією є облік інших чинників кріопошкоджень: таких як переохолодження, час зберігання зразка за низьких температур тощо.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Температура як термодинамічний параметр. Температура і швидкість біохімічних реакцій. Рівняння Ареніуса. Фізичне обґрунтування доцільності низькотемпературного консервування.
2. Фазові переходи першого та другого роду. Термодинамічні передумови процесу кристалізації.
3. Гомогенне та гетерогенне зародкоутворення.
4. Механізми росту кристалів.
5. Нормальний та дислокаційний механізми росту. Вплив механізму росту та домішок на морфологію кристалів. Нормальний та дислокаційний механізми росту. Вплив механізму росту та домішок на морфологію кристалів.
6. Метод термічного аналізу. Діаграми стану двокомпонентних систем та принципи їх побудови.
7. Основні методи вивчення фазових переходів у водних розчинах і біологічних системах.
8. Класифікація кріопротекторів; класи хімічних сполук, до яких вони належать; поняття кріопротекторної активності.
9. Токсичність і цитотоксичність кріопротекторних сполук.
10. Комбіновані кріоконсерванти. Ефективність застосування кріопротекторів ендо- та екзоцелюлярної дії при різних режимах заморожування біоб'єктів.
11. Двохфакторна теорія кріопошкодження Мейзура. Зв'язок проникності клітинних мембран для молекул води та оптимальних режимів заморожування клітинних суспензій.
12. Процеси масопереносу між клітиною і середовищем на різних етапах кріоконсервування. Проникність клітинних мембран для кріопротекторів, її роль у виборі протоколу кріоконсервування. Методи визначення проникності клітинних мембран.
13. Види пружних деформацій клітинних мембран, ієрархія вільних енергій деформації різних типів. Латеральне розділення мембранних компонентів при обводненні та зневодненні клітин.
14. Температурозалежні зміни у ліпідній фазі. Агрегатний стан і властивості ліпідного бішару. Фазові переходи в ліпідній фазі.
15. Проникаючі кріопротектори і механізм їх дії.
16. Основні вимоги до кріопротекторів.

17. Роль осмотичного фактору в пошкодженні клітин на різних етапах кріоконсервування.
18. Постгіпертонічний лізис. Причини та механізми.

ЛІТЕРАТУРА

ОСНОВНА ЛІТЕРАТУРА

1. Актуальні проблеми кріобіології / Під ред. А.М. Гольцева. – Харків: ІПКіК НАН України, 2012. – 767 с.
2. Основи кріобіології та кріомедицини/ під редакцією Г.Ф. Жегунова та О.А. Нардида.Х.:ФЛП–2019.–616 с.
3. Білоус А.М. Заморожування і кріопротекція / [А.М. Білоус, О.А. Гордієнко., Л.Ф. Розанов]. – М.: Вища. шк., 1987. – 90 с.
4. Білоус А.М. Кріобіологія / А.М. Білоус, В.І. Грищенко. – К.: Наукова думка, 1984. – 431 с.
5. Білоус А.М. Структурні зміни біологічних мембран при охолодженні / [А.М. Білоус, В.А. Бондаренко]. – К.: Наукова думка, 1982. – 255 с.
6. Вплив кріопротекторів на біологічні системи / [Т.М. Юрченко, В.Ф. Козлова, Б.А. Скорняков и др.]. – К.: Наукова думка, 1989. – 240 с.
7. Гордієнко Є.О. Фізика біомембран / [Є.О. Гордієнко, В.В. Товстяк]. – К.: Наукова думка, 2009. – 269 с.
8. Гордієнко О.А., Пушкар М.С. Фізичні основи низькотемпературного кріоконсервування клітинних суспензій. К.: Наукова думка, 1994.
9. Гулевський О.К. Бар'єрні властивості біомембран при низьких температурах / [О.К. Гулевський., В.А. Бондаренко, А.М. Білоус]. – К.: Наукова думка, 1988. – 207 с.
10. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Статистична фізика. Ч.1. М.:Наука; 1976. 584с.
11. Маркін В.С., Козлов М.М. Статистика пор в бішарових ліпідних мембранах. Біол.мембрани. 1985; 2(12): 205-223.
12. Черницький Е.А., Воробей А.В. Структура і функції еритроцитарних мембран.- Мінськ: Наука і техніка,1981.- 216 с.
13. Івенс І., Скейлак Р. Механіка і термодинаміка біологічних мембран: Пер. з англ.-М:Світ,1982.-304 с.
14. Івков В.Г., Берестовський Г.Н. Динамічна структура ліпідного бішару.- М.: Наука, 1981.-296 с.
15. Котик А., Яначек К. Мембранний транспорт.-М.:Світ,1980.-342 с.
16. Кулешова Л.Г., Гордієнко Е.А., Коваленко І.Ф. Проникність плазматичних мембран гепатоцитів щурів для молекул води в неізотонічному середовищі електроліта. Вісник ХНУ №568, Біофізичний вісник, 2002,вип.2(11), с.39-42.
17. Тимофєєва О.В., Кулешова Л.Г. Теоретичне обґрунтування способу оцінки модуля ізотропного розтягнення клітинної мембрани гепатоцитів щура. Вісник ХНУ №637, Біофізичний вісник 2004, .вып.1-2(14), С.85-87.

18. Кулешова Л.Г., Коваленко І.Ф. Визначення транспортних характеристик плазматичних мембран клітин за умов позаклітинної кристалізації. Проблеми кріобіології, 2006, Т.16, №1, С.3-12.
19. Кулешова Л.Г. Механізм позаклітинної нуклеації льоду в кріобіологічних системах. Біофізичний вісник, 2006, вип.1, С.65-70.
20. Кулешова Л.Г., Коваленко І.Ф. Теоретичне прогнозування оптимальних швидкостей охолодження клітинних суспензій, Біофізичний вісник, 2008, вип.20(1), С.56-64.
21. Kuleshova L.G., Gordiyenko E.A., Kovalenko I.F. Permeability of Isolated Rat Hepatocyte Plasma Membranes for Molecules of Dimethyl Sulfoxide, Biophysics, 2014 Vol.59, No 3, pp.387-392.
22. Пономарьова В.Л., Кулешова Л.Г., Висеканцев І.П., Онасенко Е.С., Михайлова О.А. Кінетика фазових перетворень у процесі охолодження-обігріву клітин *Saccharomyces cerevisiae* в альгінатвмісних кріозахисних середовищах, Проблеми кріобіології та кріомедицини, 2018; 28(3):212-223.

Допоміжна література

1. Gordiyenko OI, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, et al. Theoretical estimation of the optimum cooling rate of a cell suspension at linear freezing modes based on a two factor theory of cryodamage. CryoLetters. 2018; 39(6): 380-5.
2. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. Cryobiology. 1966; 2: 181-192.
3. Kedem O., Katchalsky A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. BBA. 1958; 27: 229-46.
4. Gordienko E.A., Gordienko O.I., Gordienko Yu.E. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon. Cryo Letters. 2003; 24(4):.229-44/
5. Gordienko O.I., Linnik T.P., Gordiyenko E.A. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols. Bioelectrochemistry. 2004; 62: 115-8.
6. Gordienko O.I., Gordiyenko Yu.E., Linnik T.P., Gordiyenko E.O. Experimental determination of human erythrocyte membrane permeability coefficients for a series of amides. Cryo Letters. 2005; 26(1): 65-72.
7. Гордієнко О.І. Гордієнко Є.О., Ліннік Т.П., Компанієць А.М. Механізми проникання кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів Механізми проникання кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів. Пробл. кріобиол. 2002; (4): 9-15.
8. Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф. Вплив температури та іонної сили середовища на поверхневий потенціал еритроцитів людини // Проблеми кріобіології та кріомедицини. - 2017. - Т.27, №1. - С. 19-28.
9. Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Марущенко В.В., Сакун О.В. Удосконалена модель пасивного масо переносу крізь плазматичну мембрану клітини. Біофіз. Вісн. 2008; - 21(2): 75-80.

10. О.І. Гордієнко, С.Є. Коваленко, І.Ф. Коваленко Механізми проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини. Проблеми криобиології. 2012;. 22(4): 389-397.
11. ван де Хюлст Г. Рассеяние света малыми частицами: Пер. с англ.-М.: Изд-во ин. лит., 1961.-536 с.
12. Борен К., Хафман Д. Поглощение и рассеяние света малыми частицами: Пер. с англ.-М.: Мир, 1986.- 860 с.
13. Гордієнко О.І. Фізико-математична модель дифузії малих електронейтральних молекул крізь білкові мембранні пори//Фізика живого.-2002.-10, 2.-С.88-94.

Нардід О.А.
Пахомов О.В.
Гордієнко О.І.
Кулєшова Л.Г.
Божкова Ю.О

**ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ФАКТОРИ ТА
МЕХАНІЗМИ КРІОПОШКОДЖЕНЬ БІООБ'ЄКТІВ**

Методичні рекомендації для самостійної роботи

аспірантів 1 курсу

галузь знань 09 Біологія

спеціальність 091 Біологія

Дисципліна «Теоретичні основи кріобіології»