К. С. Пушкарь, А. М. Белоус

ВВЕДЕНИЕ В КРИО-БИОЛОГИЮ



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОГЕННОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

Н. С. Пушкарь, А. М. Белоус

ВВЕДЕНИЕ В КРИО-БИОЛОГИЮ

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА»
КИЕВ — 1975

57.04
П91

УДК 57:616 — 001.19

В книге освещены вопросы физико-химии процессов замораживания растворов, макромолекул и клеток, описана кинетика биохимических изменений в биологических структурах при низкотемпературном воздействии, а также механизм действия различных криопротекторов при низкотемпературном консервировании биологических объектов (кровь, костный мозг, опорные и эмбриональные ткани, половые и злокачественные клетки). Кратко освещена проблема низкотемпературного консервирования органов.

Рассчитана на специалистов медицинского и биологического профиля, занимающихся проблемам криобиологии и криомедицины, а также на студентов вузов биологических и биофизических факультетов.

Ответственный редактор

д-р биол. наук *М. И. Шраго*

Рецензенты

д-р мед. наук *А. Б. Цыпин*, канд. мед. наук *В. С. Зыбин*, канд. биол. наук *Ю. А. Иткин*

Редакция физиологии, биохимии и медицины

П $\frac{50500-054}{M221(04)-75}$ 327-75

© Издательство «Наукова думка», 1975 г.

ВВЕДЕНИЕ

Успехи, достигнутые за последние годы в изучении физики низких температур, в значительной мере способствовали широкому использованию холода в биологии и медицине. Собственно говоря, использование низких и сверхнизких температур для глубокого охлаждения биологических объектов с целью их длительного консервирования привело к возникновению новой области науки — криобиологии.

В настоящее время криобиологические исследования, проводимые в нашей стране и за рубежом, свидетельствуют об актуальности данной проблемы для решения ряда важнейших народнохозяйственных проблем (создание низкотемпературных банков тканей и органов, повышение устойчивости организмов к действию низких температур и т. д.). Большой вклад в развитие криобиологии внесли отечественные и зарубежные ученые [5, 6, 13, 15, 16, 20, 35, 37, 42, 51, 52, 58, 62, 69, 88, 101, 105, 129, 414, 465, 499, 514, 520, 541, 567, 615, 644, 681, 689, 730 и др.].

Важность развития криобиологии подтверждается созданием в наиболее развитых странах мира крупных центров для комплексного изучения этой проблемы. Сейчас уже описаны попытки использования холода для низкотемпературного консервирования органов, в частности почки [414].

Одной из основных проблем криобиологии и криомедицины является изучение механизмов, лежащих в основе естественной и искусственной защиты живых систем от повреждающего действия холода, т. е. изучение возможности осуществления обратимой остановки жизни. На основе решения этой проблемы возможно создание эффективных методов низкотемпературного консервирования различных биологических объектов. Разработка таких методов является весьма актуальной проблемой современной криобиологии и медицины.

Действительно, методы глубокого охлаждения биологического материала приобретают особую важность для создания неограниченных запасов и длительного хранения в жизнеспособном состоянии костного мозга, крови, кожи, роговицы и других тканей, предназначенных для трансплантации. В нашей стране разработка методов низкотемпературного консервирования различных биологи-

ческих объектов, в том числе костного мозга и крови, проводится в Москве в Центральном институте гематологии и переливания крови [14, 40, 102 и др.], Ленинграде [37, 69, 70 и др.], Киеве [32, 53 и др.], в Кирове [89], Ташкенте [70, 103 и др.], Тбилиси [67, 68 и др.], Харькове [13, 64, 85 и др.].

Однако, и это необходимо подчеркнуть, разработка эффективных методов низкотемпературного охлаждения биологических объектов, которые позволяли бы сохранить высокий уровень жизнеспособных клеток, не изменивших свои функционально-структурные черты специфичности, возможна лишь на базе фундаментальных исследований особенностей действия холода на различных уровнях организации живого — от молекулярного до организменного. Именно на основе тщательного изучения физико-химических процессов, протекающих в биомакромолекулах, клетках, тканях и органах, можно разработать наиболее целесообразные методы защиты от повреждающего действия низких температур.

В настоящее время достигнуты определенные успехи в изучении глубоких процессов и явлений, протекающих в различных системах и биологических объектах при низких температурах, данные о которых имеются в таких фундаментальных монографиях, как «Cryobiology» под редакцией Г. Меримена [567], «The frosen Cells» [568], «Очерки по криобиологии» Л. К. Лозина-Лозинского [58], а также в ряде обширных обзоров, публикуемых в криобиологических сборниках и журналах. Эти материалы имеют принципиально важное значение для дальнейшего развития теоретических и практических основ криобиологии в целом и могут служить своеобразным руководством при подготовке соответствующих специалистов. Вместе с тем основная литература по этому вопросу мало известна широкому кругу исследователей, занимающихся проблемами криобиологии, а отдельные неудачи некоторых исследователей при разработке методов низкотемпературного консервирования разнообразного биологического материала свидетельствуют о необходимости углубления и обобщения экспериментально-теоретических работ, интерпретирующих закономерности и особенности физико-химических процессов при замораживании. Анализ фактических данных по изучению физико-химических основ криоповреждений свидетельствует о том, что в период между 1966—1972 гг. были получены новые сведения о механизмах криоповреждений на основе углубленного изучения особенностей физико-химических процессов, протекающих в биологических объектах при их взаимодействии с криопротекторами и низкими температурами. Поэтому в последнее время намечается тенденция к развитию именно фундаментальных исследований, отказ от эмпирических разработок методов замораживания биологического материала, т. е. намечаются пути более глубокого исследования действия низких температур и криопротекторов на молекулярном и электронном уровнях. Очевидно, такой подход к проблемам криобиологии может явиться предпосылкой к новому качественному скачку в теории и практике этого нового раздела естествознания,

который позволит по-новому понять и оценить наш подход к проблеме долгосрочного хранения биологического материала при низких и сверхнизких температурах.

Авторы считали целесообразным восполнить имеющийся в этом отношении пробел путем анализа литературных данных и собственных результатов исследований. При этом были учтены запросы как теоретиков, занимающихся исследованием молекулярно-клеточных взаимодействий криопротекторов и механизма криоповреждений, так и практиков, разрабатывающих различные методы замораживания органов и тканей. Вместе с тем авторы понимали те сложности, которые могут возникнуть при освещении данной проблемы, и поэтому ограничились лишь общими положениями, которые являются фактически введением в суть проблемы. Поэтому авторы будут весьма признательны за все критические замечания в адрес данной монографии и надеются, что данная книга окажется полезной для широкого круга специалистов (медиков, биологов, физиологов, биохимиков, физиков), интересующихся проблемой использования холода в биологии и медицине.

Глава I

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ ВОДЫ

СТРУКТУРНЫЕ МОДЕЛИ ВОДЫ

Первые представления о структуре воды были получены Бернало́м и Фаулером в 1933 г. [153] на основе рентгенографических количественных методов (рис. 1, 2). Согласно их представлениям, в воде могут наблюдаться три основных способа взаимного расположения молекул. При низких температурах преобладает более ажурная структура типа льда — тридимита (вода-I). При обычной температуре наиболее широко распространена тетраэдрическая структура типа кварца (вода-II), переходящая при температурах, близких к критической (400°) [1], к простой симметричной упаковке (вода-III).



Рис. 1. Строение молекулы воды по Берналу и Фаулеру [153].

Два отрицательных заряда расположены в вертикальной плоскости, перпендикулярной плоскости x и y. Общая конфигурация размещения электронов представляет собой тетраэдр, в двух вершинах которого расположены положительные, а в двух — отрицательные заряды. Радиус молекулы воды равен 1,4 Å; P_x — электронная орбита; S — ядро атома водорода.

В жидкости за счет водородных связей и вандерваальсовых сил поддерживается определенный структурированный льдоподобный каркас, содержащий большое количество пустот, в которые мигрируют молекулы разрушенных полей, изменяя тем самым конфигурацию структуры. Льдоподобная модель воды предусматривает также возможность значительных флуктуаций водородных связей, что обусловливает возникновение разнообразных структур, примером которых могут служить различные модификации льда (лед-I), (лед-VII) [90, 91]. Модель, предложенная Полингом [623], предусматривает, что кварцеподобная структура менее стабильна вследствие сильного изгиба водородных связей. Поэтому в дальнейшем была предложена клатратная структура воды типа газовых гидратов, в которых центральная молекула представлялась окруженной каркасом из молекул воды, образующих пятиугольные додекаэдры. Такая система должна обладать наибольшим процентом неразорванных связей и быть наиболее устойчивой. В дальнейшем оказалось, что структуры типа льдоподобного и клатратного кар-

[1] Температура приводится в °С.

касов энергетически близки, хотя льдоподобная конфигурация встречается чаще при обычных температурах. Модели Самойлова [90] и Полинга [623] представляют собой примеры «чистых структур», когда молекулы укладываются в единый каркас с частично заполненными пустотами (рис. 3).

Термодинамические расчеты для модели Полинга на основе энтропии смешения и величины свободной энергии системы, состоящей из квазикристаллического каркаса, показали, что в свободных полостях его могут располагаться мономерные молекулы. Расчеты показали, что мономерные молекулы в пустотах (их мольная доля при 0° составляет около 0,18) слабо связаны с молекулами каркаса, что вызывает «гидрофобизацию» воды за счет уменьшения числа водородных связей (рис. 4, 5).

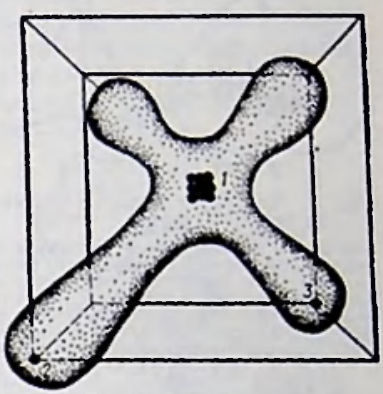


Рис. 2. Пространственное расположение отдельных электронных облаков в молекуле воды:

1 — ядро атома кислорода, состоящее из восьми электронов; *2* и *3* — ядра двух атомов водорода, расположенные в противоположных вершинах основания куба.

Со временем были предложены двухструктурные модели воды, которые предусматривали существование в системе двух отличающихся друг от друга по упаковке структур ближайшего окружения. Исходя из структурной модели текущих кластеров (flickerung clacters), предложенной Франком [297, 298], воду можно представить как идеальную смесь микроучастков с различной надмолекулярной структурой. Образование последней является следствием кооперативных эффектов, в основе которых лежит усиление или ослабление Н-связей для соседних групп молекулы воды.

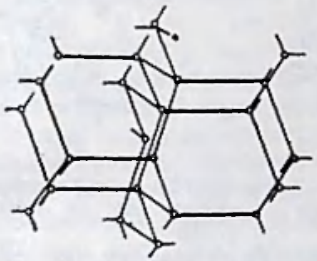


Рис. 3. Структура молекул воды по Самойлову [90—92].

Молекулы воды сохраняют в растворе структуру льда, в котором пустоты заполнены свободными диполями.

Предполагают, что вода представляет собой смесь двух находящихся в равновесии структур — рыхлой структуры типа льда с плотностью $P_1 = 0{,}87$ *г/см*^{3} и более плотно упакованной структуры с $P_2 = 1{,}32$ *г/см*^{3} с частично разорванными водородными связями. Аналогичного мнения придерживаются и другие авторы [435, 593], рассматривающие воду как систему, состоящую из льдоподобного каркаса, в который вплавлены участки с разупорядоченной структурой, разорвана большая часть Н-связей и увеличено координационное число [12, 90, 234, 235 и др.].

Важным этапом в развитии теории строения жидкой воды явились работы Немети и Шераго [592—594], выдвинувших гипотезу о том, что вода состоит из еще более крупных ассоциатов, так называемой полимеризованной воды, плавающих среди не связанных водородными связями молекул (рис. 6). Эти структуры взаимодействовали лишь за счет электростатических и вандерваальсовых сил. Таким ассоциатам приписывалась льдоподобная структура с $P_1 = 0{,}92$ *г/см*^{3} и временем жизни порядка 10^{-10}—10^{-11} *сек*. Важным в этой модели является признание того, что связи молекул в центре и на поверхности кластера неодинаковы, что создает особую пластичность структуры.

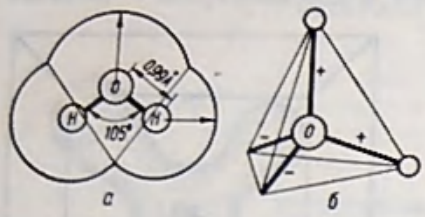


Рис. 4. Структура воды по Полингу [623]:

а — длины и углы связей в молекуле воды; *б* — схематическое изображение расположения атома кислорода, который притягивает четыре неспаренных внешних электрона. Положительные и отрицательные центры заряда разделены и смещены в направлении четырех вершин тетраэдра.

В дальнейшем Джон и соавторы [393] предположили, что в таких кластерах имеется постоянное число молекул воды ($q = 46$), которые обладают льдоподобной структурой (лед-I) с $P_1 = 0{,}92$ *г/см*^{3} и находятся в равновесии с более плотной массой воды, имеющей структуру льда-III с $P_3 = 1{,}02$ *г/см*^{3}. По мере повышения температуры уменьшается число кластеров, однако их размеры не изменяются. Флуктуационная модель Гурикова [26, 27] предусматривает существование пространственного разделения участков каркаса с «гидрофобными» и «гидрофильными» полостными молекулами, имеющими α- и β-структуры. Число гидрофобных молекул, не связанных с каркасом Н-связями, невелико, а β-структурами заполнено более половины пустот, за счет чего и создаются плотноупакованные разупорядоченные структуры. Следовательно, можно считать, что пустоты каркаса загружены меньшим числом не связанных с ними молекул воды. На основе таких двухструктурных моделей воды удается объяснить аномалии вязкости, которые возникают,

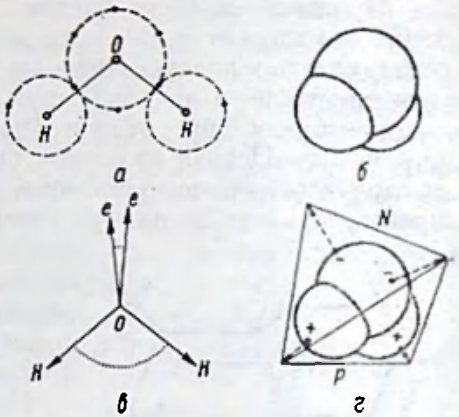


Рис. 5. Схематическое изображение структуры молекулы воды по Люйе [520]:

а — плоскостное расположение атома кислорода и двух атомов водорода в молекуле воды (пунктиром изображены орбиты электронов); *б* — схема трехкамерной структуры молекулы воды; *в* — направления, вдоль которых центр молекулы воды притягивает соседние электронные облака молекул; *г* — пространственное расположение молекулы воды с учетом схемы *б* и *в*.

очевидно, в результате существования в воде полимерных ассоциатов молекул, непрерывно меняющих свою структуру. Привлечение этих моделей позволяет провести более или менее правильную интерпретацию таких явлений, как диэлектрическая релаксация, температурная зависимость теплопроводности, теплоемкость и поверхностное натяжение, энергия активации самодиффузии. Особая роль отводится расположению в пустотах каркаса слабосвязанных молекул воды, обусловливающих ее аномальное поведение. Установлено, например, что время релаксации в жидкой воде определяется именно размерами структурных неоднородностей — квазикристаллических доменов.



Рис. 6. Схема текучих кластеров по Немети и Шерага [592—594].

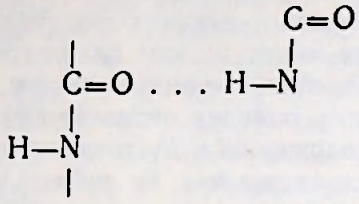
На поверхности кластера расположены молекулы с тремя, двумя и одной водородной связью, внутри — молекулы связи четырехкоординированы.

Развитие новых представлений о природе водородных связей позволило Агено [109] построить модель воды, в которой последняя рассматривалась как смесь различных типов кольцевых агрегатов, находящихся в статическом равновесии. Эта теория, вытекающая из квантово-механических расчетов, принципиально признает существование устойчивых кольцевых полимерных молекул, объединенных коллективной связью.

Структура воды в растворах. По существу, вода может влиять на конформацию макромолекул в том случае, если она оказывает действие на какую-то из ковалентных связей, стабилизирующих конформацию. Такие ковалентные связи принадлежат к одной из трех категорий: 1) водородные связи, 2) ионные связи и 3) неполярные связи. Изучение ряда принципиальных вопросов, связанных с выяснением силы и характера связей воды в биологических объектах, было проведено в бинарных системах вода—белок. Поэтому наши дальнейшие обсуждения будут посвящены главным образом взаимодействию полиамидов в водных растворах и структурам, близким по своему строению к белку. Воду в биологических системах можно разделить на четыре структурных типа [296, 297]: а) растворы, обладающие повышенной способностью к связыванию ионов водорода; б) ионные растворы, способствующие разрушению структуры; в) химически инертные растворы, стабилизирующие структуру воды за счет формирования сверхструктуры; г) полифункциональные растворы, включающие три указанных выше типа взаимодействий.

Растворы, обладающие способностью к связыванию ионов водорода. В последнее время было сделано несколько попыток определения термодинамической стабильности водородных связей в водных растворах. Для этих целей были использованы разнообразные

амидные соединения типа N-метилацетамида и т. п.



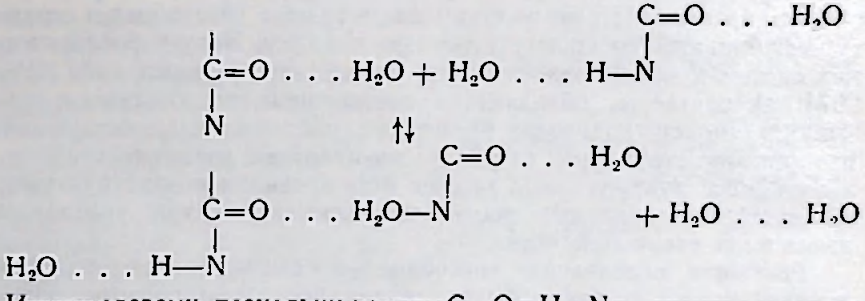
В результате измерений равновесия N-метилацетамида в области ближайшего инфракрасного спектра были рассчитаны константы диссоциации, а также получены соответствующие термодинамические константы [431, 434]. Результаты, полученные в этом отноше-

Таблица 1

Термодинамика формирования C=O...H—N-водородных связей в N-метилацетамиде при 25° [435]

Растворитель	Константа диссоциации	$\Delta F°$, ккал/моль	$\Delta H°$, ккал/моль	$\Delta S°$, гибс/моль
Четыреххлористый углерод	4,7	—0,92	—4,2	—11
N-метилморфолин	1,9	—0,38	—	—
Ацетонитрил	0,75	0,17	—0,7	—3
Диоксан	0,52	0,39	—0,8	—4
Вода	0,005	3,1	0,0	—10

нии для нескольких растворителей, обобщены в табл. 1. Было установлено, что чем выше способность растворителя образовывать водородные связи, тем слабее связь C=O... H—N. В водном растворе теплота образования или разрыва этой связи равна нулю. В этом случае водородная связь N—H...O=C не может обеспечить стабилизацию водных растворов. В известном смысле эти данные могут быть экстраполированы и для воды. Образование связанных водородом димеров N-метилацетамида должно повлечь за собой формирование следующих структур:



Иными словами, поскольку группы C=O и H—N в мономере связаны с водой посредством водорода, необходимо разорвать эти связи до того, как образуется связь C=O...H—N.

Конкурирующее водородное связывание с помощью H_2O ослабляет, таким сбразом, термодинамическую тенденцию к образованию внутриамидных водородных связей. В связи с этим предполагали, что в случае аналогичного взаимодействия в растворе белка вода будет стремиться к разрыву пептидно-водородных связей и таким образом изменять любую упорядоченную макромолекулярную систему, структура которой зависит от этих связей. Подобные выводы можно сделать, очевидно, и относительно поведения ионных групп в растворе.

Ионные растворы. Можно полагать, что введение постороннего иона в раствор должно существенно влиять на структуру воды. Во-первых, определенное значение должно иметь геометрическое соответствие размеров ионов решетки льда, определяющей структуру воды. Действительно, действие на структуру воды малого иона, который вписывается в ажурную структуру молекулы воды, и большого, который в нее не вписывается, должно быть различно. Во-вторых, играют роль величина и знак заряда иона, введенного в раствор, причем, в свою очередь, действие такого иона оказывает сильное влияние на структуру воды. Электростатическое поле иона будет стремиться радиально ориентировать диполи молекул воды возле иона и в то же время, перераспределяя заряды в самих молекулах воды, будет усиливать их Н-связи с соседними молекулами воды, тем самым стабилизируя упорядоченную структуру льда в воде.

Установлено, что энергия гидратации ионных растворов зависит от величины заряда и природы иона. Оказалось, что ион водорода H^+ имеет аномально высокую энергию гидратации по сравнению с другими одновалентными ионами и чрезвычайно высокую подвижность во льду по сравнению с жидкой фазой.

Гидраты ионов в водных растворах представляют собой систему, в которой действуют различные силы притяжения частиц. Эти силы могут быть различного характера, однако наиболее важными для свойств растворов являются короткодействующие. Таким образом, для гидратации ионов в водных растворах большое значение имеет их пространственное расположение по отношению к молекулам воды. Следовательно, в данном случае играет роль возможность ближней гидратации. Например, ионы Li^+, Na^+, H_3O^+, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mo^{2+}, Al^{3+}, OH^-, Fe^{2+} замедляют подвижность воды, т. е. гидратируются положительно. Ионы K^+, NH_4^+, Pb^+, Cs^+, Cl^-, B^-, J^- повышают подвижность воды, т. е. гидратируются отрицательно. Такие ионы с отрицательной гидратацией существенно нарушают структуру воды.

Особый интерес представляют ионы H^+ и OH^-, которые занимают главенствующее место по своему упорядывающему воздействию на воду среди одновалентных ионов. Из них Н-ион стабилизирует дополнительно более десяти Н-связей. Если принять во внимание, что на 1 *моль* воды при комнатной температуре приходится около 1 *моль* Н-связей (т. е. 50% максимального количества), то можно

сказать, что каждый из ионов H^+ структурирует возле себя около десяти молекул воды. В воде H-ион комплексируется с молекулой воды, образуя комплекс H_3O^+ (ион гидроксония). Согласно Эйгену и Майеру [273], ионы H_3O^+ и OH^- координируют возле себя по три молекулы воды, формируя сложную структуру типа $H_3O^+(H_2O)_3$. Существование таких упорядоченных структур подтверждается различными методами.

Необходимо отметить следующее: H^+ и OH^--ионы не локализованы в пространстве, а перемещаются в растворе с большой скоростью. Скорость их перемещения настолько велика, что фактически упорядочивающее действие ионов H^+ и OH^- усредняется по всем молекулам воды, проявляя, таким образом, эффект дальнодействия в упорядочении структуры. Считают, что отрицательная гидратация происходит только в определенном интервале температур. Например, с повышением температуры, когда разрушается водный каркас, действие этих ионов значительно ослабевает. Следует отметить, что различный характер гидратации ионов Na^+ (+ гидратация) и K^+ (— гидратация), возможно, играет определенную роль в биологической специфичности этих катионов.

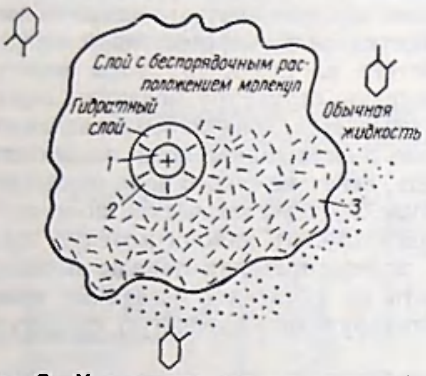


Рис. 7. Модель структурного взаимодействия иона и молекул воды по Франку и Вену [297]:

1 — центральный положительно заряженный ион, вокруг которого расположены 4—6 очень прочно и жестко связанных молекул воды (*2*), составляющих гидратный слой; *3* — наружный слой, содержащий льдоподобную или кластерную структуру воды.

Согласно модели Франка и сотрудников [297], структура воды при взаимодействии ион — H_2O выглядит следующим образом (рис. 7). Вокруг центрального положительно заряженного иона расположено 4—6 прочно связанных молекул H_2O, которые называют гидратными молекулами, или молекулами гидратного монослоя. Считают, что именно этот слой определяет высокое значение величин энергии гидратации. В наружном слое расположена вода типа льдообразной либо кластерной, а между ними находится промежуточный слой, который с одной стороны испытывает влияние иона, с другой — влияние окружающей среды, что влечет за собой разупорядоченное распределение диполей H_2O в этой области.

Растворы неполярных веществ. Общее свойство, *характеризующее* воду как растворитель, состоит в том, что более или менее неполярные молекулы или группы, каждая из которых окружена водой, стремятся соединиться, уменьшая тем самым число контактов системы вода — растворитель. Такая тенденция неполярных групп

очень подходит к определению «гидрофобная связь». Выяснению природы гидрофобного связывания сложных органических систем посвящено ряд работ [152, 152а, 434]. Изучение этого вопроса идет по двум направлениям.

Первое направление состоит в допущении существования взаимодействия растворитель — растворитель, где главным образом превалируют силы связей типа ван-дер-ваальсовых сил, хотя имеет место также и водородное связывание или другой тип взаимодействия ионных групп. Однако, как было показано выше, образование Н-связи в системе растворенное вещество — растворенное вещество в воде можно не учитывать, поскольку взаимодействия ионных групп в таких системах не являются главными из существующих взаимодействий в биополимерах [432].

Согласно второму направлению, гидрофобное связывание ассоциируется с некоторым изменением состояния воды, окружающей неполярные группы. Работы Франка и соавторов [298], посвященные растворимости неполярных газов в воде, явились подтверждением этой точки зрения. С этой целью Франк и Эванс [296] сравнивали частичную молярную энтропию неполярного газа, растворяемого в неполярных растворителях. После растворения газа в воде снижение энтропии было на 10 *кал/моль* К° больше, чем снижение энтропии после растворения газа в неполярных растворителях. Авторы объясняли такое снижение энтропии повышением структурированности воды и ввели для этого понятие «айсберг», т. е. водородная структура сложного строения, которая образуется вокруг растворенного вещества. Подтверждением тому, что при этом формируются сложные структуры, служили опыты, в которых была показана способность газа образовывать стабильные газовые гидраты. В твердых газовых гидратах вода образует клетки известной формы и размеров, в которые плотно входит растворенное вещество, что позволяет более детально исследовать структуру такого комплекса. Известны главным образом два вида структур с двумя типами полостей, возникающих в бинарных системах растворитель — растворенное вещество. Это структуры типа «айсбергов» и более простые — тетраэдрические, образующие связи в белках и близких к ним соединениях. Важным является то, что молекулы воды в таких системах способны сохранять в клетках четырехмерную водородно-связанную структуру. Если малая структура образуется вокруг молекулы неполярного газа в растворе, то этим, очевидно, можно объяснить наблюдавшуюся потерю энтропии. Структурное снижение энтропии было отмечено также в теоретических расчетах при изучении термодинамических свойств водных растворов углеводородов [407, 409] и при выяснении механизма гидрофобного связывания в белках [24, 25]. Следовательно, второй вид структур возникает в системах вода — органическое вещество за счет образования гидрофобного связывания. При этом если два растворенных вещества попадают в одну и ту же молекулу воды, то вокруг них уменьшается число структурно-ограниченных молекул воды. Результатом этого может быть

положительный вклад ΔS и, следовательно, отрицательный ΔF для связи двух неполярных веществ, который может в значительной мере влиять на гидрофобное связывание.

Полифункциональные растворы. Структура воды в указанных выше растворах представляет исключительный интерес, поскольку к этим растворам относятся биомакромолекулы (белки, нуклеиновые кислоты и др.), обусловливающие функциональную и метаболическую интеграцию живых систем. Полифункциональность подобных растворов возникает за счет наличия в макромолекулах группировок, способных как к гидрофобному, так и гидрофильному взаимодействию, а их заряженные группы гидратируются по механизму гидратации обычных ионов. Остается неясным, каким образом происходит гидратация неполярных поверхностей макромолекул. Согласно Клотцу [431, 432, 433], образование кристаллогидратов обусловлено в основном взаимодействием боковых цепей молекул белков с водой. Боковые молекулы, несущие группу CH_3 аланина, валина, лейцина, цистеина, метионина и других аминокислот, способствуют образованию стабильной кристаллической структуры воды, так называемых гидротактоидов. За счет кооперативного взаимодействия боковых аминокислот цепей вранница упорядоченного слоя, по мнению Клотца, должна распространяться на некоторое расстояние от поверхности белковой молекулы. Исходя из этого считают, что стабилизирующее действие белков обусловлено влиянием неполярных гидратов на структуру молекулы воды, а эффект тепловой денатурации белков — плавлением гидротактоидов. При этом происходит разрыв водородных связей в гидратном слое и конформационные изменения белков.

Из экспериментальных данных [80] следует, что биомакромолекулы способны в значительной мере связывать воду, однако далеко не в такой степени, как это представлял себе Клотц [234, 235], и согласно которому возле макромолекул образуются структуры воды типа кристаллогидратов. Приближенный расчет средней толщины гидратного слоя возле макромолекулы свидетельствует о том, что этот слой — порядка молекулярного, величина же гидратации данного типа молекул определяется в основном их поверхностью: чем больше относительная поверхность (т. е. отношение поверхности к объему), тем больше и гидратация. Экспериментально было подтверждено, что значения гидратации глобулярных белков весьма близки к тем величинам, которые теоретически рассчитал Фишер [290]. При этом было высказано предположение, что на поверхности глобулярных белков находятся все их полярные группы, а неполярные группы спрятаны внутрь глобулы. Исходя из известного аминокислотного состава, Фишер получил следующие величины гидратации: для сывороточного альбумина — 0,29 *г* H_2O на 1 *г* вещества, для яичного альбумина — 0,26 *г* и для гемоглобина — 0,25 *г* H_2O на 1 *г* вещества. Экспериментальные данные составляли соответственно 0,3, 0,25 и 0,3 *г* H_2O на 1 *г* вещества.

Совпадение расчетных и экспериментальных данных свидетельствует о том, что связывание или упорядочение воды нативными глобулярными белками осуществляется в основном полярными группами. Если же неполярные группы и упорядочивают структуру воды вокруг нативных макромолекул, то очень незначительно, большая же часть неполярных групп обычно скрыта внутри глобул. Хотя вопрос о количестве гидратной, прочно связанной воды, удерживаемой на поверхности макромолекул в полифункциональных растворах, до конца не ясен, в настоящее время можно считать, что взаимосвязи молекул воды и функциональных групп биомакромолекул играют большую роль в создании третичной и четвертичной ее структуры.

ВОДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Базой для изучения воды в биологических системах являются физические модели воды. Существует несколько таких теорий. Некоторые авторы [592—594] считают возможным существование кластерного типа воды в живых тканях и допускают, что проникновение воды через биологические мембраны происходит по механизму разрушения кластера по одну сторону мембраны и формирование его на другой стороне на базе кооперативного эффекта образования водородных связей под влиянием разности давлений по разные стороны мембраны. Идея текучих кластеров оказывается более реальной, поскольку допущение существования таких ассоциатов позволяет объяснить более высокую лабильность воды, чем при существовании других моделей с более жесткой конструкцией кристаллического каркаса. Согласно гипотезе Линга [476], большое значение для определения количества связей и структуры воды играет специфичность белков и последовательность расположения в них аминокислот. Ассоциативно-индукционная теория Линга взаимодействия воды с биомакромолекулами базируется на том, что живая протоплазма и протоплазменная вода находятся не в каком-то одном застывшем состоянии, а при нормальной физиологической активности сразу в нескольких метастабильных кооперативных состояниях. Воду в живых системах Линг рассматривает как отличающуюся по структуре и свойствам от воды растворов за счет ограничения степени вращения многоатомных неэлектролитов и полиатомных ионов в протоплазме. Каваноу [405, 406], наоборот, считает, что в тканях структурно изменена только вода на поверхности биополимеров в размере одного монослоя. За ним располагается слой уже с нарушенной структурой и меньшим числом связей, чем в остальной воде межклеточного пространства. Существует точка зрения, что величина гидратации в живых системах носит характер видоспецифичный, зависящий от разной поверхности соприкосновения ткани с водой, причем этот процесс, как правило, сопровождается образованием гидратного монослоя [2].

Структурированность воды играет большую роль в осуществлении миграции электронов и протонов или атома водорода в биологических системах, т. е. в этом отношении вода играет роль линии связи, обусловливающей протекание цепных реакций, а система вода — макромолекула представляет собой систему обратной связи, которая может изменять свой знак и регулироваться присутствием ионов [432]. Различают возможности следующих структурных модификаций воды в живой клетке [12, 90, 363]: а) вода как структурный компонент мембран; б) вода, взаимодействующая с поверхностью мембран; в) вода, расположенная в пространстве между внутренней и наружной мембранами митохондрий; г) вода в матриксе органелл; д) вода в гиалоплазме.

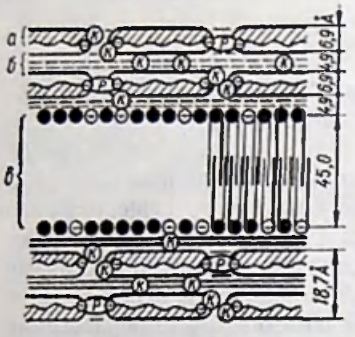


Рис. 8. Схема биологической мембраны по Хехтеру [363]:

а — белок; б — промежуток между молекулами белка, заполненный водой; в — липидные слои.

Структура воды в мембранах. Как известно, основой структурных, обменных и транспортных функций в тканях в настоящее время считается мембрана, с которой ассоциированы основные органеллы клетки — ядро, митохондрии, рибосомы и др. В мембранах содержится 30—50% воды, однако о ее структуре известно очень мало. Предполагают, что в мембране она организована по типу кристаллогидратов или льда и интегрирует в ней различные ее функции. Обратное превращение структуры воды в мембране сопровождается конформационными изменениями белка и расположением полярных липидов. В значительной степени вода может влиять на избирательную проницаемость мембраны, изменяя процессы транспорта веществ в клетку. Бесструктурная вода, лежащая между гидратным слоем, прилегающим к мембране, и собственно жидкой водой, регулирует протонную проводимость мембраны. Считают, что она изменяет проницаемость мембраны благодаря изменению размера гидрофильных пор.

По данным Хехтер [363], белковые слои мембраны разделены водными каналами в виде жесткоструктурированного бислоя воды (рис. 8) и имеют фиксированное заряженное положение. Очевидно, такая упорядоченность водных слоев в мембране может иметь некоторое отношение к селективной проницаемости для ионов Na^+ и K^+. Структурообразующая роль воды в формировании мембранных единиц в настоящее время не вызывает сомнений, хотя признается, что основой функционирования живых систем, в том числе и мембран, следует считать водно-белково-липидный комплекс.

Учитывая структурную и функциональную многогранность компонентов мембран, следует ожидать многообразия структурных

модификации воды, связанной с биополимерами. Поэтому в мембранах вода вряд ли идентична воде текучих участков клетки.

Структура воды клеток. Ряд исследований, выполненных с помощью ЯМР, ИКС, по энергии самодиффузии и энергии активации самодиффузии свидетельствуют о том, что вся вода клетки по своей структуре мало отличается от структуры обычной воды. Однако было показано, что для различных веществ 10—20% внутриклеточной воды не является растворителем. Считают, что такая вода находится в узких каналах плазматических мембран. Поэтому в настоящее время придают большую роль эффекту капиллярности в клетке, где межкапиллярные и межмембранные расстояния могут рассматриваться как капилляры. На основании эффекта капиллярности выделена особая структура воды, так называемая толстая вода [31]. Поэтому помимо тетраэдрических диполей в клетке вследствие наличия капиллярности, очевидно, существуют и другие формы воды, структура которой до последнего времени не выяснена.

Структурное состояние воды в клетке во многом зависит от ее функционального и метаболического состояния. Например, методом ЯМР показано, что вода в покоящихся тканях семян находится в связанном структурированном состоянии. Набухание семян, сопровождающееся активацией метаболизма, ведет к появлению величин релаксации спин-спинового сигнала, что соответствует структурированной воде. Анализируя данные многих авторов, изучавших структуру воды в биологических системах, можно прийти к заключению, что все расшифрованные модификации воды (гексагональный лед-I, кубический лед-I, клатраты, кластеры и т. д.) могут одновременно существовать при различной температуре, давлении и прочих условиях. Например, при измерении плотности, теплопроводности, теплоемкости, вязкости, самодиффузии, протонной магнитной релаксации воды при температурах +15, 30, 45, 60° можно наблюдать характерные фазовые скачки, которые зависят скорее всего от изменения структуры воды при перепадах температуры. Если исследовать различные биологические явления при этих температурах, то можно обнаружить ряд необычных максимумов и появление новых свойств. Так, Дрост-Хансен [259] отмечает, что вязкость протоплазмы изменяется при температуре +15—30°. Можно ли это объяснить изменением структуры воды в клетке, остается неясным. Скорее следует ожидать первичным переориентировку метаболизма клеток, связанных с биоритмами, что может повлиять на изменение структуры внутри- и внеклеточной воды. Ярким примером этого может служить увеличение концентрации сахарозы в растительных тканях при адаптации их к холоду. Сейчас хорошо известно, что сахароза стабилизирует структуру воды, препятствуя быстрому образованию льда в клетке.

Биологическая роль структурно-связанной воды. В настоящее время накопились факты, свидетельствующие об особом состоянии в живых системах воды, которая находится в микрокапиллярах и соприкасается непосредственно с биомакромолекулами (белки,

ДНК) и мембранами. Обычно такое состояние воды характеризуют как квазикристаллическое (вода в виде льда) — состояние, подобное замерзшей воде. Выяснилось, что эта вода, представляющая собой индифферентную структуру, может существовать в организме при температурах, значительно превышающих температуру таяния обычного льда. Согласно Сент-Дьерди, жидкая вода, имеющая вид льда, играет важную роль в функционировании живых систем, являясь своеобразной «матрицей жизни».

При изменении частотного хода диэлектрической постоянной смеси воды со льдом можно установить не только количественное содержание этих компонентов, но и взаимное их упорядочивающее действие на поверхности молекул в системе вода — лед. При исследовании, например, растворов макромолекул ДНК установлено, что находящаяся вблизи их поверхности вода очень быстро «замерзает». Оказалось, что доля такой «замерзшей» воды около ДНК не имеет четкой границы и постепенно уменьшается при удалении от макромолекул. Такое упорядочивающее влияние биомакромолекулы на воду прежде всего объясняется тем, что ее спираль идеально вписывается в решетку льда. Доказательством того, что такая вода имеет льдообразную структуру, служат данные ИКС, которые дают две полосы поглощения, характерные для льда,— 2230 ± 10 и 3140 ± 3260 $см^{-1}$. Анализируя кинетику кривых гемолиза эритроцитов, Тричер (97) установил, что энтропия активации этого процесса равна 17 $кал/моль^{-1}$. Такое отрицательное значение энтропии свидетельствует о том, что изменение воды эритроцита при его набухании аналогично ее замерзанию, т. е. происходит по сути при участии квазикристаллической воды. Показано, что в живых системах различные биомакромолекулы как бы встроены в кристаллическую решетку воды, имеющую структуру льда. Конфигурация пустот ледяной решетки, очевидно, такова, что нативная система макромолекул может быть вмонтирована в пустоты этой решетки без всякого повреждения этой системы и с сохранением ее структурно-химической целостности.

Действительно, некоторые экспериментальные данные свидетельствуют о том, что низкотемпературное замораживание клеток тканей и даже органов в некоторых случаях позволяет регенерировать функцию биологического объекта после оттаивания. Эти данные были получены на замороженном сердце летучей мыши, при оживлении углозуба-тритона, находившегося в зоне вечной мерзлоты на значительной глубине, на коловратках и нематодах, некоторых паукообразных, на спорах и семенах растений, гусеницах кукурузного мотылька [5, 6, 57, 58, 144, 514, 660]. Некоторые из перечисленных животных и растений замораживали сразу до сверхнизких температур (—253—269°), другие предварительно подвергали ступенчатому закаливанию [715]. Как известно, при сверхбыстром охлаждении повреждение тканей в момент замораживания не наступает, поскольку замерзающая вода переходит сразу не в кристаллическое, а в аморфное (стекловидное) состояние. При отогреве же

она проходит через критическую точку, в которой стекловидный лед начинает кристаллизоваться, что и приводит к повреждению ткани за счет рекристаллизации. Последние данные по рентгеноструктурному анализу таких замороженных систем свидетельствуют о том, что даже при сверхбыстром замораживании (1200° в секунду) лед имеет не стекловидное, а кристаллическое строение, хотя кристаллы в данном случае имеют очень небольшие размеры и носят характер быстроисчезающих сферулитов. После отогрева такие кристаллы образуют конгломераты крупнокристаллического льда с выделением пузырьков газа. Очевидно, с этими двумя моментами и связано повреждение при отогреве после сверхбыстрого охлаждения.

Эти примеры показывают, что включенные в кристаллическую решетку нативные биомакромолекулы (нуклеопротеиды, сложные белки) не повреждаются благодаря их коллоидному состоянию, которое допускает значительные пространственные транслокации и деформации в ледяной структуре. Происходят ли в таких биомакромолекулах необратимые изменения или они способны подвергаться самосборке и регенерировать свою функцию — известно не так много.

Доказано, что одним из свойств полипептидов является их способность к денатурации при температурном воздействии. Это состояние характеризуется изменением конфигурации цепей, групп и радикалов белка при разрыве слабых связей, которые удерживают их в нативном состоянии. По данным рентгенографии и метода ЭПР, чаще всего разрушается присущая нативному белку система пептидно-водородных связей и структура α-спиралей с последующим возникновением групп β-слоев. Иногда денатурация сопровождается не столько плавлением отдельных спиральных участков и разрывом водородных связей, сколько перегруппировкой отдельных элементов макромолекулы без ее разворачивания.

Как известно, водородные связи, стабилизирующие конформацию молекулы полипептида, довольно слабые, поэтому в обычных условиях денатурация возможна даже при комнатной температуре. Энергетика денатурации может быть исследована на основании второго закона термодинамики

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S, \qquad (1)$$

где $\Delta H = H_д - H_н$ — теплота реакции (разность в теплосодержании системы после реакции и до реакции); $H_д$ — количество теплоты для денатурированного, $H_н$ — для нативного белка, аналогично $\Delta F = F_д - F_н$ и $\Delta S = S_д - S_н$, где ΔF — свободная энергия; ΔS — энергия реакции денатурации. Хотя процесс денатурации протекает по типу эндотермической реакции, но является по сути процессом экзэргоническим ($\Delta H > 0$, $\Delta F < 0$), что связано с возрастанием при денатурации энтропии ΔS.

Денатурация белков может происходить в результате воздействия самых разнообразных причин. Например, небольшое нагревание способствует денатурации многих белков, что вызывает

прекращение функционирования живой системы. Вместе с тем глубокое охлаждение, вплоть до полного замерзания, часто не приводит к денатурации и значительно меньше нарушает конфигурацию системы биомакромолекул. Это происходит благодаря идеальному соответствию структур макромолекул и кристаллической решетки льда, в результате чего эти лабильные цепи остаются как бы зафиксированными без существенных повреждений, структура же нагретой воды, наоборот, очевидно, не адекватна структуре биомакромолекул, что и приводит к их дестабилизации и денатурации.

Действительно, белковые вещества либо целые организмы лучше переносят высокие температуры тогда, когда у них очень невелико содержание воды. Следовательно, биомакромолекулы можно рассматривать как своеобразные геометрические поверхности, которые упорядочивают структуру воды по типу льда, причем степень упорядоченности тем больше, чем больше подходит конформация макромолекулы к ледяной решетке. В то же время вода способствует упорядочиванию структуры белков и биоколлоидов. Сложный динамический процесс гидратации и дегидратации биоколлоидов смещается в сторону гидратации в том случае, если структура воды ближе подходит к структуре самих биоколлоидов. При идеальном соответствии структур (ледяная вода — макромолекула) сближение будет наиболее тесным. В этой структуре вода глубже войдет в систему нативных макромолекул и прочнее будет удерживаться ими. Макромолекулы биоколлоидов в свою очередь получат идеальные возможности для укладки в «ледяной» решетке. В таком случае произойдет максимальная гидратация системы, в которой вода будет прочно фиксирована. Следовательно, гидратация является важным фактором стабилизации коллоидов. Связь между водой и биомолекулами из-за несоответствия структур станет слабой, а удержание воды биоколлоидами менее прочным, в результате чего может возникнуть состояние дегидратации.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, чистая вода при 0° уже имеет структуру, близкую к льдоподобной, хотя отличается от льда меньшей прочностью водородных связей и размытостью дальней структуры. Льдоподобная структура воды в системах биомолекул несколько отличается от структуры свободного льда, хотя она и весьма близка к нему. Такая льдоподобная структура характеризуется прежде всего тем, что молекулы ее решетки скреплены в основном водородными связями с комплексом биомакромолекул, которые по сравнению с молекулой воды имеют огромные размеры. Такое соединение двух молекул действует аналогично понижению температуры воды, благодаря чему слой прилегающей к поверхности биомолекулы воды приобретает структуру льда, т. е. в данном случае можно сказать, что растворенное вещество повышает структурную температуру воды [1]. При количественной оценке ха-

[1] Под структурной температурой понимают процесс, когда вода, в которой растворено какое-то вещество, имеет при данной температуре такую же структуру, какую имеет чистая вода при более высокой температуре.

рактера структурной температуры по положению и величине главных рентгеновских дифракционных максимумов было установлено, что в тех зонах организма, где имеются льдоподобные комплексы воды, структурная температура значительно ниже, чем в других зонах. Более того, в зонах с содержанием льдоподобных структур время фиксированного положения молекул по всей системе должно возрасти, а упорядоченность структуры — увеличиться. Однако в живых системах иногда там, где даже имеются условия для перехода воды в льдоподобное состояние, она может не перейти в такое состояние и остаться в метастабильном состоянии, подобно состоянию обычной переохлажденной воды [1], но только не при отрицательной температуре, а при температуре живого организма.

Такое метастабильное состояние воды в организме, имеющее тенденцию перехода в стабильное льдоподобное, называется квазипереохлажденным состоянием. Для окончательного перехода такой квазипереохлажденной воды в лед необходимо, чтобы ее температура достигла такого критического уровня, при котором произойдет процесс спонтанного образования центров кристаллизации. Без формирования подобных зон жидкость не замерзнет. Например, свежепрокипяченная вода не замерзнет до —7°, поскольку кипячением в ней были разрушены все центры, а при —7° они спонтанно не возникают и лишь при —11° возможно их формирование. Следовательно, для замораживания воды (либо квазипереохлажденной воды) необходимо некое критическое охлаждение достаточной интенсивности. В то же время этот процесс можно катализировать путем введения в воду центров кристаллизации извне (льдинки, различные катионы со свойствами положительной гидратации). Если они попадают в квазипереохлажденные зоны, то происходит образование зародышей льдоподобных структур — возникает цепная реакция перестройки системы вода — биоколлоиды по типу ледяной структуры. Следует отметить, что в живых системах, и в частности в клетке, квазипереохлажденная вода может быть стабилизирована системой разнообразных капилляров и межмицеллярных поверхностей, по которым она в таком состоянии может перемещаться на некоторое расстояние и там стабилизироваться.

Находясь рядом с квазипереохлажденной водой, льдоподобная структура не может служить ледяной затравкой вследствие размытости своих границ. Поэтому в субмикроскопических пространствах клеток и межклеточных пространствах могут одновременно существовать квазипереохлажденные и льдоподобные системы. Возможность транспорта таких переохлажденных систем в составе живых организмов является весьма важным моментом, поскольку

[1] Переохлажденной водой называют состояние, при котором кристаллизация происходит при довольно низких отрицательных температурах (— 7, — 40°, иногда — 70°). Это связано с тем, что водородные связи в такой «особой» воде довольно стабильны и молекулы даже при таких низких температурах удерживаются в пустотах кристаллической решетки.

с помощью этого механизма осуществляется направленная миграция энергии на значительное расстояние. Более того, считают, что ритмические структурные переходы в системе льдоподобная структура — вода способствуют процессам растворения веществ в клетке и освобождению ее от метаболитов при «замерзании». В настоящее время эта сторона проблемы, т. е. зависимость структуры воды от ее метаболического состояния либо физиологического состояния клеток, довольно интенсивно разрабатывается.

Как видно, структура и функция воды в биологических системах находит новое толкование в связи с внедрением новых физико-химических методов исследования моделей (ЯМР, НКС, рентгеноструктурный анализ и т. д.), хотя в этом смысле она остается наиболее изученным соединением. Структурные особенности воды позволяют регулировать такие важнейшие процессы, как транспорт электронов и протонов, оказывая существенное влияние на метаболические процессы и транспорт веществ. Стабилизация пространственной структуры белка и других биополимеров также осуществляется в значительной мере за счет взаимодействия системы биополимер — вода. Кроме того, сама по себе вода является обязательным компонентом большинства (если не всех) биохимических циклов превращения веществ в живых системах.

ЛЕД — КРИСТАЛЛИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ВОДЫ

При анализе проблемы фазовых переходов в системе кристаллической решетки воды в зависимости от температуры возникает целый ряд вопросов, которые подлежат выяснению, чтобы более четко представить кинетику этих процессов. Один из первых вопросов, подлежащих обсуждению, является вопрос о том, изменяется ли электронная конфигурация молекул в структуре воды в зависимости от температуры.

Молекулярные модели структуры жидкости, расшифрованные к настоящему времени, имеют, как правило, в своей основе представление о процессах плавления кристаллической фазы веществ. Считают, что различие между жидким состоянием и твердым, не только аморфным, но и кристаллическим, является не качественным, а скорее количественным. При этом допускается, что плавление кристаллической фазы является процессом исчезновения дальнего порядка кристаллической решетки из-за тепловых колебаний частиц и образования некоторого жидко-кристаллического состояния. При этом предполагают, что состояние системы электронных оболочек частицы фазы при фазовом переходе не изменяется.

Известно, что полиморфизм структуры воды обусловлен спецификой электронных конфигураций атомов и особенностей коллективного взаимодействия, распространяющегося на весь объем кристаллической фазы. Перестройка электронных конфигураций при фазовых переходах осуществляется посредством релаксационного процесса спин-решетчатого взаимодействия, время действия которо-

го много больше времени внутримолекулярных колебаний. Скорость протекания этого процесса зависит как от взаимной ориентации электронных облаков взаимодействующих частиц, так и температуры. Можно представить, что в жидкости существует распределение структур, свойственных различным кристаллическим модификациям, причем в определенных температурных диапазонах доминирует та или иная структура. Смена таких доминирующих структур при определенных температурах приводит к возникновению большого количества возбужденных частиц. Действительно, вода в сверхкритическом состоянии характеризуется весьма высокой химической активностью. В ней при 500° и давлении 1000 *атм* начинают в значительном количестве растворяться такие нерастворимые при обычных условиях соединения, как Al_2O_3, SnO, Fe_2O_3 и др. Эта активность объясняется не особыми свойствами молекулярных агрегатов, предположительно существующих в сверхкритическом состоянии, а возбужденностью всей массы сверхкритической жидкости, которая содержит произвольные возбужденные электронные конфигурации.

Аналогичные явления наблюдаются и при переохлаждении достаточно чистых жидкостей, в которых при охлаждении осуществляется взаимная ориентация блоков упорядоченной структуры, разделенных слоем неупорядоченных возбужденных атомов или молекул. Однако подобная ориентация возможна лишь при условии обмена энергией упорядоченной и неупорядоченной структур, который достаточно затруднителен. Введение примесей в переохлажденную жидкость приводит к распаду упорядоченных блоков и снимает барьер активности упорядоченной структуры. Быстрое охлаждение жидкости приводит к образованию мелкодисперсной среды с разориентированными блоками кристаллической структуры. Из-за низкой температуры подвижность этих блоков низка и поэтому возбужденные поверхностные состояния на границах этих блоков существуют длительное время, о чем свидетельствует, например, длительная люминесценция быстро охлажденной воды, существующая в широком диапазоне температур [80]. Кристаллы льда, образующиеся в результате кристаллизации молекул воды на молекулярном уровне, представляют собой картину сосуществования чрезвычайно быстро движущихся молекул и перемежающихся дефектов решетчатой структуры.

Чтобы представить себе пространственное расположение отдельных частей молекулы воды, можно воспользоваться моделью, изображенной на рис. 9. Как видно, молекула воды, вписанная в изображаемый куб, содержит в центре ядро атома кислорода, а ядра двух атомов водорода находятся в противоположных вершинах основания куба. Таким образом, расположение атомов водорода и атома кислорода вполне вписывается в указанный куб. Из восьми электронов атома кислорода два находятся вблизи ядра атома кислорода, а другая пара электронов спаривается с двумя электронами водородных атомов, связывая их с атомами кислорода.

Следовательно, остается четыре неподеленных электрона, образующих два электронных облака, направленных к другим вершинам куба, причем последние заряжены отрицательно. Когда молекулы воды не изолированы и находятся в относительно небольшом объеме на близком расстоянии друг от друга, эти отрицательно заряженные облака способствуют притяжению молекул между собой. Каждое отрицательно заряженное облако притягивает ядро водорода соседней молекулы воды, что способствует соединению молекул по-

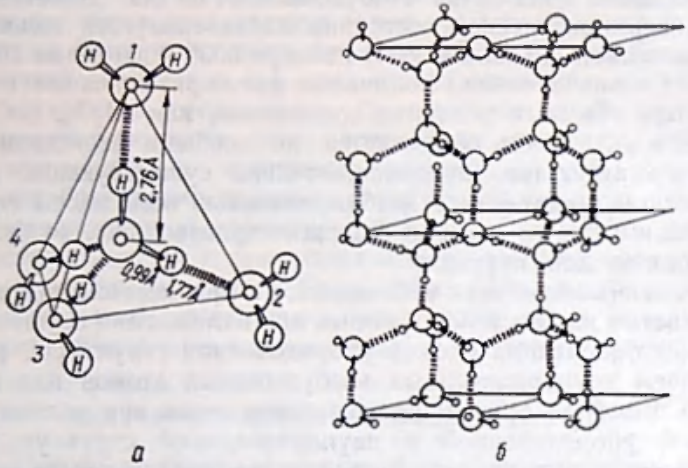


Рис. 9. Плоскостное изображение структуры льда по Полингу [623]:

а — тетраэдрическая упаковка молекул воды в кристаллической решетке льда. Молекулы *1* и *2*, как и центральная молекула О—Н—О, изображены в плоскости чертежа. Молекула *3* лежит над этой плоскостью, а молекула *4* — под ней, так что атомы кислорода *1*, *2*, *3* и *4* находятся в вершинах правильного тетраэдра; *б* — расположение молекул воды в кристалле льда. В кристалле льда молекулы воды расположены в виде рыхлой решетки из смежных тетраэдров и поэтому возникает структура с менее плотной упаковкой по сравнению с молекулами воды в жидком состоянии.

средством водородных связей. Благодаря такому механизму образуются группы молекул (кластеры).

В жидкости обычное тепловое движение молекул оказывается достаточным, чтобы нарушить связи молекул, при этом кластеры непрерывно дробятся и преобразуются. Однако при охлаждении воды до точки замерзания тепловое движение становится настолько слабым, что разрыва групп молекул не происходит, в результате чего образуются довольно стабильные кластеры — кристаллы льда. При этом происходит переориентировка в расположении молекул воды. Методом дифракции рентгеновских лучей обнаружено, что в кристалле льда молекулы воды образуют гексагональную структуру (рис. 10 и 11). Такая упаковка молекул воды ведет к тому, что между ними образуются значительные пустоты, т. е. кристалл льда имеет довольно рыхлую структуру. Таким образом, в противоположность почти всем другим веществам вода оказывается

менее плотной в твердой фазе, чем в жидкой. При плавлении кристалла льда разрушение его рыхлой структуры приводит к более плотной структуре в результате заполнения образованных при низких температурах пустот.

Используя рентгеновский метод, Бернал и Фаулер [153] выдвинули предположение, что ориентация молекул в кристалле льда такова, что каждая молекула воды образует прочные водородные связи со своими четырьмя ближайшими соседями, т. е. в каждом случае два водородных ядра молекулы (протоны) направлены не посредственно к отрицательно заряженным электронным облакам двух своих соседей, а два собственных отрицательно заряженных облака направлены прямо к протонам двух других соседних моле-

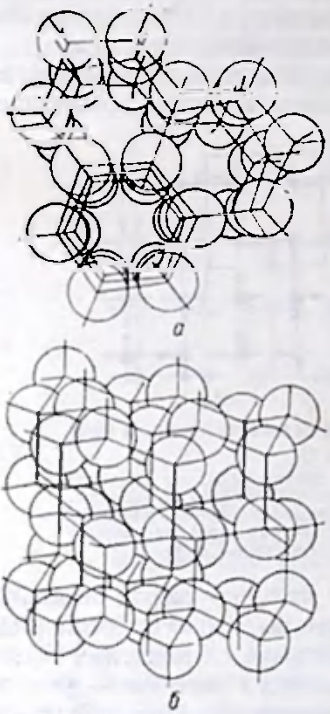


Рис. 10. Расположение молекул воды в кристалле льда по данным дифракции рентгеновских лучей. Молекулы воды в кристалле льда образуют гексагональную структуру:
а — вид сверху; *б* — вид сбоку.

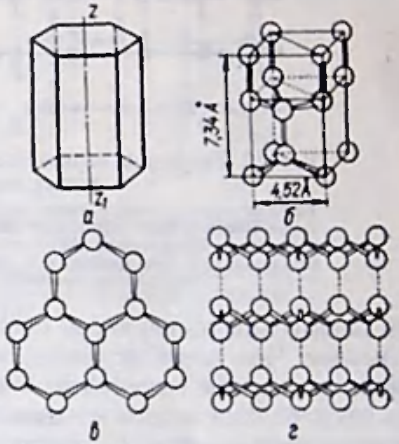


Рис. 11. Архитектура кристаллов льда по Люйе [524]:
а — контуры гексагональной призмы; *б* — часть системы с типичным расположением молекул воды в кристалле льда; *в* — расположение шести молекул воды в гексагональной системе кристалла льда; *г* — предполагаемая сверхструктура системы основной призмы кристалла льда.

кул. Хотя гипотеза Бернала — Фаулера явилась плодотворной в аспекте изучения молекулярной ориентации воды в кристалле льда, она не предопределила какого-либо специфического расположения молекулярных ориентаций, а допускала множество различных расположений (рис. 12). На рис. 12 *а*, *б* показано лишь два варианта различных ориентаций молекул воды в кристалле льда, в которых каждая пара соседей может иметь водородную связь. При этом положительный протон обращен к отрицательно

заряженному облаку. В таком кристалле льда, состоящем всего лишь из девяти молекул, возможно в общей сложности 2604 различных расположения. Возможны и другие гипотетические расположения с повторяющимися ячейками (рис. 12, *в*, *г*).

Как известно, в большинстве твердых тел атомы построены в определенном порядке и каждому типу атомов присуще некоторое специфическое расположение в элементарной ячейке. Исследование в этом отношении льда показало, что расположение в нем атомов не носит какого-либо постоянного характера. Эти данные были получены на основании измерений, связанных с энтропией.

Как известно, энтропия системы определяется главным образом теплоемкостью системы, т. е. количеством теплоты, требующимся

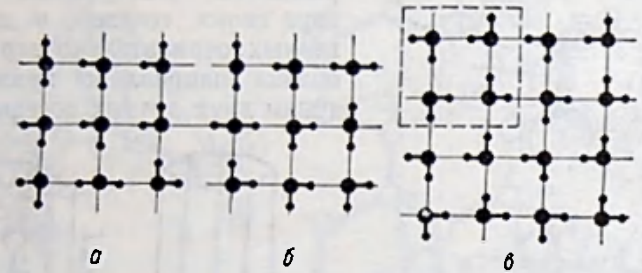


Рис. 12. Различные варианты ориентации молекул воды в кристалле льда (*а*, *б*, *в*).

Каждая пара молекул имеет водородные связи с четырьмя ближайшими молекулами. Кристалл льда, состоящий из девяти молекул, способен образовывать 2604 различных варианта связи. Пунктиром показана повторяющаяся единичная ячейка предполагаемого расположения молекул воды в кристалле льда.

для повышения температуры системы, и является мерой беспорядка в системе. Чем выше энтропия, тем более выраженное беспорядочное расположение молекул в системе. По мере охлаждения вещества — ослабления теплового движения молекул системы — упорядоченность повышается, а энтропия уменьшается. При абсолютном нуле энтропия большинства веществ равна нулю. Однако некоторые вещества, в том числе и лед, не теряют своей энтропии даже при охлаждении до абсолютного нуля. При этом система характеризуется определенной «остаточной» энтропией, при которой некоторые молекулы ориентированы определенным концом в одном направлении, другие — в противоположном. Действительно, при измерении теплоемкости льда вплоть до весьма низких температур установлено, что в этих кристаллах сохраняется определенное количество энтропии. Этим самым было показано, что молекулы в кристаллах льда способны приобретать различное расположение и ориентацию.

Если воспользоваться известной формулой Больцмана, предусматривающей, что S любой системы, в которой молекулы могут рассматриваться независимо друг от друга, пропорционально логарифму числа эквивалентных вероятных ориентаций молекул,

то получим $S = K \ln W$, где W — число возможных ориентаций, K — постоянная Больцмана. Использование этой формулы при изучении молекулярной организации льда даст $S/K = 1{,}8$, поскольку в кристалле льда молекула может иметь шесть различных ориентаций. Однако эксперименты показывают, что истинная S для льда равна всего лишь 0,4. Такое теоретическое и экспериментальное расхождение должно объясняться тем, что в формуле Больцмана W — это число независимых вариантов. Однако в кристалле льда ориентации молекул воды зависят друг от друга. Подсчитано, что на самом деле среднее число возможных выборов ориентаций для системы льда (величина W) составляет примерно 1,5 на молекулу.

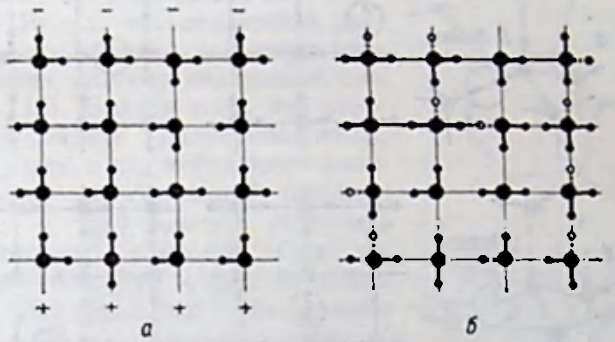


Рис. 13. Ориентация кристаллов льда в электрическом поле между положительно и отрицательно заряженными металлическими пластинами (*а*); при включении электрического поля кристалл постепенно деполяризуется (*б*).

Результаты этих исследований показывают, что если в кристалле льда все же имеются какие-либо силы, ответственные за упорядочение и различие расположений одних молекул по сравнению с другими, то это различие должно быть весьма небольшим.

Некоторое время оставалось неясным, возможна ли переориентация атомных сил в кристаллах льда либо их расположение остается постоянным согласно правилу Бернала — Фаулера об образовании прочных водородных связей, фиксирующих молекулярную организацию. Однако оказалось, что кристаллы льда при расположении их в электрическом поле начинают поляризоваться, т. е. грань кристалла, находящаяся непосредственно у положительного полюса, приобретала отрицательный заряд, и наоборот (рис. 13). Поэтому возникла мысль, что в кристалле льда молекулы способны каким-то образом изменять свою ориентацию. В 1951 г. датский химик Бьеррум (цит. по [26] и [27]) высказал предположение, что в большинстве кристаллов льда наблюдается несовершенство структуры, обусловленное хаотичным расположением водородных и электронных облаков двух соседних молекул (рис. 14).

Нарушение структуры льда первого типа, обусловленное миграцией водородных областей, было названо *D*-дефектом (от немецкого doppelt — удвоение связи), второго типа — *L*-дефектом (от leer — пустота — отсутствие протона).

Наличие таких дефектов позволяет молекуле поворачиваться и изменять свою ориентацию. Более того, подобные дефекты, перемещаясь от одной молекулы к другой, могут привести к изменению ориентации многих молекул в кристалле. Эксперименты свидетельствуют о том, что во льду при температурах, несколько меньших температуры плавления, дефект Бьерумма может иметь место для

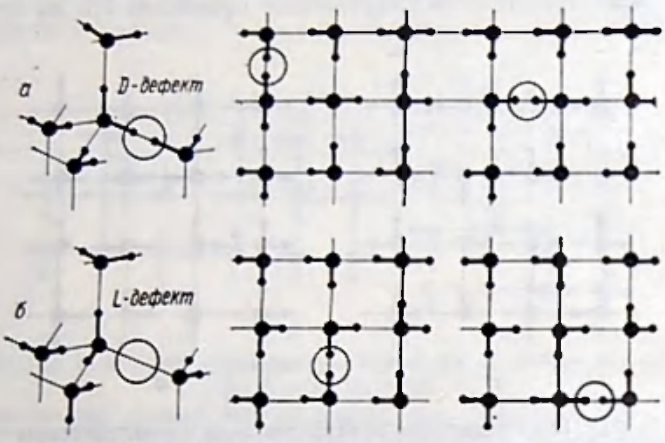


Рис. 14. Два вида несовершенства структуры кристаллической решетки льда (*D* и *L*-дефекты Бьерумма). В *D*-дефекте положительно заряженные протонные облака двух прилежащих молекул направлены непосредственно друг к другу (взаимодействуют отрицательно заряженные электронные облака):

а — перемещение *D*-дефекта через гипотетический двумерный кристалл и возникновение цепочки разориентированных молекул; *б* — диэлектрическая релаксация, возникающая в результате миграции дефектов Бьерумма.

одной молекулы из миллиона. В результате быстрого перемещения дефектов и возникают явления поляризации и релаксации кристалла льда. Ориентация молекул в кристалле изменяется не только под влиянием электрического поля, но и при воздействии механических сил. На основе картин мигрирующих дефектов Бьеррума и поляризационных опытов была измерена величина времени «полураспада» поляризационного состояния после снятия электрического поля в кристалле льда при температурах, близких к температуре плавления. Эта величина оказалась равной одной стотысячной секунды. Это свидетельствовало о том, что каждая молекула в таком кристалле, как правило, вращается со скоростью, равной примерно 100 000 оборотов в секунду.

О наличии в структурах льда физико-химических процессов свидетельствуют данные по электропроводности. Проводимость чистого льда примерно такая же, как и обыкновенной воды, т. е. лед является

плохим проводником электричества. Например, потенциал 200 *в*, приложенный к кубику льда с ребром 2,5 *см*, вызывает ток через этот кубик силой в одну миллионную долю ампера. Во льду ток переносится главным образом заряженными ионами. Если представить себе ионы во льду как некий тип дефекта, то, очевидно, роль их в процессе переноса заряда будет заключаться в перемещении дефектов Бьеррума.

Ионы гидроксила, например, могут обусловить возникновение тока, передавая свой избыточный протон соседней молекуле льда, которая таким образом передает его дальше. Хотя этих ионов и не так много, они движутся настолько быстро, что могут обусловить возникновение все же заметного тока. Видно, что лед нельзя рассматривать как некую застывшую массу, характеризующуюся неизменной системой (рис. 15). Больше того, лед относят к протонным полупроводникам. Путем введения в лед небольшого количества кислот или оснований (аммиак, гидроокись и др.) можно увеличить число подвижных протонов. При использовании молекул воды, меченной H^3 и O^{18}, оказалось, что оба изотопа диффундируют через кристалл с одинаковой скоростью. Это свидетельствует о том, что метка перемещается между молекулами основного кристалла как член единой неразделенной молекулы, а не как отдельные водородные или гидроокисные ионы. На основании этого можно сделать вывод, что в кристалле льда может перемещаться цельная молекула. Считают, что это перемещение может осуществляться через пустоты в кристаллической решетке. Другим типом несовершенств в кристаллах льда является перемещение молекул в междоузлиях. Обычные тепловые колебания могут служить причиной перескока молекулы с соответственного места решетки в пустоты и перемещения по ним либо каналам, имеющимся в кристаллической решетке. При таком перемещении возникает определенная вероятность вышибания другой молекулы из занимаемой ею позиции.

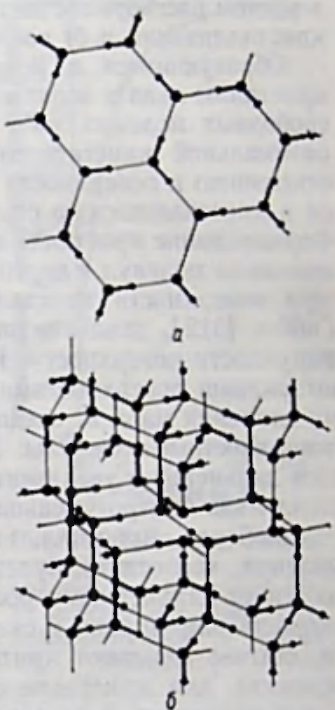


Рис. 15. Упорядоченная ориентация атомов водорода в кристалле льда при низких температурах:
а — вид сверху; *б* — вид сбоку.

Методом ЯМР, который является наиболее чувствительным индикатором молекулярного движения, установлено, что во льду при температуре, несколько меньшей температуры плавления, молекула перепрыгивает из своего места в узле решетки в среднем

один раз каждую миллионную долю секунды и перемещается при этом на расстояние, равное примерно восьми молекулярным радиусам, прежде чем попадет на какое-либо место в решетке. Следовательно, этот процесс происходит в десять раз быстрее, чем вращение молекулы, расположенной в узле структуры. Таким образом, внешний вид и устойчивая симметрия кристалла льда обманчивы. Внутри на молекулярном уровне происходят беспрерывные движения молекул, которые заряжают взаимно кристаллическую решетку.

Динамика кристаллизации льда. Процесс кристаллизации льда в водном растворе состоит из двух этапов: а) формирования центров кристаллизации и б) последующего роста кристалла.

Образующиеся в результате понижения температуры мелкие кристаллы льда в водном растворе непрерывно подвергаются атаке свободных молекул либо кластеров. Последние в случае наличия оптимальной кинетической энергии и ориентировки молекул по отношению к поверхности возникшего кристалла могут встраиваться в кристаллическую структуру, обеспечивая ее дальнейший рост. Формирование кристалла во многом зависит от степени и скорости движения молекул в переохлажденном растворе, а также от характера поверхности кристалла. Согласно классическим воззрениям Гиббса [312], давление пара в системе прямо пропорционально выпуклости поверхности. Кристаллы небольших размеров с сильно выпуклыми поверхностями обладают довольно высокими значениями давления пара и, следовательно, способны более быстро терять поверхностные молекулы. Поскольку потеря вещества сопровождается дальнейшим увеличением выпуклости поверхности, такой кристалл льда быстро уменьшается в размере и в дальнейшем исчезает.

Наоборот, кристалл, который способен акцептировать больше молекул, чем отдать, будет иметь выпуклую поверхность, что способствует дальнейшему росту кристаллов. Ситуацию, при которой скорость элиминации и скорость захвата молекул уравновешиваются, обычно называют критическим размером кристалла. При этих условиях для кристалла создаются одинаковые возможности как для роста, так и его плавления. При низких температурах молекулярная активность снижается, что приводит к уменьшению потерь молекул с поверхности, т. е. при этих условиях критический размер будет меньше, чем при высоких температурах.

Механизмы кристаллизации. Формирование ядер кристаллизации льда может быть однородным и неоднородным.

Однородное формирование ядер может быть определено как развитие ядра кристаллизации критического размера посредством неупорядоченной агрегации молекул. В частности, для воды предполагается, что формирование ядра происходит на основе ажурной льдоподобной ее структуры. Экспериментально-расчетным методом, включая и величины адиабатического расширения пара, показано, что самые низкие температуры замерзания воды находятся в пределах от —40 до —50°. Это температуры, при которых неупорядоченные агрегаты правильных молекул воды могут иметь размеры,

достаточные для формирования ядер критического размера [533].

Расчеты размера кристаллических ядер как функции температуры представлены на рис. 16. Эти расчеты свидетельствуют о том, что компоненты кристаллической решетки размером 20—30 Å не способны выступать в качестве участков формирования ядер при температурах выше ΔT [1]. Подтверждением того, что конфигурация кристаллической решетки не играет существенной роли в формировании ядер кристаллизации, служили опыты по замораживанию капель воды. При этом не было обнаружено различий в увеличении температуры замерзания маленьких капель воды, одни из которых содержали примеси органических соединений, включая метан, другие были свободны от таких включений. Температура замерзания как тех, так и других капель жидкости была в пределах —42,9 ± 0,2°. Вместе с тем наблюдения показали, что жидкость с упорядоченной структурой и находящаяся в микрополостях может формировать ядра при температуре выше ΔT, однако размер этих полостей должен быть порядка 100 Å в диаметре либо еще ниже [820].

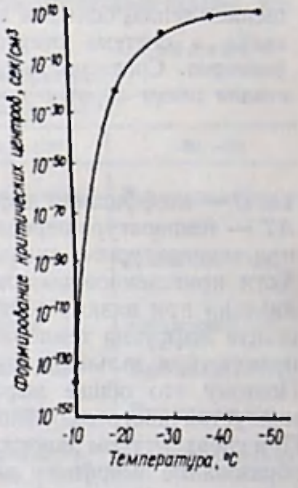


Рис. 16. Теоретическая скорость формирования центров кристаллизации критического размера при гомогенном льдообразовании в чистой воде [541].

Следует отметить, что действительно однородное образование ядер кристаллизации имеет место в исключительных случаях. Чаще всего для того, чтобы неупорядоченная агрегация воды могла достичь критических размеров, в ней должны присутствовать катализаторы, представляющие собой инородные поверхности либо частицы. При этом допускается, что в этих участках конфигурация поверхности может быть сравнима с конфигурацией льда, которая может служить основой для непрерывного роста кристалла.

Превращение воды в лед включает переход от относительно неупорядоченного состояния в высокоупорядоченную структуру со значительно меньшей величиной свободной энергии. Разница в перепадах энергии при переходе из одного состояния в другое может быть измерена по определению скрытой теплоты плавления в момент фазового перехода вода — лед. Установлено, что температура, при которой ядро кристаллизации находится в равновесии с точкой плавления, обратно пропорционально его выпуклости. С увеличением сферичности поверхности температура равновесия

[1] ΔT — выражение Турнбалл [820] для обозначения числа градусов ниже точки плавления.

повышается и для льда приближается к 0° по мере того, как поверхность кристалла приобретает нулевую сферичность. Было рассчитано, что давление пара маленькой капли приближается к давлению массы жидкости, если радиус капли равен 1. Поэтому кристалл с нулевой выпуклостью (сферичностью) имеет критический размер в точке плавления. Выше этой температуры его размер уменьшается, а ниже этой температуры кристалл будет расти. Поскольку рост либо уменьшение размеров большого кристалла не вызывает значительных изменений в его сферичности и сопровождается поглощением тепла, большие кристаллы будут устойчивы в тех условиях, когда в системе отсутствуют ядра кристаллизации небольших размеров. Согласно теории Вильсона [841], скорость роста кристалла имеет обратно пропорциональную зависимость

$$V = \frac{D\Delta S\Delta T}{lRT}, \qquad (4)$$

где D — коэффициент диффузии; S —молярная энтропия плавления; ΔT — температура переохлаждения; l — расстояние от поверхности при температурном скачке; T — температура по шкале Кельвина. Хотя приведенное выражение показывает, что скорость кристаллизации при низких температурах будет достаточно высокой, константа диффузии температуры становится очень низкой, тем самым препятствуя дальнейшему распространению фронта температуры. Поэтому это общее выражение не противоречит существованию малоустойчивого аморфного льда при сверхнизких температурах. При сверхбыстром замораживании объекта всегда можно наблюдать образование аморфного льда, хотя механизм его формирования остается во многом неясным. Сравнительно мало известно о характере и особенностях образования такого льда из массы воды. Показано, что естественно надежным методом его получения из чистой воды является медленная конденсация пара на очень холодной поверхности. Считают, что однородное формирование ядер из неупорядоченных ассоциатов молекул в системе неизбежно будет мешать образованию аморфного льда, даже если при этом будет отсутствовать неоднородное формирование ядер. Когда отдельные молекулы воды из пара конденсируются при температуре слишком низкой для последующей перегруппировки, то при этом может возникать метастабильная кристаллическая структура, которая носит стекловидный характер. Состояние, которое характеризуется образованием такого стекловидного льда, называлось ранее витрификацией. В табл. 2 приведены данные по исследованию аморфного льда и его различных низкотемпературных форм [165, 166].

Опыты с пленками аморфного льда показали, что при повторном нагревании на рентгенограммах можно наблюдать вторичное появление стекловидного льда, образованного конденсацией пара. Картина такого вторичного льдообразования развивается постепенно, и его первые признаки появляются при температуре примерно —110°, а образование гексагонального льда завершается в интер-

вале —80—50° [255, 256, 552]. Выделение скрытой теплоты плавления такого льда наблюдается при —129° [652]. Считают, что температура —120° является критической, при которой уже возможна стекловидная трансформация льда, поэтому она была названа температурой стекловидной трансформации. При этом ошибочно считали, что ниже этой температуры скорость роста кристаллов становится ничтожной. Наблюдения над системой лед — вода позволили Турнбаллу [820] установить экспериментальную величину для объема, температурной зависимости роста кристаллов, ко-

Таблица 2

Структура воды при низких температурах

Экспериментальные методы исследования	Температурный диапазон, °С		
	—180, —160, —140	—120, —100	—80, —60
Дифракция рентгеновских лучей	Аморфная	Полукристаллическая	Гексагональная
Калориметрия	Аморфная		
Дифракция рентгеновских лучей	Мелкие кристаллы	Промежуточная область, мало исследована	Гексагональная
Дифракция электронов	Мелкие кристаллы	Кубическая	Гексагональная
Калориметрия	Витрифицированная	Полукристаллическая	Кристаллическая
Дифракция электронов	Слабый рост кристаллов	Кубическая	Гексагональная
Калориметрия	Аморфная	Полукристаллическая	Кристаллическая
Калориметрия	Витрифицированная	Полукристаллическая	Кристаллическая
Дифракция электронов	Аморфная или мелкие кристаллы	Кубическая	Гексагональная

торая оказалась: $V = 0{,}158 \pm 0{,}009$; $T^{1{,}69} \pm 0{,}03$ *см/сек*, для ΔT в интервале 10^{-2}— 10°. Эти величины несколько отличаются от полученных по выражению Вильсона. Это объясняется тем, что в данном случае не была учтена поправка на небольшую поверхность кристалла, используемую для его роста, причем предполагается, что рост кристалла сопровождается его спирально-дислокацией. Было также установлено, что скорость роста кристалла зависит от «подложки», на которой он формируется. Кристаллы льда обычно растут гораздо медленнее в свободной суспензии, чем на стенке или металле. В последнем случае кристаллизация происходит очень быстро, что объясняется почти мгновенным отведением скрытой теплоты от кристалла льда. Таким образом, скорость роста и характер образующихся кристаллов на поверхности во многом определяется свойствами «подложки», хотя скорость роста и не отражает внутренних характеристик жидкости.

Исследуя методом рентгенографии характер аморфного льда, полученного в результате конденсации пара, Дауэлл и соавторы [255,

256] установили, что при этом появляются три выраженных сигнала, которые, очевидно, связаны с возникновением кристаллов в стекловидном льде, по своей структуре напоминающих строение кубической решетки алмаза. При повышении температуры такой лед кристаллизуется в гексагональную решетку. Следовательно, при сверхнизких температурах лед имеет главным образом аморфное строение, которое затем может приобретать кубическую форму. В эксперименте получить такой лед в чистом виде очень трудно, но это возможно во время конденсации при условии наличия сильно охлажденной «подложки», через которую проходит ток высокой частоты [164]. Правда, в таких случаях кубический лед получается с небольшой примесью гексагонального. По данным Дауэлла [255], переход из аморфного состояния льда в кубический лед происходит в интервале температур —160—135°, а при —130—140° кубический лед начинает трансформироваться в гексагональный. Временная зависимость, необходимая для завершения девитрификации из прозрачного в кубический лед и перекристаллизации последнего в гексагональную форму, показана на рис. 17. Полагают, что быстрый переход стекловидного льда в полукристаллический или кубический происходит при температуре —130° в том случае, когда образец согревается с умеренной скоростью порядка 5° в минуту. Поскольку получить стекловидный лед аморфного строения из чистой воды очень трудно, его лучше получать при добавлении определенных соединений, которые эффективно снижают скорость кристаллизации. Показано, что сравнительно небольшое добавление к воде спиртов, гликолей, сахаров, белков тормозит скорость процесса кристаллизации льда [496, 507, 508, 797]. Некоторые из этих соединений были способны снизить скорость кристаллизации в 10 раз уже в 5%-ной концентрации, а этанол в 35%-ной концентрации снижал этот процесс в 1000 раз. Аналогичные данные были получены при добавлении сахаров и желатина [307, 512]. Длительное время механизм этого явления не был понятен. Считали [306], что изменение процесса кристаллизации льда под влиянием этих соединений происходило за счет влияния на вязкость или процесс ядрообразования за счет изменения поверхностных свойств кристалла.

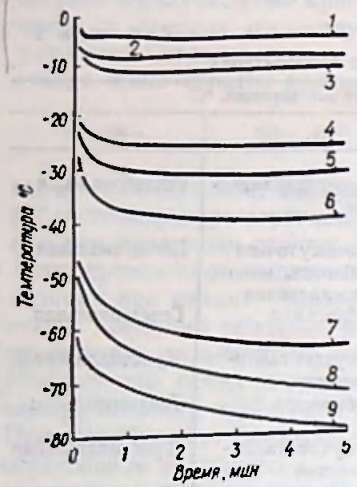


Рис. 17. Температурная зависимость распространения фронта кристаллизации в растворах водорастворимого крахмала (*1*), декстрана (*2*), желатина (*3*), раффинозы (*4*), сахарозы (*5*), глюкозы (*6*), глицерина (*7*), этиленгликоля (*8*) и формальдегида (*9*) [513, 524].

В 1958 г. Меримен [559, 560] методом дифракции рентгеновских лучей исследовал явления кристаллизации в 30%-ном желатине и установил, что изменение I фазы, происходящее при температуре —10°, т. е. переход из прозрачного состояния в матовое, представляет собой переход не из стекловидного состояния в кристаллический лед, а зависит от того, что лед гексагональной формы имеет незавершенную структуру. Было высказано предположение, что прозрачная фаза может представлять собой лед кубического строения. Однако было показано, что образцы с добавлением желатина при температуре —30° очень быстро обезвоживались в присутствии паров азота, используемых для их охлаждения. Интересно, что при высоком давлении пара явлений рекристаллизации в таких пробах не происходило. Полагали, что при этом незавершенная структура, полученная в результате добавления желатина, сохраняется за счет жесткости матрицы последнего, которая препятствовала развитию кристаллов больше 50 Å, т. е. таких размеров, чтобы получить четкий рентгеновский рефлекс. При более низких температурах помимо перехода стекловидного (либо псевдостекловидного) льда в кристаллический наблюдается рост больших кристаллов из кристаллов меньших размеров в результате разницы в давлении пара кристаллов с различным радиусом кривизны. В чистом поликристаллическом льде отсутствуют препятствия для перехода молекул воды от одного кристалла к другому. Такого типа рекристаллизация сопровождается довольно быстрым ростом зерен [553, 554]. Там, где органическая матрица отделяет один кристалл от другого, скорость роста зерен довольно низкая, что является, однако, важным фактором. Показано, что в результате добавления, например, неэлектролитов в раствор небольшой кристалл превращается в больший лишь после двухчасовой его экспозиции при температуре —4—8°.

Глава II

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ

В настоящей главе рассматривается главным образом характер процессов замораживания в небиологических средах, т. е. фактически кинетика замораживания в модельных растворах воды.

Замораживание в широком физическом смысле может быть определено как затвердевание жидкости. Различают два вида замораживания: а) затвердевание жидкости, в которой молекулы или атомы расположены упорядоченно; в таких случаях говорят, что имеет место процесс кристаллизации; б) такой же процесс, но с неупорядоченным расположением молекул и атомов, т. е. речь идет о так называемой аморфизации жидкости. Вместе с тем такое разделение является чисто условным, поскольку кристаллизационные и аморфные фазы могут находиться в комбинированном состоянии, т. е. в замороженном образце можно выявить и быстро исчезающие его формы типа сферулитов. Замораживание водного раствора в основном протекает в две стадии: а) кристаллизация растворителя (воды), называемая первичной кристаллизацией, и б) кристаллизация растворенного вещества и раствора, которые в сумме составляют вторичную кристаллизацию.

При сверхбыстром охлаждении пробы протекают обычно два указанных выше процесса, в результате чего образуется твердое некристаллическое состояние системы — аморфизация. При повышении температуры и увеличении в результате этого подвижности молекул и атомов такие системы могут испытывать последующие фазовые переходы, которые классифицируются как процесс рекристаллизации.

Первичная кристаллизация. Под первичной кристаллизацией понимают кристаллизацию растворителя (чистой воды) из суммарного раствора. Основными факторами, определяющими образование и рост кристалла, является температура, воздействию которой подвергается раствор, экспозиция пробы в температурных условиях, скорость переноса тепла, характер и концентрация растворенного вещества в воде. Короче говоря, процесс роста кристалла льда связан с интенсивностью охлаждения, замораживания и оттаивания.

В результате глубоких морфологических исследований особенностей образования кристаллических структур в замороженных тонких слоях кристаллов и коллоидов (растворы сахарозы, глице-

рина, желатина, альбумина, миозина, ПВП и др.) установлено, что в зависимости от концентрации и температуры возникают самые разнообразные формы льда (рис. 18)[1], которые Люйе [524] условно распределил на четыре группы: гексагональные формы, неправильные дендриты, грубые сферулиты, быстро исчезающие сферулиты.

На основании морфологических исследований, а также симметрии и последовательности появления форм льда было сделано заключение, что эти процессы очень зависят от скорости охлаждения. При медленном замораживании, когда имеется достаточно времени для перестройки молекулы воды, возникают хорошо упорядоченные структуры гексагональной формы (рис. 19). При некотором повышении скорости замораживания элементы гексагональной симметрии начинают исчезать и сбразуются структуры типа неправильных дендритов (рис. 20, *а*, *б*, *в*). При дальнейшем повышении скорости охлаждения возникает новый порядок льда — грубые сферулиты, характерной чертой которых является радиально расположенная лучистость, идущая от центра кристаллизации (рис. 20, *г*, *е*). Наконец, при сверхбыстрой скорости замораживания в воде не могут произойти полные молекулярные перестройки и процесс кристаллизации остается как бы незавершенным — на стадии образования быстро исчезающих сферулитов (рис. 20, *ж*). При переходе от одного типа кристаллической формы к другой в зависимости от температуры наблюдаются самые разнообразные структуры, в которых кристаллы льда имеют промежуточное строение (рис. 20, *д*). Эти промежуточные типы Люйе [512—522] классифицирует как коллонадные (рис. 21, *а*,*б*), типы «кожуры апельсина» (рис. 21, *г*), усоподобные сферулиты (рис. 21, *д*). Все эти и другие типы льда были выявлены в 20—30%-ных желатиновых гелях при замораживании в интервале температур —9—30°.

При анализе динамики роста кристаллов льда было показано, что его различные формы по-разному ведут себя при понижении температуры системы. Например, когда гексагональный диск достигает размера 10—50 Å, его углы растут быстрее, образуя конфигурацию звезды (рис. 21, *е*). Концы такой звезды продолжают расти еще быстрее, формируя гексагональную шестнугольную розетку (рис. 20, *а*), от которой идут первичные ответвления под углом 60°. Первичные ответвления дают начало вторичным угловым ответвлениям, в результате чего образуется кристаллический скелет (рис. 19, *ж*). Неправильные дендриты, образующиеся при более быстром замораживании, могут иметь любое количество осевых колонок, хотя углы между ними и их ветвями сохраняются такими же, как и в случае гексагонального льда.

Некоторые из неправильных дендритов с периодически повторяющимися структурами различной сложности представлены на рис. 19 и 20. Особый интерес представляют так называемые быстро исчезающие сферулиты, крупнокристаллический характер которых

[1] См. рис. 18—23, 25—28, 30, 48—50, 90—110, 112, 125, 127, 130 на вклейке.

был выяснен в поляризационном свете и методом рентгенографии. При обычном свете поле быстро исчезающих сферулитов почти прозрачно (рис. 20,*ж*), а в поляризованном свете между скрещенными призмами Николя видны типичные фигуры сферулитов, так называемые мальтийские кресты (рис. 21, *е*). Это состояние льда ранее обозначали как стекловидное (витрифицированное) и считали, что его структура аморфна. Однако на самом деле эта система содержит быстро исчезающие структуры — сферулиты, которые, очевидно, представляют по своему характеру начальные или незаконченные формы кристаллизации, формирование которых осуществляется в процессе рекристаллизации (рис. 22, *а*, *б*). Электронномикроскопическая структура таких сферулитов была исследована на высушенном замораживанием растворе альбумина и сверхтонких пленках, помещенных между двумя слоями коллодия по методу Маккензи [526], которые можно было охлаждать со скоростью 100 000° в секунду. Характер распространения дендритов такого льда представлен на рис. 22, *в*, *г*, *д*. Как видно, такой лед образует от центра новые колонки дендритов без боковых ветвей. Диаметр колонок дендритов может колебаться от нескольких микронов до 300 А. Таким образом, этот метод позволяет выявлять как дендрические структуры, так и быстро исчезающие сферулиты, вплоть до размеров порядка 300 А, в то время как в световом микроскопе эта система кажется совершенно прозрачной. При более высоком охлаждении тонких срезов происходит постепенное размывание дендрической структуры и более или менее неупорядоченное распределение частичек льда или сегментов (рис. 23, *а*, *б*, *в*) размером 100—300 А. При сверхбыстрой скорости охлаждения какие-либо различия между льдом и раствором (рис. 23, *в*) выявить не удается, хотя разделение поля на полигональные площади свидетельствует о присутствии в системе отдельных кристаллов. Очевидно, частички либо сегменты льда размером менее 100 А в таких условиях слишком неустойчивы и неспособны находиться в стабилизированном состоянии при замораживании и длительном хранении при низких температурах.

В результате проведенных электронномикроскопических исследований установлено, что быстро исчезающие сферулиты могут быть трех видов [524]: а) первый тип характеризуется дендрической структурой, у которой ветви имеют диаметр от 5000 до 300 А (рис. 18, *б*); б) второй тип представлен сегментарными частицами размером 300— 100 А (рис. 18, *а*); в) третий тип — сферулитами, в которых невозможно выделить фазу льда (рис. 18, *в*).

При добавлении в среду материала, тормозящего кристаллизацию, например 30%-ного желатина, при охлаждении со скоростью несколько сот градусов в секунду исчезают характерные пики, полученные методом рентгеновской дифракции. Однако если температуру такого охлажденного образца резко повысить, то после повторного замораживания наблюдается восстановление двух пиков дифракции. Считают, что появление двух пиков при быстром охлаждении обусловлено наличием кристаллов кубического льда.

При повторном нагреве происходит фазовый переход — кубический лед превращается в гексагональный, в результате чего рентгенографическая картина изменяется [255, 522—524, 562—564]. На рис. 24 представлены данные Люйе, который охлаждал растворы желатина разной концентрации с различной скоростью. Было обнаружено, что при снижении скорости охлаждения пики постепенно уменьшаются и становятся более размытыми, т. е. при этом появляются рефлексы, характерные как для кубического, так и для гексагонального льда. Следует отметить, что методом дифракции рентгеновских лучей можно установить характер рефлексов отражения, природа которых зависит от фазового перехода — внезапно начавшейся рекристаллизации.

Вторичная кристаллизация. После завершения первичной кристаллизации, когда растворитель (вода) полностью вымораживается, начинает затвердевать следующая фаза — растворенные вещества. Процессы, происходящие при вторичной кристаллизации, были исследованы Люйе с соавторами [518—524] на тонких слоях 20%-ного глицерина, замороженного между двумя покровными стеклами. Когда температура такого слоя снижалась до —4° (т. е. температура была близкой к эвтектической), образовывались колонки льда, а концентрированный раствор глицерина сосредоточивался в узких каналах. На рис. 25, *а* это состояние показано темными полосами. При понижении температуры до —40° наступало также замораживание концентрированного раствора и появлялись фигуры быстро исчезающих сферулитов (вторичная кристаллизация), что хорошо было видно в поляризованном свете (рис. 25, *б*). Аналогичные данные получены при медленном охлаждении 20%-ного раствора аланина до —12°. При такой температуре довольно быстро образуется сетка льда (серый фон на рис. 25, *в*), а концентрированный раствор сосредоточивался в каплях между льдинками (темные полосы). При понижении температуры этого раствора до —18°, т. е. на несколько градусов ниже эвтектической точки, в концентрированном слое появлялись полиэдрические кристаллы правильной формы (темные поля на рис. 25, *г*). Если такую пробу резко охладить до более низкой температуры (—30°), то вместо правильных полиэдров

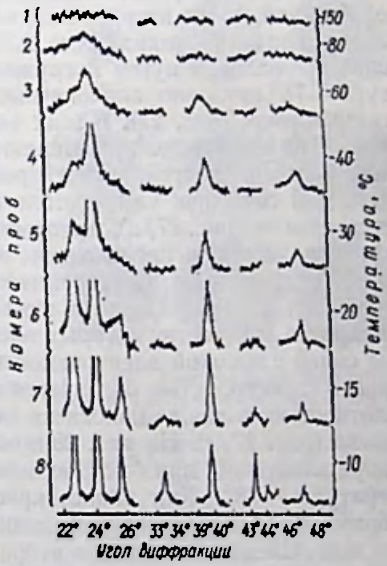


Рис. 24. Дифракционные кривые замороженных срезов желатина [524].
Объяснение в тексте.

образовывались фигуры неправильных дендритов с многочисленными ответвлениями (рис. 25, *г*). Кроме того, процессы кристаллизации растворенных веществ, их гидратов и системы растворенное вещество — растворитель в солевых растворах, которые, согласно данным Люйе и соавторов [522], классифицируются как системы с эвтектическими, эвтектоидными и перитектическими точками замерзания. На рис. 26 представлены две стадии вторичной кристаллизации 10%-ного раствора NaCl, образование первичной сетки льда и каналов с концентрированным содержанием. При дальнейшем понижении температуры в этих каналах медленно формируются сферулиты (большие темные кружки на рис. 26), рост которых, однако, быстро приостанавливается развивающейся кристаллической фазой, фронт которой в виде белых полос виден сверху (рис. 26). Замораживание тонких слоев 20%-ного раствора KCl между двумя слоями коллодия путем погружения их в изопентан при температуре —78° показало аналогичные картины фазовых переходов, описанных выше (рис. 27). В этих случаях кристаллы типа быстро исчезающих сферулитов представляют собой тонкие диски полигональной формы с диагональным (размером 2—3 *мк*) и поперечным (0,05 *мк*) сечением. Они состоят из ледяных волокон (пустые пространства на рис. 27, *а*), которые радиально расходятся от центров кристаллизации и расположены в канальцах, в которых находится концентрированное растворенное вещество. Более резкое охлаждение ведет к образованию в этих канальцах неправильной формы дендритов льда, ветви которых толщиной 1—2 *мк* окружают кристаллы солей с высокой электронной плотностью (рис. 27, *б*, *в*). Внутри такого пространства образуется ядро кристаллов соли с меньшей плотностью, а также находятся зоны некристаллизованного материала (рис. 27, *г*). На рис. 28 показана кристаллизация соли в растворе альбумина при быстром замораживании в изопентане до температуры —78°. Как видно, кристаллы соли находятся главным образом на границе между соседними быстро исчезающими сферулитами льда. Следовательно, при вторичной кристаллизации имеет место образование фигур трех видов: правильных полиэдров, неправильных дендритов и быстро исчезающих сферулитов. Из изложенного следует, что с увеличением скорости охлаждения в концентрационных растворах (вторичная кристаллизация) происходит такая же кинетика фазовых переходов, какая наблюдается при замораживании растворителя, т. е. при первичной кристаллизации.

Рекристаллизация. Показано, что тонкий слой водного раствора, замороженный до образования быстро исчезающих сферулитов, содержит прозрачные области, которые быстро теряют свои свойства, если температуру пробы повысить до определенного уровня (рис. 19). Аналогично этому кристаллизованный прозрачный тонкий слой желатина быстро мутнеет при повторном нагревании [523, 524]. Желатиновый гель, в котором была сформулирована кристаллическая розетка при температуре —25° (рис. 29), последовательно нагревали до —20, —15, —12,5, —10, —8,5, —6,5, —5 и —3°. При повы-

шении температуры от —20 до —10° размеры розетки увеличивались, а в интервале температуры от —10° до —3° они мутнели, причем эти изменения в прозрачности наблюдались в относительно узком интервале температур и главным образом в тех местах, в которых осуществлялась кристаллизация при охлаждении. Считают, что это явление связано с дополнительным ростом ранее сформированных более мелких кристаллов из центров. Такой процесс дополнительной «достройки» зародышевого кристалла мелкими фрагментами льда называют обычно процессом рекристаллизации. Люйе [524] называет такой процесс «внедряющейся» рекристаллизацией, которая происходит при повторном нагревании в широком интервале температур при различных концентрациях: при концентрации желатинового геля порядка 50% рекристаллизация наступает при температуре —10°, а при более высокой концентрации — при —40°. Вместе с тем необходимо отметить, что процесс рекристаллизации может происходить не только при некотором подъеме температуры замороженного образца, но и спонтанно, непосредственно при понижении температуры. Поэтому 30%-ный желатиновый гель уже быстро мутнеет при замораживании до —25° с использованием умеренных скоростей охлаждения. Очевидно, спонтанные и внедряющиеся формы рекристаллизации, наступающие после нагревания, имеют одинаковую природу, хотя отличаются друг от друга скоростью освобождения и выведением теплоты кристаллизации.

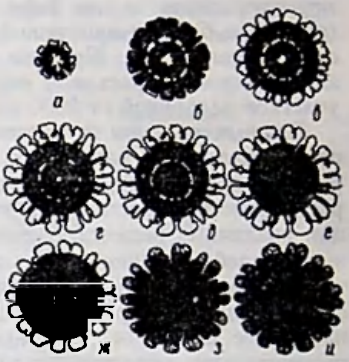


Рис. 29. Розетки льда, формирующиеся в 50%-ном желатиновом геле при —25° [524]:

а — при —25°; *б* — при —20°; *в* — при —15°; *г* — при —12,5°; *д* — при —10°; *е* — при —8,5°; *ж* — при —6,5°; *з* — при —5°; *и* — при —3°. Срезы толщиной 0,02 *мм*. × 60.

Таким образом, следует различать два типа рекристаллизации: спонтанную, происходящую при охлаждении, и индуцированную, наступающую после повторного нагревания замороженного материала. Различают еще так называемую перемежающуюся рекристаллизацию, или рост зерен льда, характеризующуюся увеличением массы кристалла за счет присоединения мелких фрагментов в результате миграционных циклов молекул или атомов. В чистой воде, полученной из льда и воды, содержащей растворенные вещества, процессы рекристаллизации различны. Во льду, образованном из чистой воды, происходит медленное преобразование кристаллической льдоподобной системы на протяжении широкого интервала низких температур, интенсивность которого прямолинейно увеличивается по мере повышения скорости охлаждения и понижения температуры. Если лед получают из растворов,

то его формирование обычно тормозится присутствующими в системе растворенными веществами. Согласно современным представлениям, «перемежающаяся» рекристаллизация довольно быстро осуществляется при температурах, несколько выше этой точки, и заметно снижается при низких температурах. Визуально наблюдаемое помутнение быстро замороженной пробы в результате повышения температуры до величин «внедряющейся» рекристаллизации под электронным микроскопом имеет вид сферических тел диаметром 1 *мк* (рис. 30). Под электронным микроскопом видно, что иногда после рекристаллизации такие частички быстро исчезающих сферулитов расположены в радиальном порядке от центра кристаллизации, и их размер увеличивается по мере удаления от центра к периферии (рис. 30, *а*, *б*). При спонтанной рекристаллизации наблюдается более слабое помутнение. При увеличении в несколько тысяч раз под электронным микроскопом оно имеет вид резко очерченных белых участков величиной от 2000 до 200 А (рис. 30, *в*, *г*).

Важным выводом из указанных выше работ по «внедряющейся» рекристаллизации явилось то, что интервал температур, при которых она происходит, зависит прежде всего от молекулярного веса растворимого вещества, как это видно из кривых рекристаллизации различных веществ. Вместе с тем концентрация вещества оказывает слабое влияние на температуру рекристаллизации. Следует также отметить, что если физико-химические механизмы рекристаллизации растворителя после первичной кристаллизации более или менее выяснены, то вопросы, касающиеся рекристаллизации растворенного вещества, например, таких эвтектических смесей, как растворитель — растворенное вещество и гидратов после вторичной кристаллизации, еще мало исследованы.

Аморфизация. В настоящее время доказано, что любые замороженные растворы не могут быть в аморфном состоянии, а представляют собой всегда кристаллическую структуру той или иной степени стабильности. Электронномикроскопические исследования свидетельствуют о том, что даже при сверхбыстрой скорости замораживания растворы имеют кристаллическую структуру в виде нестойких быстро исчезающих сферулитов, которые не способны вырасти до таких размеров, чтобы получить двойное лучепреломление в поляризованном свете. В последнее время удалось получить так называемое витрифицированное состояние замороженного образца при огромной скорости замораживания (100 000° в секунду) путем возгонки пара воды на поверхностях, предварительно охлажденных до температуры ниже —150°. Аморфное состояние такого пара было доказано методами рентгеновской дифракции, электронографии и термического анализа [164, 165, 166, 215, 254, 255, 512—524, 554—561]. Однако пока не удалось витрифицировать чистую массу жидкой воды, поскольку не удается достигнуть необходимой скорости замораживания. Согласно некоторым расчетам, для получения такой системы необходимо, чтобы температура раствора снизилась через 0,02 *сек* на 100° [775].

Эвтектическое замораживание. Когда при понижении температуры вода вымораживается из раствора, растворенное вещество концентрируется и точка плавления оставшегося раствора снижается. При этом кристаллизуется вся «чистая» вода и остается лишь некоторая часть растворенной жидкости. Дальнейшее понижение температуры ведет также к затвердеванию и этого оставшегося раствора. Самая низкая температура, при которой раствор еще остается в жидком состоянии, называется эвтектической температурой. Концентрация растворенного вещества, необходимая для получения такой низкой температуры, и представляет собой эвтектический раствор. Эвтектические растворы — это прежде всего растворы электролитов. Ниже приведены эвтектические температуры для типичных растворов электролитов [567].

Электролит	Эвтектическая температура, °С	Электролит	Эвтектическая температура, °С
KNO_3	—2,9	$NaNO_3$	—8,15
KCl	—11,1	NaCl	—21,8
KBr	—13,0	$MgCl_2$	—33,6
NH_4Cl	—15,8	$CaCl_2$	—54,9

Как видно, наиболее низкая эвтектическая температура требуется при замораживании растворов, в которых находятся катионы магния и кальция. Это является важным, так как эти катионы относятся к биоэлементам, которые регулируют в клетке важнейшие функции — биосинтез белков, мембранную проницаемость. Их присутствие в клетке является как бы естественным защитным соединением, которое понижает температуру замерзания раствора в клетке и способно таким образом оказывать влияние на функциональное состояние компонентов клетки после их деконсервации.

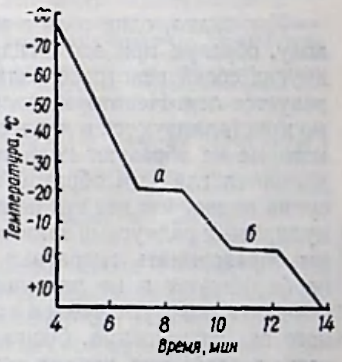


Рис. 31. Эвтектическая кривая замораживания раствора хлористого натрия [326, 327]:
плато *а* — таяние эвтектической смеси при эвтектической температуре; плато *б* — таяние чистого льда.

При замораживании растворов электролитов до эвтектической точки наблюдается два вида кристаллизации. Наиболее типичным примером кристаллизации подобных растворов может служить кристаллизация NaCl (рис. 31). Как видно, эта кривая образует плато (*б*), температура в котором держится некоторое время на одном и том же уровне. В течение данного времени вода выделяет скрытую теплоту плавления с образованием чистого льда. В это же время концентрация

раствора NaCl повышается до тех пор, пока не достигнет эвтектической концентрации (для NaCl эвтектическая концентрация равна 22,42%). При этом на кривой возникает второе плато (*а*), обусловленное выделением скрытой теплоты плавления в результате кристаллизации эвтектической смеси. При этом образуется один кристаллический гидрат, состоящий из комплекса [NaCl: H_2O]. В других случаях эвтектического замораживания вместо образования одного кристаллического гидрата раствор разделяется на кристаллический лед и кристаллическую соль. Используя метод дифракции рентгеновских лучей, Меримен [567] исследовал поведение замороженных растворов электролитов. Ниже приведены результаты опытов, в которых изучались следующие соединения и типы полученной при этом кристаллизации.

Лед + соль	Лед + гидрат	Гидрат
KBr	LiF	LiCl
KCl	NaBr	NaJ
PbCl	NaF	NaOH
CsCl	NaCl	KJ
NH_4Cl	KNO_3	KF
	$MgCl_2$	HCl
	$BaCl_2$	$CaCl_2$
	$LiNO_3$	Na_2SO_4
		$NaCO_3$
		K_2CO_3

Как видно, одни соли в ненасыщенном растворе связывают всю воду, образуя при этом гидратный кристалл. При использовании других солей некоторое количество воды остается свободным и образуется лед. Некоторые соли вообще не образуют гидратов, а прямо кристаллизуются в лед и соль. Отсюда следует, что соединениями, которые не образуют гидратов при эвтектическом замораживании, являются главным образом моновалентные ионы (рис. 32). Из рисунка видно, что все эти ионы характеризуются текучестью и молекулярными радиусами такими же, как и у воды (1,45 Å), и не способны образовывать гидратные кристаллы. Иначе говоря, эти ионы не формируют и не разрушают структуру воды, т. е. они могут замещать молекулы воды в кристаллической решетке без существенного ее разрушения. Однако при воздействии таких ионов в процессе воздействия низких температур на раствор его кристаллическая решетка оказывается более нарушенной, чем структура «чистой» воды. Многие растворимые вещества вообще не кристаллизуются в эвтектической точке. Например, растворы глицерина при снижении температуры дают непрерывную кристаллизацию льда до тех пор, пока его концентрация не достигнет 60—70%. При дальнейшем снижении температуры дополнительной кристаллизации не происходит, и оставшийся раствор медленно затвердевает в стекловидную массу. Концентрация, при которой раствор глицерина является насыщенным, находится в пределах 61,3%.

Изучение механизма эвтектических явлений осуществляется различными методами, например измерением электропроводности, дифференциального теплового анализа [691, 692]. Когда наступает кристаллизация эвтектического раствора, электросопротивление увеличивается от нескольких сот омов до нескольких мегомов, а дифференциальный тепловой анализ указывает на то, что этот момент характеризуется выделением скрытой теплоты кристаллизации (рис. 33). Если кристаллизация еще не наступает, то выделение скрытой теплоты не происходит и на кривой обычно отсутствует характерный пик (температурный скачок).

Следует отметить, что эвтектическая кристаллизация растворов электролитов заметно тормозится добавлением глицерина, ДМСО и других соединений, которые способны связать воду и понизить тем самым точку эвтектики (рис. 34). Соли при этом остаются в водном растворе в виде сложного комплекса и при дальнейшем понижении температуры затвердевают в стекловидную массу.

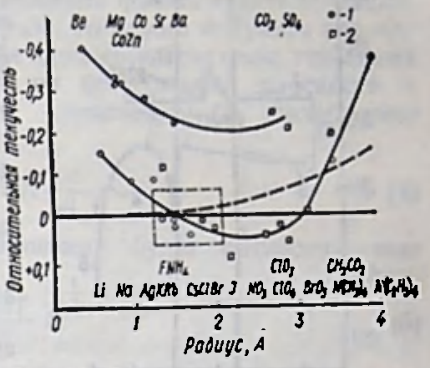


Рис. 32. Графическое изображение относительной текучести различных ионных растворов в зависимости от ионного радиуса кристалла [567].

Пунктиром показаны границы расположения ионов, не образующих кристаллогидратов ниже эвтектической точки. Такие ионы характеризуются величиной относительной текучести, приближающейся к 0 и ионным кристаллическим радиусам, находящимся в пределах между 1,5 и 2 А, т. е. эти ионы имеют такие же размеры, как и молекулы воды. Сплошной линией показаны границы расположения ионов, образующих истинные кристаллические гидраты ниже эвтектической температуры: *1* — катионы, *2* — анионы.

Некоторые данные по теплофизике процессов замораживания — оттаивания. Образование центров кристаллизации при замораживании объекта и скорость их роста зависят в основном от скорости выделения тепла из окружающей системы. И, наоборот, при оттаивании скорость плавления кристалла и степень биохимических изменений в клетке зависят от скорости поступления тепла в образец. Эти скорости являются функцией температур вне и внутри раствора, что может быть рассчитано при определении его теплопроводности и теплоемкости в жидком и замороженном состоянии, а также измерении скрытой теплоты плавления и общей геометрии пробы льда. При замораживании основным эффектом этих нескольких переменных является распределение скорости движения границы замораживания в результате роста существующих кристаллов и образования новых. Ниже приводятся теоретические и экспериментальные данные по этому вопросу, полученные в лаборатории Меримена [567].

Теоретическая часть. Скорость распространения границы кристаллизации при замораживании математически можно

выразить с помощью выражения, описывающего эти процессы на границе замерзания

$$K_i\left(\frac{dT}{ds}\right)_i - K_w\left(\frac{dT}{ds}\right)_w = LH\cdot\frac{db}{dt}, \qquad (3)$$

где K_i и K_w — теплопроводность соответственно льда и воды. По этой формуле можно вычислить общее тепло, образующееся на границе фронта кристаллизации.

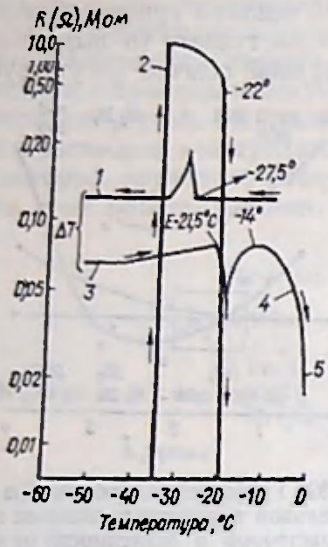


Рис. 33. Кривые дифференциального термического анализа и величины электрического удельного сопротивления изотонического раствора хлористого натрия в процессе замораживания и оттаивания [567]:

1 — изменение экзотермической фазы при —27,5°, соответствующее эвтектической кристаллизации соли; *2* — начало экзотермической фазы при —45°, сопровождающееся резким изменением эндотермической фазы при —22°; *3* — незначительное изменение удельного электрического сопротивления до завершения эвтектического замораживания; *4* — завершение эвтектического замораживания, сопровождающееся резким повышением сопротивления до 10 *Мом*; *5* — начало оттаивания — удельное сопротивление остается высоким до эвтектической точки (*E*), после которой удельное сопротивление опять резко снижается.

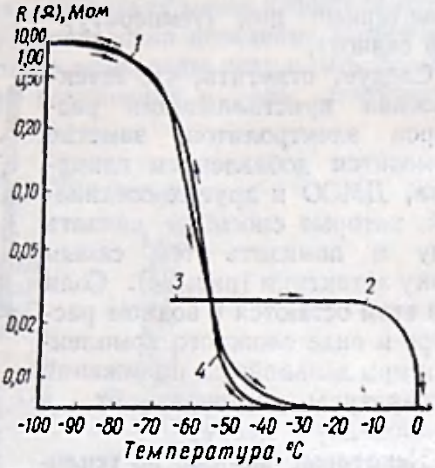


Рис. 34. Кривые дифференциального термического анализа и величины электрического удельного сопротивления изотонического раствора хлористого натрия, содержащего 1% ДМСО [567]:

1 — изменения удельного сопротивления в жидкой фазе с сохранением некоторой ионной подвижности вплоть до температур порядка —80°. Отсутствие эвтектической кристаллизации является результатом присутствия ДМСО, который сохраняет фазу в растворенном состоянии; *2* — полная кристаллизация воды при температуре —20°; *3* — более низкие температуры, при которых раствор не кристаллизуется даже при —80—90° в системе ДМСО — вода —NaCl; *4* — повышение удельного сопротивления при —50—90°, свидетельствующее о постепенном отвердении всей оставшейся жидкой фазы и снижении лабильности ионов.

В любой заданной точке температурный градиент $\left(\frac{dT}{ds}\right)$, умноженный на теплопроводность, равен общему тепловому потоку. Согласно формуле (3), тепловой поток, выходящий из границы замерзания, минус поступающий из водной фазы, равен общему образованию тепла (LH) на границе замерза-

ния, умноженному на скорость распространения фронта кристаллизации $\frac{db}{dt}$.

Следует отметить, что как анализ фронта кристаллизации с его большим объемом скрытой теплоты, так и анализ процессов теплопроводности и теплоемкости замороженной и незамороженной воды требует зачастую привлечения довольно сложных дифференциальных уравнений. Если предположить, что система вначале уравновешена в точке замерзания и тем самым исключена возможность какого-либо вклада тепла в формирование фронта кристаллизации, и если пренебречь теплоемкостью льда, то можно получить различные выражения уравнений. В случае одномерной системы, где линия кристаллизации распространяется по фронтальной плоскости в образец произвольных размеров, уравнение (3) приобретает вид

$$K_t \frac{dT}{ds} = LH \frac{db}{dt}, \qquad (4)$$

которое при временном интегрировании будет выглядеть так:

$$b = \left(\frac{2K_t \Delta T}{LH} t\right)^{\frac{1}{2}}, \qquad (5)$$

где b — расстояние линейного распространения границы; T — температурный градиент между внешней поверхностью образца и границей замерзания, K_t — теплопроводность, LH — скрытая теплота льдообразования.

Анализ двухмерных и трехмерных моделей может быть проведен таким же образом, за исключением того, что в этом случае используются дополнительные коэффициенты. Если при расчетах игнорировать теплоемкость льда, то уравнение двухмерной цилиндрической модели будет иметь следующий вид:

$$\frac{2K_t \Delta T}{LH} t = \frac{1}{2}[r^2 - (r-b)^2] - (r-b)\ln\frac{r}{r-b}, \qquad (6)$$

где r — радиус цилиндра.

В случае трехмерной сферической модели может быть получено выражение

$$\frac{2K\Delta T}{LH} t = b^2 - \frac{2}{3} r b^3. \qquad (7)$$

Следует отметить, что в приведенных выше теоретических расчетах имеется существенная ошибка, связанная с тем, что в них не учитывалась теплоемкость замороженной части образца и ее влияние на температурный градиент. Указанные выше расчеты были проведены для «чистых», идеальных образцов воды, подвергнутых замораживанию. Что касается процессов кристаллизации в биологических объектах, то подобного рода исследования пока не проводились.

Экспериментальная часть. В лаборатории Меримена [567] были проведены эксперименты по замораживанию и оттаиванию моделей льда прямоугольной, сферической и цилиндрической формы с целью определения температурных профилей при замерзании и оттаивании и установления связи между скоростями замораживания и размерами кристаллов. Замораживание проводилось в 7%-ном растворе крахмала, поскольку такой раствор обладает достаточной вязкостью для устранения конвекции тепла, а также имеет то преимущество, что при замерзании крахмал концентрируется на границе раздела кристалла льда и после оттаивания оставляет губчатую матрицу, которую можно использовать для измерения размеров кристаллов. Растворы крахмала замораживались в контейнерах необходимой формы, термопары размещались с интервалами 1 *см* вдоль линии, перпендикулярной продвигающемуся фронту льда.

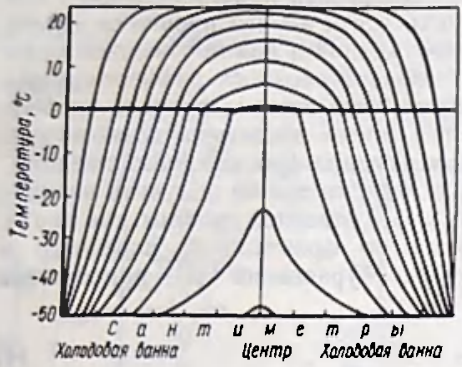


Рис. 35. Температурные профили, полученные в сферической модели крахмального геля через 6-минутные интервалы.
Объяснение в тексте.

На рис. 35 представлены температурные кривые, демонстрирующие фронтальное распространение замораживания в образце определенной толщины. Кривая, имеющая наиболее крутой и быстрый излом, получена при термографическом измерении ближайшей точки замораживания; верхняя кривая показывает температуру, зарегистрированную на конце образца, наиболее отдаленного от фронта распространения холода. Обращает на себя внимание отсутствие плато в различных положениях образца при прохождении через точку замерзания до тех пор, пока не закристаллизуется весь образец.

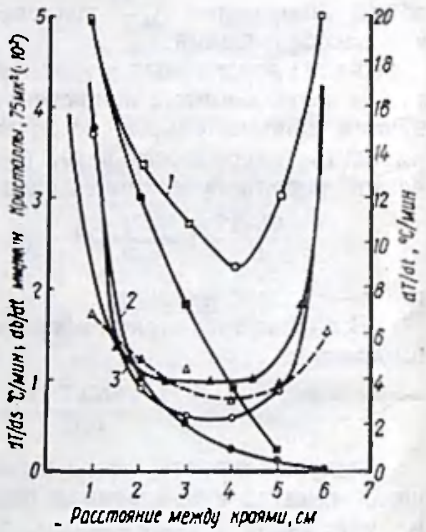


Рис. 36. Распределение кристаллов льда по радиусу замороженной сферической модели по данным скорости падения температуры образца после замораживания и скорости продвижения границ кристаллизации [567].
Объяснение в тексте.

На рис. 36 представлены срезы, сделанные через одинаковые интервалы в блоке крахмала. По мере углубления в образец размер кристаллов увеличивается. В цилиндрической модели фронт кристаллизации распространяется от ее поверхности (рис. 37). Особенностью кривых *1*, *2*, *3* на рис.36 является отсутствие на протяжении всего эксперимента плато в точке замерзания. Тенденция к образованию плато наблюдается лишь в случае приближения границы замерзания к центру образца. Причина этого явления становится понятной при рассмотрении графика, на котором данные (рис. 37) нанесены как ряд температурных профилей через равные интервалы времени. Эти кривые, отображающие температурные градиенты, показывают, что теплота из внутренней части образца мигрирует через незамороженную часть вдоль границы кристаллизации и элиминирует через замороженную поверхность. В результате этого температура незамороженного внутреннего участка, приближаясь к точке замерзания, падает по мере того, как к ней приближается фронт кристаллизации, после чего наступает кристаллизация незамороженной внутренней части образца. Следовательно, плато, наблюдаемое часто на температурной кривой, не обязательно связано со временем, необходимым для завершения кристаллизации. Наоборот, оно может просто отображать период уравновешивания до замерзания — явление, обычно не наблюдаемое вблизи поверхности образца.

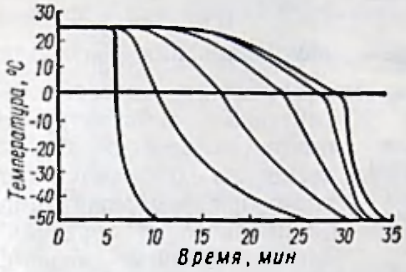


Рис. 37. Температурные кривые срезов крахмала, полученные с помощью термопар, расположенных на расстоянии 1 *см* друг от друга по радиусу замораживаемого среза крахмала в металлическом стаканчике диаметром 10 *см* (567).

Объяснение в тексте.

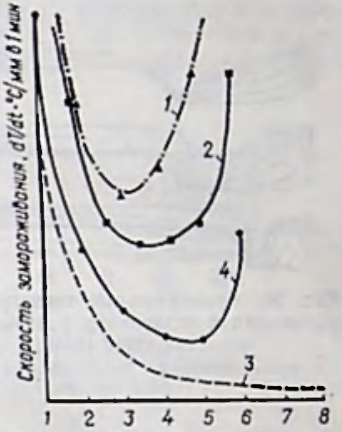


Рис. 38. Сравнительные графики скоростей падения температуры после замораживания $\left(\frac{dT}{dt}\right)_t$ для трех геометрических моделей [567]:

1 — сферической; *2* — цилиндрической; *3* — прямолинейной (внутренняя сторона); *4* — прямолинейной (наружная сторона).

Из рис. 38, на котором приведена локализация некоторых функций крахмала до и после замораживания, видно, что между возникновением ассоциатов льда, скоростью распространения фронта

промерзания и скоростью падения температуры после замораживания существует тесная взаимосвязь. Несколько менее явно это выражено для такой величины, как температурный градиент. Связь между размером кристалла и температурным градиентом не обязательна, поскольку в определенной ситуации резкий температурный градиент можно искусственно поддерживать и очень медленно продвигать по фронту. Это приводит к медленному замораживанию и образованию больших кристаллов льда.

Аналогичные данные представлены на сферической модели (рис. 39), где замораживание идет вглубь со всей поверхности сферы. Как и в предыдущих моделях, плотность ассоциатов льда связана как со скоростью падения температуры после завершения кристаллизации $\frac{dT}{dt}$, так и со скоростью распространения фронта замораживания $\frac{db}{dt}$. Для сферических моделей характерно температурное плато, которое по форме несколько отличается от плато при замораживании цилиндрических образцов. Такое различие связано, очевидно, прежде всего с измененным характером отношения поверхность — объем в незамороженной части образца. В случае цилиндрической модели это отношение изменяется со скоростью $\frac{2}{r}$, т. е. наблюдается постоянное уменьшение отношения незамороженного объема, теряющего теплоту, к фронту кристаллизации, через которую это тепло отдается. В сферической модели это отношение изменяется и достигает $\frac{3}{r}$, т. е. повышается тенденция к теплоотдаче внутренней замороженной части еще до приближения фронта промораживания. На рис. 38 и 39 сравнивается общая форма кривых $\frac{d^2T}{dt^2}$ для различной геометрии льда. Снижение теплоемкости незамороженного центра образца и уменьшение границы промерзания в цилиндрических и сферических образцах приводят к увеличению скорости падения температуры после замерзания и по мере приближения границы кристаллизации к центру пробы. Во всех случаях при замораживании высокая теплопроводность внешней замороженной оболочки и сравнительно слабая проводимость внутренних непромороженных центральных частей способствует быстрому падению температуры после достижения фронта кристаллизации. При оттаивании наблюдаются процессы противоположного характера.

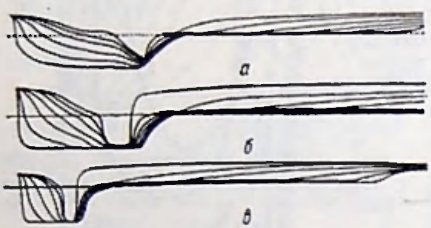


Рис. 39. Сравнительные термограммы замораживания и оттаивания различной формы образцов [561]:
а — прямолинейной; б — цилиндрической; в — сферической.

Приведенные на рис. 38 и 39 кривые зависимости температуры от времени оттаивания и замораживания для прямоугольных, сферических и цилиндрических моделей свидетельствуют о том, что за счет высокой теплопроводности замороженной массы теплота довольно быстро распространяется по всему объему образца и сразу же после погружения в баню уравновешивается в точке плавления. После прохождения точки плавления оттаивание с помощью слабо проводящей массы развивается по мере медленного поступления тепла. Наблюдаемое в этом случае плато в точке плавления отображает не продолжительность процесса оттаивания, а равновесие в связи с распространением фронта оттаивания. Тенденция к раннему возникновению плато в цилиндрических и сферических моде-

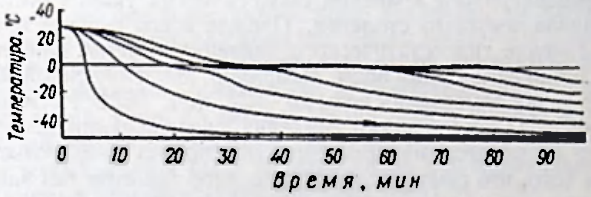


Рис. 40. Сравнительные графики скоростей падения температуры после замораживания мышцы кролика трех геометрических форм [561].

лях зависит не только от геометрии образца, но и от разности в процессе теплопроводности между замороженной и незамороженной частями образца. Экспериментальные изменения этих величин показали, что замороженные и незамороженные растворы крахмала обладают теплопроводностью соответственно 0,0036 и 0,0024 $\frac{кал \cdot см/сек}{см^2 \cdot °C}$. Пользуясь такими же методами, как и для крахмала, Меримен [567] измерил теплопроводность печени кролика. Было установлено, что в случае незамороженных тканей она соответствует 0,0028 $\frac{кал \cdot см/сек}{см^2 \cdot °C}$, при замораживании эта величина снижается до 0,0026 $\frac{кал \cdot см/сек}{см^2 \cdot °C}$, т. е. соотношение двух показателей равно 0,9, в то время как для крахмала оно находилось в пределах 1,5. Следовательно, в отличие от раствора крахмала эта ткань в замороженном состоянии является более слабым проводником тепла, чем в незамороженном. На рис. 40 показана кривая времени и температуры, полученная по мере фронтального продвижения процесса замораживания на образец мышцы кролика. Она несколько напоминает кривую на рис. 39, полученную при замораживании крахмала. Вместе с тем изменение относительных проводимостей замороженных и незамороженных образцов приводит к повышенной тенденции образования плато, что несколько напоминает кривые оттаивания на рис. 40.

Анализируя данные по изучению особенностей роста кристаллов льда, можно сделать ряд выводов, имеющих определенное значение для теории и практики криобиологии.

1. Кристаллы растут быстрее в направлении наиболее разбавленного расплава. Они не обязательно должны иметь традиционную кристаллическую форму, а могут быть любой формы в зависимости от матрицы, на которой они формируются.

2. Хотя кристаллы могут расти в виде игл, они, вероятно, никогда не пронизывают структуры клетки на пути своего формирования. Вместе с тем кристалл, образованный в биологической структуре, может разрушить ее лишь благодаря своему геометрическому росту.

Высокое давление. Использование высоких давлений для целей низкотемпературного хранения биологических тканей было описано в начале текущего столетия. Прежде всего было установлено, что увеличение гидростатического давления заметно влияет на величину точки замерзания воды. Например, давление силой 2045 *атм* снижает точку замерзания воды до —22° [см. 567]. Исследовались также эффекты повышенного давления при снижении температуры среды до ее замерзания. Большинство данных свидетельствовало в пользу того, что само по себе повышенное давление без замораживания оказывает отрицательное действие на клетки крови. Например, уже при давлении 3000—5000 *атм* наблюдался гемолиз эритроцитов. Более высокое давление (порядка 10 000 *атм*) вызывало моментальную коагуляцию крови при комнатной температуре, что связано, как считали Бриджмен и соавторы [180], с формированием необычной формы льда (лед-IV). Эти исследователи наблюдали также прогрессивную денатурацию карбоксигемоглобина, который хранился 15—113 *ч* при комнатной температуре и давлении 9000 *атм*. В опытах Лорана и соавторов [482] было установлено, что цитратная кровь, хранившаяся 7 дней при давлении 1500 *атм*, подвергается гемолизу.

Давление 1020 *атм* при температуре +4 и —8° также вызывало гибель к третьему дню 50% эритроцитов как при одной, так и при другой температуре. Исследовалось также поведение эритроцитов при хранении их при температуре +4 и —13° и давлении 1530 *атм*. Через 6 *ч* гемолиз составлял 50% общего числа клеток, а через 3 дня — 75%. Аналогичные результаты были получены Джесменом с соавторами [392], которые изучали структуру эритроцитов, хранившихся при давлении 1500 *атм* и температуре —15°. Было выяснено также, что замораживание при давлении 2050—3400 *атм* не только вызывало полный лизис эритроцитов, но и денатурацию гемоглобина. В экспериментах, описанных Куртисом с соавторами [230], кровь замораживали в герметических контейнерах при давлении 2000 *атм*, что снижало температуру массы до —18°. Оказалось, что при таких условиях через 24—36 *ч* эритроциты и гемоглобин подвергались коагуляции и превращались в однородную коричневую массу. Вместе с тем в отдельных экспериментах, проведен-

ных с гепаринизированной цельной кровью, хранящейся при комнатной температуре на протяжении одного часа, не удалось установить каких-либо изменений при использовании давления порядка 3000 *атм* [567]. Имеются сообщения об инактивирующем действии давления в пределах от 3 до 20 000 *атм* на различные вирусы, бактериофаги, бактерии, ферменты, токсины, глобулиновые белки и др. Оказалось также, что некоторые виды животных клеток весьма чувствительны к действию давления. Например, было показано, что давление 3000 *атм* в течение 3 *сек* на клетки кожи цыпленка и конъюнктивы человека вызывает гибель 68% клеток. При этом установлено, что выживаемость обратно пропорциональна величине давления и экспозиции. Далее, в указанных выше опытах с клетками кожи цыпленка и конъюнктивой человека эти объекты были подвергнуты такому же гидростатическому давлению, но только в тот момент, когда температура среды инкубации достигла 0°, вследствие чего через 3 *сек* точка замерзания раствора снизилась до —20°. После этого давление прекращали и замораживание продолжали обычным путем. Судя по данным термографии, полное промораживание такой взвеси происходило через 100 *сек*, причем жизнеспособность опытных клеток была гораздо ниже, чем контрольных, т. е. замороженных при отсутствии давления [863].

Тейлор, очевидно, один из первых использовал высокое давление для ускорения оттаивания замороженных биологических объектов. При использовании давления 3000 *атм* при температуре —5° в некоторых случаях был получен очень высокий процент выживших клеток. Иногда эти результаты были менее удачными. Согласно этим данным, было установлено, что давление 2045 *атм* при температуре —22° способствует определенным перестройкам в кристаллической решетке льда, причем образуется так называемый лед-III. При весьма кратком упоминании вопроса об использовании высоких давлений авторы преследовали цель не полного раскрытия проблемы, а имели в виду обратить внимание читателей на весьма интересную и перспективную область исследований в криобиологии, связанную с применением этих давлений для разработки методов низкотемпературной консервации биологических объектов.

Глава III

ДИНАМИКА ПРОЦЕССОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

В предыдущих разделах были рассмотрены особенности процессов замораживания в относительно чистых водных системах, в которых структурные препятствия для реализации процессов кристаллизации фактически отсутствуют. Если рассматривать эти же физические процессы при замораживании биологических объектов, то видно, во-первых, что в них распространение льда ограничивается рядом клеточных структур, таких как мембраны, гранулы, биомакромолекулы; во-вторых, реакция этих объектов на проникновение льда вызывает сложные физиологические и биохимические процессы. Для анализа возникающих указанных процессов обычно используют такие методы, как непосредственное микроскопирование замораживаемых и отогретых проб в обычном микроскопе с низкотемпературной приставкой, электронномикроскопические исследования, биохимические, биофизические и другие методы исследования.

Следует отметить, что при замораживании биологических жидкостей образуются в общем такие же продукты кристаллизации, как при охлаждении чистых систем растворов, характер которых зависит от скорости охлаждения и концентрации жидкости. Например, плазма крови или мышечный сок при нормальной концентрации и медленном замораживании кристаллизуются как разбавленные водные растворы, образуя гексагональные формы льда.

При более быстрой скорости замораживания (—10 и —150°) до низких температур образуются ледяные структуры типа неправильных дендритов (рис. 18, *б*). При повышении концентрации этих жидкостей за счет вымораживания чистой воды появляются многочисленные колонки льда, радиально расходящиеся от центра кристаллизации (рис. 18, *в*). Дальнейшее повышение концентрации растворенных веществ в клетке при высокой скорости замораживания сопровождается кристаллизацией с образованием быстро исчезающих сферулитов (рис. 18, *г*). Как и в случае «чистых» замороженных систем, при высокотемпературной рекристаллизации такие сферулиты частично мутнеют, т. е. фазовые изменения в биологических жидкостях имеют много общего с замораживанием таких относительно простых систем, какими являются водные растворы. Весьма простую модель для изучения физико-химических

процессов в биологических системах представляют собой изолированные клетки. В частности, в этом отношении могут быть использованы микроорганизмы, исследование которых более удобно, поскольку они представляют собой клетки с постоянными параметрами, что позволяет проводить хороший их качественный анализ.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КЛЕТКАХ ПРИ СУБНУЛЕВЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Как известно, скорость всех физических, химических и биологических процессов зависит от температуры. Исключением в этом отношении можно считать ядерные процессы и комбинирование свободных радикалов. В живых системах происходят сотни и тысячи энзиматических и других реакций, эффективность которых зависит от их временной и пространственной последовательности. Поскольку температурные коэффициенты и энергия активации этих реакций неодинаковы, то понижение температуры почти всегда снижает это равновесие и, таким образом, видоизменяет функцию клетки. Однако по отношению к биологическим системам это положение может быть применимо весьма дифференцированно. Например, снижение температуры тела гомойотермных животных на 10 или 20° является летальным, так как при этом резко изменяется скорость и направленность метаболических реакций. Вместе с тем у животных, температура тела которых зависит от температуры окружающей среды (например, рептилии), такое же охлаждение вызывает обратимые изменения в тканях и органах и даже при нулевой температуре не наступает летальный исход, если клетки и окружающая их среда не промерзают (табл. 3).

Таблица 3

Максимально низкие температуры, при которых сохраняется жизнеспособность некоторых биологических объектов [541]

Материал	Температура выживания, °С	Автор
Дрожжевые клетки	—16	[123, 537, 538]
Насекомые	—30	[648, 649]
Некоторые рыбы	—1	[715]
Амебы	—5	[204]
Моллюски	до —5	[401]
Яйца морского ежа	—8, —15	[129, 130]
Клетки растений	—10	[701]

Вместе с тем снижение температуры не всегда безвредно для некоторых организмов, причем степень криоповреждений в значи-

тельной мере зависит от скорости охлаждения. Классическим примером повреждения, вызванного снижением температуры в результате так называемого теплового удара, являются бычьи сперматозоиды, которые легко разрушаются при быстром охлаждении, и, наоборот, сохраняют свою структуру при медленном замораживании. Быстрое замораживание бактерий, находящихся в фазе логарифмического роста, снижает их выживаемость в десятки тысяч раз по сравнению с организмами, пребывающими в стационарном положении [317, 364, 570, 778, 779]. Интенсивность «теплового удара» зависит от концентрации клеток и среды, в которой суспендированы и растут клетки во время охлаждения. Некоторые среды повышают повреждение, другие — полностью его исключают. Повреждение после охлаждения обнаруживается не сразу, а по истечении некоторого времени после экспозиции, причем при температуре 0° оно имеет тенденцию увеличиваться. Необходимо отметить, что хотя имеется некоторая информация о механизмах криоповреждений, связанных главным образом с нарушением проницаемости мембран, скорость и механизм «теплового удара» остаются очень мало изученными. Мазур [541] считает, что этот процесс вносит относительно небольшой вклад в общее криоповреждение клетки.

Переохлаждение и замораживание клеточной воды. По мере снижения температуры клетки и окружающей ее среды до 0° уменьшается не только скорость метаболических реакций, но и происходит замерзание тканевой воды. Как известно, все метаболизирующие клетки окружены определенным слоем воды. Как показывают многочисленные исследования, эта внешняя вода клетки замерзает раньше, чем содержимое клетки. Более того, даже когда клетки уже окружены льдом, их внутреннее содержимое остается некристаллизованным при температуре —5°, а иногда и —10°. Это происходит потому, что практически во всех клетках общая концентрация осмотически активных ионов и молекул растворенных веществ в протоплазме весьма гетерогенна, и их точка замерзания, как правило, всегда ниже —2°. Некоторые примеры точек замерзания воды в биологических объектах приведены в табл. 4. Следовательно, при кристаллизации внешней воды тканей внутриклеточная вода сильно переохлаждается. В переохлажденной воде более высокое давление паров, и она обладает значительно большей свободной энергией, чем внеклеточный лед. Если в такой системе исключить некоторые дополнительные факторы, препятствующие развитию вышеуказанных процессов, то давление пара должно возрастать с понижением температуры согласно уравнению Клаузиса — Клайперона

$$\frac{d \ln p_L/p_S}{dT} = \frac{-L_f}{RT^2}, \qquad (8)$$

где p_L и p_S — давление пара переохлажденной воды протоплазмы и льда; L_f и R — молярная теплота плавления и постоянная газа; T — температура в градусах Кельвина.

Проинтегрированная (аппроксимированная) форма этого уравнения имеет вид

$$\ln p_L/p_S = \frac{L_f}{R}\left(\frac{T_f - T}{TT_f}\right), \qquad (9)$$

где T_f — точка замерзания протоплазмы.

Свободная энергия плавления в молекулярном выражении может быть представлена

$$\Delta F = RT \ln p_L/p_S, \qquad (10)$$

откуда

$$\Delta F = \frac{L_f (T_f - T)}{T_f}. \qquad (11)$$

Однако такие различия в разности свободной энергии для внутриклеточной переохлажденной воды и внешнего льда не исключают

Таблица 4

Осмомолярность и точка замерзания воды в биологических объектах [541]

Объект исследования	Осмомолярность	Точка замерзания, °С	Автор
Клетки человека	0,3	−0,56°	[541]
Дрожжевые клетки	0,5	−1°	[539, 540, 543, 544]
Бактерии	1,0	−2°	[569, 572, 573, 721]

возможности того, что содержимое клеток может оставаться неопределенное время в переохлажденном состоянии, если биологические барьеры будут препятствовать уравновешиванию этих процессов до одинаковой скорости. Барьеры подобного рода могут возникнуть в биологических системах, замораживаемых при быстром охлаждении. При этом скорость формирования устойчивых зародышей центров кристаллизации будет увеличиваться по мере снижения температуры, а скорость их роста будет повышаться значительно медленнее. В результате быстрого охлаждения удается перевести воду в некое нестойкое состояние, при котором пока закончится рост кристаллов, температура снизится настолько, что предотвратит рост кристалла. Эта температура обычно обозначается как температура преобразования стекла, а, по Джонес [396], как температура, при которой вязкость жидкости увеличивается более чем на 10^{13} *пуаз*.

Изучение поведения замороженных растворов желатина [520, 521, 553, 554, 562, 563] методом рентгеновской дифракции показало, что при сверхбыстром их замораживании начинают исчезать пики дифракции. Это свидетельствует о переходе воды в стекловидное состояние, причем максимальная температура, при которой такая стекловидная масса становится устойчивой, повышается с увеличением концентрации желатина. Однако метод дифракции рентге-

новских лучей способен определять кристаллы льда размером не менее 20 Å в диаметре, поэтому исчезновение дифракционных пиков вовсе не является абсолютным доказательством отсутствия в такой системе субмикроскопических кристаллов льда, т. е. не исключает того, что вся вода кристаллизуется в субмикроскопические образования. Однако в клетках и тканях биологических систем вопрос о возможности витрификации воды еще более сложен.

Некоторые электронномикроскопические наблюдения показали, что при замораживании срезов тканей при температуре —100° в некоторых случаях определяются пустоты и впадины в протоплазме, которые, как считают, являются ложами бывших здесь кристаллов льда. Однако в ряде случаев такие впадины в клетках отсутствуют. Поэтому отсутствие впадин в клетке еще не означает, что формирование кристаллов льда в их протоплазме не происходило [578, 669]. Таким образом, при сверхбыстрой скорости охлаждения вода живых клеток может находиться, во-первых, в переохлажденном состоянии при весьма низких температурах, во-вторых, пребывать в мелкоструктурном неустойчивом состоянии, называемом ранее витрификацией.

При более умеренной скорости замораживания внутриклеточная вода не остается долгое время в переохлажденном состоянии, около 90% ее замораживается при —20°. Это было доказано калориметрическими методами определения [790] части клеточной воды дрожжей *E. coli*, замороженных при различной температуре [767, 847], а также методом дифференциального теплового анализа при отогреве этих клеток. Интересно, что большая часть клеточной воды замерзает и тогда, когда они подвергаются охлаждению при сравнительно медленной скорости замораживания (50—100° в минуту).

Одной из неясных проблем, связанных с замораживанием воды в клетке при —20°, является вопрос, остается ли незамороженная вода при этой температуре в переохлажденном свободном состоянии или она представляет собой фактически «связанную воду». Различие в таких формах воды заключается в том, что у переохлажденной воды энергия активации значительно выше (т. е. более высокое давление паров), чем у льда или у водного раствора, имеющего равновесное давление пара со льдом. Так называемая связанная вода — это система, активность которой значительно ниже, чем активность переохлажденной воды за счет наличия в ней растворенных веществ. Бланшар [168] считает, что вода в связанном состоянии не может существовать, и те 10% незамороженной остаточной воды в клетке представляют собой воду, которая остается неуравновешенной со льдом, являясь, по сути, переохлажденной водой. Поскольку при замораживании 90% воды клетки, как правило, кристаллизуются, приведенные выше данные концентрации Бланшара должны предусматривать наличие каких-то барьеров, которые, хотя и не абсолютно, но все же блокируют диффузию паров в сторону как образования льда, так и продвижения фронта льда по направлению к переохлажденной воде клетки. Очевидно, наличие

внутриклеточных биомакромолекул и мембранных барьеров в значительной мере тормозит также спонтанное возникновение центров кристаллизации в переохлажденной воде. Однако указанные выше барьеры, изменяющие поведение внутриклеточной воды при замораживании, имеют, очевидно, относительное значение в процессах кристаллизации, поскольку, например, при вакуумном высушивании, когда внешнее давление паров снижается до нуля, вся остаточная связанная вода клетки устраняется.

Измерение содержания воды в биологических материалах (уравновешенных при постоянной температуре в вакууме) при различном внешнем давлении паров довольно четко свидетельствует о том, что 90% вымерзающей воды имеет активность выше 0,8 (активность чистой воды равна 1), а 10% незамерзающей связанной воды, наоборот, имеет более низкую активность — от 0,8 до 0. Если принять общее содержание воды в клетках дрожжей за стандарт, то 100 *г* таких клеток содержит примерно 70 *г* замерзающей воды и 30 *г* твердого вещества. Соответственно этому остаточные 10% незамерзающей воды в весовых отношениях составляют около 0,25 *г* воды на 1 *г* твердого вещества. Измерения адсорбционных изотерм показывают, что активность внешних слоев воды в твердых веществах при таком ее содержании равна 0,6—0,9, т. е. значительно ниже нормальной величины.

Это было показано как при исследовании цельных клеток [143, 721, 822, 828], так и ряда клеточных ингредиентов белков [190], целлюлозы [579], ДНК [278] и фосфолипидов [272].

Следовательно, можно считать установленным, что 10% остаточной незамороженной воды в клетках представляют собой не обычную переохлажденную воду, а систему, связанную с клеточными биомакромолекулами и мембранами связями различной интенсивности. В зависимости от геометрии биологического объекта замораживание «чистой» несвязанной воды в клетке обычно длится несколько секунд или минут. Например, калориметрические исследования Вуда и соавторов [847, 849], проведенные на дрожжах, свидетельствуют о том, что для этого требуется примерно 20 *мин* — время, в течение которого происходит уравновешивание замороженного материала при данной температуре. Метод дифференциального теплового измерения на этих же клетках показал, что 80% клеточной воды замораживается примерно через 30 *мин* независимо от того, охлаждаются ли клетки до температуры ниже —40° со скоростью 30 *сек* либо 30 *мин* [539—541].

Таким образом, хотя цитоплазма клеток вначале переохлаждается, когда внешняя вода уже замерзает, разница в давлении паров, возникшая в результате такого переохлаждения, довольно быстро исчезает за счет промораживания 90% внутриклеточной воды. При этом, очевидно, внутриклеточная вода может вести себя по-разному: либо она замерзает внутри клетки, либо она покидает клетку в результате различий в давлении паров и замерзает вне клетки. В зависимости от реализации того или иного пути будут происходить

различные по своему характеру криоповреждения клеток в процессе низкотемпературного воздействия. Поэтому указанные выше проблемы имеют принципиально важное значение при изучении механизмов и факторов, предохраняющих либо, наоборот, разрушающих клеточные структуры при понижении температуры. Считают, что переохлажденная вода в клетке замерзает в результате либо

Таблица 5

Уровень переохлаждения разных клеток при формировании наружного льда и его отсутствии [541]

Клетки	Переохлаждение клеточной воды, °С		Метод удаления наружного льда	Автор
	в присутствии наружного льда	в отсутствие наружного льда		
Яйца морской свинки	от —6 до —10	—18—20	Взвешивание в силиконовом масле	[758]
Роговица кролика	—5—10	—5—10	Взвешивание в силиконовом масле	[758, 762]
Амебы	—5—8	—	Без взвешивания в растворе	[204]
Яйца морского ежа	—8	—15	Взвешивание в силиконовом масле	[130, 131]
Различные растительные клетки	—7	—20	Взвешивание в парафиновом масле	[129]
Клетки соединительной ткани человека	—	—15—20	С помощью эфиров фталата	[680, 681]
Личинки насекомых *	—10	—20—30*	—	[694, 695, 696, 697]
Листья капусты *	—13	—	На воздухе	[701, 702]
Дрожжи	—	—16	Переохлаждение в цельной суспензии	[537, 538, 540]
E·coli	—	—10	Переохлаждение в цельной суспензии	[539, 541]
Почки лимона *	—7	—12—18	На воздухе	[707]
Мышечные волокна лягушки	—10	—15	Взвешивание в парафиновом масле	[204]

* Животные и растения, находящиеся на открытом воздухе при пониженных температурах, обладают способностью регулировать образование наружного льда вокруг клеток с помощью специальных биохимических механизмов (переориентация метаболических реакций на синтез защитных белков, сахаров, низкомолекулярных нуклеиновых кислот и т. д.).

спонтанного, либо индуцированного внешним льдом образования центров кристаллизации.

Спонтанное внутриклеточное замораживание. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что внутриклеточная вода обычно замерзает не спонтанно, а в зависимости от распространения фронта внешнего льда. Данные табл. 5 указывают на то, что при замерзании внешней среды внутриклеточная кристаллизация происходит в интервале температуры —5—13°. Наоборот, когда внешняя

среда не содержит льда, замораживание воды внутри клетки происходит при более низких температурах. В некоторых случаях, например, при небольшом объеме клеточных суспензий, можно получать переохлажденную внеклеточную воду, замерзающую лишь при температуре —10 и —16°. Аналогичная ситуация наблюдается тогда, когда в качестве жидкости используются неводные растворы. Если воду заменить смесью масла, то в этих условиях клетки способны переносить более низкие температуры, чем при замораживании их в водной среде. Однако использование подобного рода приемов для дегидратации клеток вряд ли является целесообразным, поскольку при этом невозможно регулировать процесс дегидратации клеток, а также ограничить повреждение их внешних мембран.

Таким образом, становится ясным, что темп замораживания зависит от геометрического пространства, занимаемого водой в клетке. Изучение формирования центров кристаллизации и замораживания паров и малых капелек воды показывает, что подобного рода геометрические пространства могут сильно переохлаждаться, прежде чем они подвергнутся кристаллизации. Например, при отсутствии в растворе соединений, способствующих формированию ядер кристаллизации, капельки воды диаметром 1 *мм* — 1 *см* замерзают соответственно ниже —39 и —30° [292].

Ранее было установлено, что ряд органических соединений, распределенных в клетках, может явиться эффективным агентом образования зародышевых центров кристаллизации в переохлажденной воде уже при температуре выше —10°.

К таким веществам могут быть отнесены такие метаболически активные соединения, как α-феназин, метальдегид, стероиды, аминокислоты, пептиды и белки. Вместе с тем было отмечено, что быстрая спонтанная кристаллизация воды в клетке наступает только в том случае, если указанные выше соединения находятся в кристаллическом состоянии. В растворе эти соединения оказываются неэффективными [649].

В настоящее время показано, что для спонтанного формирования зародышевых кристаллов необходимо, по крайней мере, два условия: во-первых, вещество в растворе должно кристаллографически иметь сходство со льдом, во-вторых, оно должно располагать неустойчивыми положительными и отрицательными зарядами подобно конфигурации водородных связей льда.

Многие из указанных выше органических соединений кристаллографически не соответствуют структуре льда и их эффективность, очевидно, зависит в основном от расположения и числа водородных связей, в которых расстояния между кислородом и водородом очень подобны таковым у льда. Поскольку большинство структурных белков клеток, как правило, не находится в растворенном состоянии, то следует думать, что они могут быть активными пунктами формирования центров кристаллизации. Вместе с тем можно убедиться (см. табл. 3), что клетки насекомых фактически не содержат эффективных соединений, вызывающих спонтанное формирование

таких центров в клетках. Причиной отсутствия этих процессов в клетках насекомых является чрезвычайно малый размер белковых и других индуцирующих соединений, которые, кроме того, почти не находятся в растворе.

Показано, что температура, при которой экзогенное соединение может вызывать замерзание воды, снижается с уменьшением размера этого соединения и становится еще ниже, если кристаллографически это соединение и структура льда очень подобны. При дальнейшем уменьшении размеров этого органического соединения гетерогенное формирование центров происходит при температуре до —40° и падает ниже по мере того, как размер его поверхности, на котором растет центр кристаллизации, становится ниже 100 Å. Вместе с тем если кристаллографически подобная структура и органический компонент очень отличаются друг от друга, то имеются основания думать, что кристаллы даже больших размеров в клетках будут малоэффективны в дальнейшем формировании центров кристаллизации.

Необходимо все же подчеркнуть, что формирование центров кристаллизации внутри клетки зависит от наличия в ткани внешнего льда. Однако на основании данных табл. 5 можно сделать вывод, что внутриклеточная жидкость остается переохлажденной при температуре —5° и в некоторых случаях при —13° даже в присутствии кристаллов внешнего льда. Следовательно, весьма эффективным барьером распространения ядер кристаллизации при —5 и —13° является мембрана клетки. Еще ранее с помощью микроскопических методов было установлено, что в переохлажденном мышечном волокне кристаллы льда после контакта с внешними льдинками распространяются главным образом вдоль его нити без образования внутриклеточных ядер кристаллизации. Когда замораживали сарколемму мышечного волокна, то наблюдалось быстрое образование внутриклеточных кристаллов льда [204]. Однако ниже определенных температур (приблизительно при —5 и —15°) мембрана клетки начинает терять способность препятствовать распространению льда.

Можно думать, что при резком понижении температуры происходят механические повреждения мембран, в результате чего возникают условия для внутриклеточного распространения льда. Не исключается, что мембрана может качественно не изменяться, но с понижением температуры усиливается способность льда проникать через мембрану, т. е. изменяются регуляторные механизмы, ответственные за ее проницаемость. Использование ряда таких констант, как проницаемость и диффузия обычной и изотопной воды через мембрану, доказало наличие в ней каналов с радиусом 3,0—8,5 Å, заполненных водой [236, 355, 356, 866]. Рассмотрим условия, при которых кристаллы льда будут проникать через такие каналы, если представить их себе в виде простого цилиндра (рис. 41). Очевидно, количество проникшего льда через поры будет эквивалентно точкам замерзания воды в канале. В этом случае угол контакта θ

между льдом и стенкой цилиндра будет определяться по фазному натяжению между льдом и водой (σ_{SL}), а также водой и стенкой капилляра (σ_{LC}) и между льдом и стенкой капилляра (σ_{SC}). Когда эти силы находятся в равновесии, то

$$\cos 0 = \frac{\sigma_{SC} - \sigma_{LC}}{\sigma_{SL}}. \qquad (12)$$

Поверхность раздела лед — вода с таким контактным углом будет сферической с целью уменьшения до минимума площади поверхности и максимального увеличения радиуса кривизны r. Такой радиус будет

$$r = a/\cos 0, \qquad (13)$$

где a — радиус канала. Соотношение между радиусом канала и точкой замерзания можно получить по методу Дэвиса [234]. Суть этого метода заключается в том, что если квоты dn льда переносятся при постоянных температурах, объемах и площадях поверхности из большей массы льда с плоской поверхностью в лед поры, то изменение свободной энергии будет

$$\partial F_s = (\mu_{sc} - \mu_s)\, dn, \qquad (14)$$

где μ_{sc} и μ_s — химические потенциалы льда соответственно в канале и плоском кристалле. Но это равно работе, необходимой для расширения поверхности раздела, или

$$\partial F_s = \sigma_{SC} dA_s = \sigma_{SC} d\,(2\pi a h_s) = 2\pi a \sigma_{SC} dh_s, \qquad (15)$$

где h_s — длина поверхности раздела лед — канал; A_s — ее площадь.

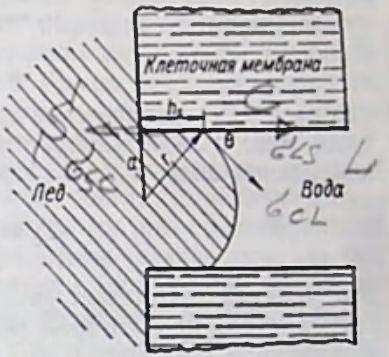


Рис. 41. Схематическое изображение каналов мембран клеток, способных пропускать лед внутрь клетки [541].

Увеличение объема льда (V_s) в том случае будет

$$dV_s = d\,(\pi a^2 h_s) = \pi a^2 dh_s \qquad (16)$$

либо

$$dV_s = v_s dn, \qquad (17)$$

где V_s — молярный объем льда.

Подставляя уравнения (16), (17) и (15) в уравнение (14), получим

$$(\mu_{sc} - \mu_s)\frac{a}{V_s} = 2\sigma_{SC}. \qquad (18)$$

Пересчитывая эти же показатели для переноса воды с плоской поверхностью в капиллярную, можно получить

$$(\mu_{lc} - \mu_l)\frac{a}{V_1} = 2\sigma_{LC}. \qquad (19)$$

где μ_{lc} и μ_l — химические потенциалы воды в капилляре; V_1 — молярный объем воды. Когда лед и вода в капилляре находятся в равновесии (т. е. в точке замерзания), то

$$\mu_l - \mu_s = \frac{2v_1(\sigma_{SC} - \sigma_{LC})}{a}, \tag{20}$$

допуская что $V_s \approx V_1$.

Подставляя уравнение (12) в уравнение (20), получим

$$\mu_l - \mu_s = \frac{2v_1\sigma_{SL}\cos\theta}{a}, \tag{21}$$

однако

$$\mu_l = \mu^0 + RT\ln p_L \tag{22}$$

и

$$\mu_s = \mu^0 + RT\ln p_S, \tag{23}$$

где p_L и p_S — равновесное давление пара над плоскими поверхностями воды и льда. Соответственно когда T является T_c, то точка замерзания воды в капилляре становится

$$T_c = \frac{2v_1\sigma_{SL}\cos\theta}{aR\ln p_L/p_S}. \tag{24}$$

Это уравнение означает, что если θ находится между 0 и 90°, то температура, при которой поверхность сферического льда и воды находится в равновесии, будет такой, при которой давление пара воды с плоской поверхностью превышает давление пара над льдом с такой же поверхностью, т. е. если она будет ниже 0°. Если уравнение (9), представляющее проинтегрированную форму уравнения Клаузиса — Клайперона, подставить в уравнение (24), то вместо $\ln p_L/p_S$ получим необходимое выражение для точки замерзания T_c воды в капилляре с радиусом a:

$$T_l - T_c = \Delta T = \frac{2v_1\sigma_{SL}T_l\cos\theta}{aL_f}, \tag{25}$$

где T_l — точка замерзания воды при $r = \infty$.

Это тождественно уравнению Кельвина, которое объединяет показатели давления пара (т. е. точку плавления) над сферической твердой поверхностью с соответствующим радиусом кривизны r. Согласно уравнению Кельвина

$$\Delta T = \frac{2v_1\sigma_{SL}T_l}{rL_f} \tag{26}$$

уравнение (13) может быть тождественно уравнению (25). Из параметров уравнения (25) только σ_{SL} и $\cos\theta$ представляют некоторые затруднения для оценки. Однако σ_{SL} было определено несколькими непрямыми путями, как это показано в уравнении (26) по r и ΔT [292]. Считают, что величина σ_{SL} лежит, вероятно, где-то между 10 и 25 *эрг/см*^{2} для поверхности раздела лед — чистая вода. При этом наиболее вероятной величиной будет значение примерно 17 *эрг/см*^{2} вблизи — 40° и около 10 *эрг/см*^{2} вблизи 0°. Если допус-

тить, что $\theta = 0°$ ($\cos\theta = 1$), то, подставляя соответствующие величины параметров в уравнение (25), получим

$$T_f - T_c = \Delta T \approx \frac{300}{a} = \frac{300}{r}, \qquad (27)$$

где a и r выражены в ангстремах.

Принимая температуру —10° за величину, при которой мембрана клетки теряет свою барьерную функцию и при которой замерзает вода в порах, можно получить радиус поры a, который равен примерно 30 Å, т. е. значительно выше ранее упомянутых размеров 3,0—8,5 Å, полученных на основании определений проницаемости. Означает ли это, что во время замерзания радиус пор в мембране увеличивается примерно с 8 до 30 Å, не совсем ясно, поскольку не выяснено, насколько правильно может быть использовано уравнение Кельвина для расчетов капиллярных систем воздух — вода с радиусом менее 30 Å. Уравнение (26) и его аналог уравнение (25) основаны на ошибочном предположении, что величины σ_{SL}, V_1 и L_f независимы от объема льда, поскольку размер мембранного канала приближен к молекулярным размерам. Кроме того, ошибка может быть допущена при экстраполяции параметров, использованных в системах вода — лед к таким же величинам липопротеин-связанной воды, содержащей в своем составе сложные компоненты. Указанная выше величина для пор радиусом 30 Å была получена при допущении, что контактный угол $\theta = 0°$. Любая величина, меньшая 90°, согласно уравнению (12) означает, что силы притяжения между водой и стенкой канала больше, чем между льдом и стенкой канала. Если θ в действительности будет 75° С, то $\cos\theta$ был бы около 0,25, а радиус поры, не препятствующий росту кристаллов льда при температуре —10° С, согласно уравнению (25) мог быть равен 7 Å, т. е. если $\theta = 75°$, то вместо уравнения (27) найдем

$$a \approx \frac{75}{\Delta T}. \qquad (28)$$

Полученные величины a можно сравнить с величинами, рассчитанными на основании скорости диффузии воды в клетках.

Кроме приведенных выше математических расчетов имеются, правда, непрямые экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что θ больше 0°. При измерении проницаемости воды в клетках асцитной опухоли и мочевого пузыря лягушки в зависимости от температуры были рассчитаны энергии активации для ее движения через мембраны. При этом было выяснено, что величины энтропии положительны и в два раза больше, чем те же показатели, характеризующие самодиффузию воды. Поэтому считают, что вода в порах мембран в обычных условиях является высокоупорядоченной, хотя по мере продвижения (тока) становится менее структурированной [355, 356, 366]. Высокая степень упорядоченности воды возможна, скорее всего, в том случае, если стенки поры выстланы неполярными бимолекулярными группировками липопротеина, входящего

в состав мембран. Действительно, было показано, что введение неполярных соединений в воду уменьшает ее энтропию, степень которой зависит от упорядоченности воды, а структура приближается к кристаллической решетке льда [296]. Полагают, что такое упорядочение воды в мембране связано прежде всего с тем, что начинают преобладать тетраэдрально расположенные системы вокруг молекул растворенного вещества [592, 594].

Поскольку вода в канальцах мембран больше приближена по своей структуре ко льду по сравнению с обычной водой, то вполне логично думать, что между свободной энергией поверхности раздела лед — каналец (σ_{SC}) и свободной энергией упорядоченной поверхности раздела вода — каналец (σ_{LC}) меньшая разница, чем между поверхностью раздела лед — каналец и обычной поверхностью вода — каналец. Если σ_{SC} приближается по величине к σ_{LC}, то контактный угол θ будет равен 90°.

Этим, собственно, и объясняется, каким образом обычная мембрана клетки может служить барьером для продвижения кристаллов льда внутрь клетки при температурах порядка —10° и в результате чего она теряет эту способность при более низких температурах. Как видно, мембрана содержит мелкие канальцы, заполненные высокоупорядоченной структурированной водой, кристаллизация которой наступает ступенчато, а ее фронт распространяется постепенно внутрь клетки в зависимости от понижения температуры. Считают, что с понижением температуры внутри клеток формируются сразу многочисленные, но рассеянные по всей мембране ядра кристаллизации, отчего клетка приобретает мутный вид. Поскольку канальцы, заполненные водой в мембранах клетки, не очень отличаются по своим размерам, то большинство из них обычно пропускает кристаллы льда внутрь клетки при определенной пороговой температуре.

Физико-химические механизмы дегидратации клеток при замораживании. По мере снижения температуры переохлажденной клетки она начинает подвергаться влиянию двух противоположно действующих факторов, направленных на восстановление нарушенного динамического равновесия в клетке. С одной стороны, более высокое давление пара внутренней переохлажденной воды обусловливает ее миграцию из клетки, с другой стороны, дальнейшее понижение температуры переохлажденной воды способствует спонтанному замораживанию или, вернее, формированию центров кристаллизации в результате контакта с внешним льдом. Этот процесс зависит от того, с какой скоростью клетка теряет воду; если это происходит быстро, то вода не подвергается сильному предварительному охлаждению и не замерзает. И, наоборот, если вода не может быстро покинуть клетку и равновесие давления паров нарушается, то она значительно переохладится и возможность ее замерзания повысится.

Исходя из ряда предположений, Мазур [539, 540] получил ориентировочные количественные выражения для величин переохлажден-

ной воды, остающейся в клетке, функции температуры, скорости охлаждения B, постоянной проницаемости воды в клетке k_g, температурного коэффициента b, первоначального молярного объема воды в клетке V_1, осмомолярности растворенного вещества n_2 и т. д. Суть этих расчетов заключается в том, что если температура переохлажденной клетки, находящейся в равновесии с окруженным льдом либо раствором, снижается, то отношение внешнего давления пара к внутреннему p_S/p_L изменяется в связи с температурой следующим образом:

$$\frac{d \ln p_S/p_L}{dT} = \frac{L_f}{RT^2} - \frac{d \ln x_1}{dT}. \qquad (29)$$

Это выражение напоминает уравнение (8), за исключением того, что оно содержит в правой части член, поясняющий изменение некоторой доли воды x_1, по мере того как вода покидает клетку в ответ на изменение градиента давления пара. Вместе с тем x_1 можно выразить как n_2 и V_1 (объем воды в клетке V) и получить уже другой вариант уравнения (29), а именно

$$\frac{d \ln p_S/p_L}{dT} = \frac{L_f}{RT^2} - \frac{n_2 V_1}{(V + n_2 V_1)V} \frac{dV}{dT}. \qquad (30)$$

Скорость, с которой вода покидает клетку, в свою очередь является функцией соотношения давления пара

$$\frac{dV}{dt} = \frac{kART}{V_1} \ln p_S/p_L, \qquad (31)$$

где t — время; A — площадь поверхности клетки. Наконец, постоянная проницаемости является обычно экспоненциальной функцией температуры при температуре выше 0°, и если допустить, что это соотношение такое же при субнулевых температурах, то можно получить

$$k = k_g e^{b(T - T_g)}, \qquad (32)$$

где k_g — постоянная проницаемости при температуре T_g и b — температурный коэффициент. Если скорость охлаждения постоянна, т. е. $dT/dt = B$, то уравнение (30), (31) и (32) можно решить, исключая t и p_S/p_L, и получить нужное выражение для объема внутриклеточной воды в зависимости от температуры, а именно:

$$Te^{b(T_g - T)} \frac{d^2V}{dT^2} - \left[(bT + 1)e^{b(T_g - T)} - \frac{ARk_g n_2}{B(V + n_2 v_1)} \cdot \frac{T^2}{V}\right] \frac{dV}{dT} = \frac{L_f A k_g}{Bv_1}. \qquad (33)$$

Следует отметить, что в этом уравнении имеются допущения и, следовательно, оно содержит ошибки. Главная из них — выбор правильной величины для температурного коэффициента константы проницаемости. Однако важным является то, что согласно этим расчетам при понижении температуры физико-химические процессы, протекающие в протоплазме, подчиняются закону Раульта (площадь мембраны остается постоянной и интактной во время охлаждения и она проницаема только для воды).

Числовое решение уравнения (33) при использовании соответствующих параметров по отношению к дрожжам — *Saccharomyces cerevisiae* при охлаждении со скоростью 1—10 000° в минуту показано на рис. 42. Кривая *5* отображает относительное содержание воды в клетке, медленно охлажденной на протяжении длительного времени. В этом случае равновесное давление пара будет постоянно поддерживаться за счет дегидратации. Видно, что при скорости охлаждения 1° в минуту эта кривая очень близко расположена к следующей кривой. С повышением скорости охлаждения вода в клетке значительно переохлаждается при температуре примерно ниже —10° (установлено путем измерения расстояния по горизонтали от точки на кривой до равновесной кривой). Поэтому можно предсказать, что дрожжи, охлаждаемые со скоростью 1° в минуту, не подвергаются внутриклеточному замерзанию, поскольку клетки посредством механизма дегидратации будут уравновешиваться до тех пор, пока температура не снизится до —10°. Наоборот, клетки, охлаждаемые со скоростью 100° в минуту и выше, будут замерзать внутри при температуре ниже —10°, так как они содержат по-прежнему значительную часть своего исходного объема переохлажденной воды. Наблюдения в световом микроскопе над медленно замораживаемыми дрожжами (1° в минуту) показывают, что в этом случае клетки сжимаются, признаков образования внутриклеточного льда не обнаруживается. Вместе с тем такие же клетки, охлаждаемые в сосудах с жидкой углекислотой и азотом с большой скоростью до температуры —78 и —196°, подвергаются либо небольшому сжатию, либо последнее отсутствует, однако клетки при этом, как правило, внутри содержат кристаллы льда [588, 591].

Электронномикроскопические наблюдения подтверждают, что клетки дрожжей, подвергавшиеся очень быстрому замораживанию в жидком азоте, сохраняют в основном нормальную форму и размер [537, 538, 583, 590, 591]. Как отмечалось, около 90% клеточной воды дрожжей замерзает при температуре —20°. Если вся вода клеток при понижении температуры выходит из клеток и замерзает вне ее, то можно рассчитать, что клетка будет уменьшаться в объеме примерно на $^1/_3$ своего первоначального размера. Именно такое уменьшение объема наблюдается в дрожжевых клетках, когда они замораживаются со скоростью 1° в минуту, и поэтому при такой скорости замораживания внутриклеточная кристаллизация не происходит. Наоборот, клетка, охлажденная со скоростью более 50° в минуту, не способна уменьшить свой объем на эту величину и содержит всегда кристаллы льда внутри. Клетки, охлаждаемые со скоростью примерно 100° в минуту, содержат примерно 34% своей первоначальной воды, что хорошо согласуется с выводами уравнения (30), в котором рассчитывались параметры для сверхпереохлажденных дрожжей до температуры —15° (рис. 42, 43).

Было также показано, что клетки дрожжей, медленно охлажденные до —33° либо ниже этой температуры, обладают более слабой чувствительностью к рентгеновскому облучению, в то время как

быстро замороженные клетки такой способностью, наоборот, не обладают [847, 849]. Эти наблюдения совпадают с такой точкой зрения, что вода покидает клетки при медленном охлаждении и свободные радикалы образуются главным образом во внешнем льде и после оттаивания рассеиваются, не вызывая патологических изменений в клетках. При быстром охлаждении свободные радикалы захватываются льдом и фиксируются внутри клеток и поэтому сохраняют способность вызывать внутриклеточные повреждения после оттаи-

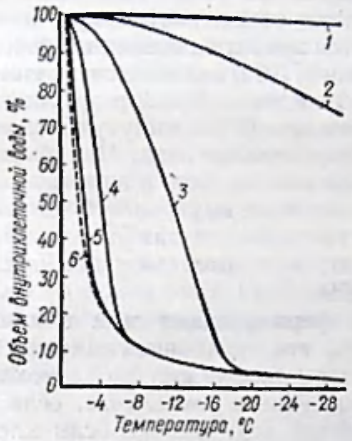


Рис. 42. Термограммы содержания внутриклеточной переохлажденной воды, остающейся в сферических клетках диаметром 1,6 и 25 *мк* при различных субнулевых температурах [540—543]:

1 — скорость охлаждения 10 000° в минуту; *2* — 1000°; *3* — 100°; *4* — 10°; *5* — 1° в минуту; *6* — длительное охлаждение со скоростью менее 1° в минуту.

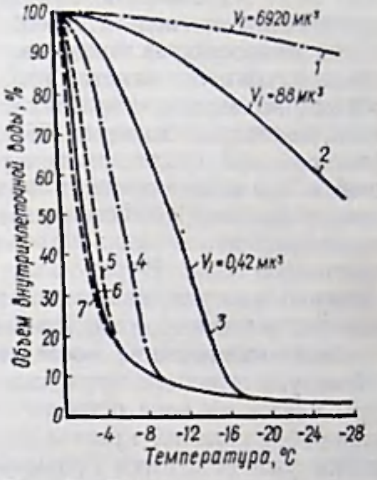


Рис. 43. Кривые зависимости содержания переохлажденной внутриклеточной воды в дрожжевых клетках, замороженных при определенных скоростях [544]:

1, 2, 3 — охлаждение со скоростью 1000° в минуту; *4* — со скоростью 10°; *5* — 1° в минуту; *6* — время эквилибрации; V_i — объем внутриклеточной воды.

вания. Следовательно, на основе физико-химического поведения отдельных параметров, выведенных в уравнении (30), можно прогнозировать полуколичественное образование внутриклеточного льда либо его отсутствие. Биологические параметры, которые влияют на решение этого уравнения,— это главным образом V_i (первоначальный объем клеточной воды), k_g (постоянная проницаемости воды), n_2 (скорость охлаждения) и b (осмотическая активность растворенных веществ). Влияние колебаний V_i (следовательно, и отношения $\frac{A}{V_i}$) в сферических клетках показано на рис. 43. Эти данные свидетельствуют о том, что большие клетки, по сравнению с клетками небольших размеров, будут содержать больше переохлажденной воды при данной скорости охлаждения и температуре

и поэтому, очевидно, будут подвергаться внутриклеточной кристаллизации. Если константы проницаемости, показанные на рис. 43, увеличить в 10 раз, то кривые зависимости содержания внутриклеточной воды и скорости замораживания можно было бы использовать для клеток большего размера. Однако уравнение (33) для последующих расчетов мало применимо, поскольку некоторые величины параметров неизвестны для большинства клеток и особенно микроорганизмов. Тем не менее это уравнение может с успехом быть использовано при медленном замораживании для клеток простейших, поскольку их объем существенно не изменяется при таких скоростях охлаждения. Однако объем клеток при низких температурах уже заметно изменяется при использовании в качестве объекта исследования высших растений [129], лейкоцитов, клеток печени, некоторых бактерий [551а, 553]. Клетки *E. coli* и другие виды бактерий при медленном замораживании (1° в минуту) изменяют свой объем и не содержат внутри кристаллов льда. При быстром замораживании (1000° в минуту) такие клетки, хотя и не изменяются в размере, однако содержат многочисленные внутриклеточные поля кристаллов льда. В результате существования такого механизма медленно замораживаемые клетки подвергаются меньшим разрушениям, чем быстро охлаждаемые [590, 591].

Физико-химические последствия формирования льда в клетке. Сейчас уже довольно четко показано, что при понижении температуры клеток их вода остается некоторое время сильно переохлажденной, без явлений кристаллизации, даже в том случае, если вне клетки уже находится сформированный лед. Однако если клетки охлаждаются медленно до низких и ультранизких температур, то это неустойчивое положение исчезает — значительная доля воды в клетке быстро замерзает.

Как известно, ниже температуры —20° около 90% воды внутри клетки кристаллизуется и лишь 10% остается в жидком состоянии. Поскольку замораживание воды в клетке происходит двумя основными путями — за счет непроизвольного или индуцированного формирования центров кристаллизации, то проникновение и рост их осуществляется через мелкие, заполненные водой канальцы в мембране клетки.

Замораживание может происходить вне клетки по мере того, как внутриклеточная вода выходит из клетки в результате ответной реакции на изменение градиента давления паров. Замерзает ли вода внутри клетки или она оставляет ее и кристаллизуется в экстрацеллюлярном пространстве, будет зависеть от следующих параметров: а) скорости охлаждения; б) размера клетки (геометрия поверхности); в) проницаемости для воды. При наличии этих и ряда других упомянутых выше параметров уравнение (30), рассчитанное на основе идеального поведения раствора, может оказаться полезным для грубого прогнозирования количества переохлажденной воды, остающейся в клетке при данной температуре. Это, следовательно, означает, что на основании этих данных можно приблизительно рассчи-

тать интенсивность и объем внутриклеточной кристаллизации. Таким образом, термодинамическое равновесие в замораживающей системе может быть достигнуто путем внутриклеточного образования льда. Это может быть также осуществлено путем другого механизма — внеклеточным образованием льда, процесс которого сопровождается последующей дегидратацией клетки, в результате чего происходит повышение концентрации внутриклеточных растворенных компонентов. Как тот, так и другой механизм очень сильно влияют на выживаемость клеток после реконсервации.

Экспериментально-теоретические расчеты при замораживании чистых водных растворов. Когда происходит формирование льда в чистой клеточной суспензии, то его рост происходит за счет потребления воды из остаточной жидкости фазы раствора, в результате чего как внутри, так и вне клетки резко повышается концентрация растворенных веществ (фаза вымораживания воды). Если использовать в качестве экспериментальной системы водные растворы, то можно вывести ряд количественных выражений, в какой-то мере прогнозирующих концентрационные эффекты в замороженной системе.

Если замерзает водный раствор, то его твердая фаза, как правило, представляет собой чистый лед, а растворенные вещества при этом сохраняются в жидком остаточном растворе. При постоянном внешнем давлении давление паров чистого льда p_S определяется температурой согласно уравнению

$$\frac{d \ln p_S}{dT} = \frac{L_S}{RT^2}, \tag{34}$$

где L_S — число сублимированного вещества в молях.

Давление паров p_L жидкого идеального раствора, подчиняющегося закону Раульта, согласно аналогичному уравнению (34), будет выглядеть так:

$$\frac{d \ln p_L}{dT} = \frac{L_v}{RT^2} + \frac{d \ln x_1}{dT}, \tag{35}$$

где L_v — тепло испарения в молях; x_1 — доля воды в молях.

Поскольку замораживание — это по сути процесс уравновешивания системы, то p_L равно p_S и поэтому

$$\frac{L_s}{RT^2} = \frac{L_v}{RT^2} + \frac{d \ln x_1}{dT}, \tag{36}$$

а поскольку молярная теплота плавления $\alpha_f = d_S - \alpha_v$, то

$$\frac{d \ln x_1}{dT} = \frac{L_f}{RT^2}. \tag{37}$$

Проинтегрировав от $x = 1$ до $x = x_1$ и допуская, что L_f величина постоянная, получим

$$\ln x_1 = \frac{L_f}{R}\left(\frac{T - T_0}{TT_0}\right) = \ln (1 - x_2), \tag{38}$$

где T_0 — точка замерзания чистой воды в плоскости, x_2 — молярная фракция растворенных веществ.

Таким образом, уравнение (38) количественно показывает, что по мере того, как температура T падает ниже T_0, для поддержания равновесия в системе необходимо, чтобы молярная фракция x_1 воды снижалась, а аналогичная фракция растворенных веществ x_2 повышалась. В замкнутой системе единственный способ снизить x_1 и повысить x_2 — это выведение воды и осаждение ее в виде льда. Это уравнение также свидетельствует о том, что величина x_1 и, следовательно, x_2 однозначно зависят от заданной температуры, т. е. при постоянном внешнем давлении по мере замораживания раствора концентрация растворимых веществ в остаточном растворе будет уравновешиваться со льдом только посредством температуры, регулирующей этот процесс.

Уравнение (35) явилось также основой для выведения кривых равновесия, показанных на рис. 42 и 43, и пригодно главным образом для растворов с более высокой концентрацией растворенных веществ. Если исследования проводятся на сильно разбавленных растворах, то для указанных выше расчетов можно воспользоваться уравнением Гласстона [310]

$$m \approx \frac{T_0 - T}{1{,}86v}, \qquad (39)$$

где m — молярность, v — число полностью диссоциированных ионов в растворах сильных электролитов.

Хотя концентрация растворенных веществ в остаточной жидкости затвердевающего идеального раствора зависит в основном от температуры, а не от исходной концентрации жидкой части раствора, то часть его, которая является жидкостью, зависит как от температуры, так и от исходной концентрации веществ m_i. Эта часть q, по данным Мазура [539, 549], примерно составляет

$$q \approx \frac{1{,}86vm_i}{T_0 - T}. \qquad (40)$$

Параметром в этом отношении может служить система, в которой замораживается суспензия клеток в 0,01 М неэлектролитическом растворе ($V = 1$) до температуры —10°. При этом всего лишь около 0,186% раствора остается незамороженным, а концентрация растворимых веществ в этой части системы повышается в 540 раз, составляя 5,4 М раствор. В эвтектической точке концентрация растворенного вещества начинает превышать его растворимость, а растворенное вещество (если оно не перенасыщено) будет осаждаться вместе с оставшейся водой в виде смеси льда и твердых растворенных веществ. Поскольку различные растворенные вещества обладают разной растворимостью и температурным коэффициентом растворимости, то такой комплексный раствор не будет иметь единой эвтектической точки, а скорее будет иметь эвтектическую зону [539, 540, 674].

Концентрационные факторы криоповреждений замороженных клеток. Приведенное уравнение (38) может быть вполне использовано для растворов, находящихся в равновесии со льдом. Поэтому его можно применять к средам, окружающим клетку (за исключением случаев, в которых использовались очень высокие скорости замораживания). Это уравнение позволяет также ориентировочно рассчитывать концентрацию растворенных веществ в клетках, содержащих лед, при условии, если последний распределен по клетке таким образом, что это позволяет быстро достичь равновесного давления пара. В то же время если клетка не заморожена, концентрация внутриклеточных растворенных веществ при данной температуре во время охлаждения будет меньше равновесной концентрации, выведенной в уравнении (38), несмотря на то что содержимое цитоплазмы концентрируется в связи с вымораживанием воды из клетки. Эту разность можно определить по уравнению (33) и изобразить в виде кривых скоростей охлаждения и равновесия. Если охлаждение незамороженной клетки при данной температуре внезапно прекратить, то переохлажденная вода все равно будет мигрировать из клетки до тех пор, пока цитоплазма не достигнет концентрационного равновесия. Время, которое необходимо для осуществления этого процесса, можно определить, пользуясь уравнением (31), если принять, что другой формой уравнения (31) является

$$\frac{dV}{dt} = kA\,(\Pi - \Pi_e), \tag{41}$$

где Π и Π_e — неуравновешенное и уравновешенное осмотическое давление цитоплазмы [236].

Для разбавленных растворов можно воспользоваться уравнением Гласстона

$$\Pi = \frac{RTn_2}{V}. \tag{42}$$

Поэтому уравнение (41) можно записать в виде

$$\frac{dV}{dt} = kAn_2RT\left(\frac{V_e - V}{VV_e}\right), \tag{43}$$

где V_e — объем внутриклеточной воды в равновесном состоянии. После перегруппировки и интегрирования и допуская, что V и t — единственная переменная величина

$$V_e \int_{v_1}^{v_2} \frac{VdV}{V_e - V} = kAn_2RT \int_{t=0}^{t=t} dt, \tag{44}$$

получим

$$t = \frac{V_e(V_1 - V_2) + V_e^2 \ln \dfrac{V_e - V_1}{V_e - V_2}}{kAn_2RT}. \tag{45}$$

В табл. 6 приведены данные по времени t, необходимом для того, чтобы при температуре —20° содержание клеточной воды снизилось до величины, которая была бы в 1,1 раза больше величины

равновесия для сферических клеток разных размеров. При этом полагают, что клетка все еще будет содержать 75% воды в тот момент, когда температура достигнет уже —20°. Из табл. 6 видно, что время, необходимое для этого процесса, равняется 0,2 *мин* даже для самых больших клеток.

Следует отметить, что указанные выше расчеты, предложенные Мазуром для определения интенсивности дегидратации клетки при замораживании, основаны на нескольких довольно грубых допущениях. Два из этих наиболее важных допущений заключаются в том, что протоплазма рассматривается как идеальный раствор, поведение которого постоянно при всех концентрациях, и что кон-

Таблица 6

Временная зависимость снижения внутриклеточной воды в различных клетках при —20° [541]

Первоначальный объем (V_i) клеточной воды (a). *мк*³	Величина клеточной поверхности (A). *мк*²	Первоначальный объем (V_i) клеточной воды при —20°. *мк*³	Равновесие объема (V_e) клеточной воды. *мк*³	Время, в течение которого достигается $V_t = 1{,}1\ V_e$. *мин*
0,42	3,04	0,315	0,0162	0,0057
88,0	107,0	66,0	3,392	0,034
6920,0	1964,0	5190,0	266,7	0,14

Примечание. a — нормальный объем внутриклеточной воды в сферических клетках размером 1,6 и 20 *мк* в диаметре [539]; e — см. в тексте уравнение (44); c — см. уравнение (45), где n_2 — выражены как $M \times V_i$; M — внутриклеточная осмомолярность, принятая за 0,5; k — согласно уравнению (32) соответствует $kg = 0{,}3$; $s = 0{,}035$; $T_K = 293°$ К и $T = 253°$ К.

станта проницаемости не изменяется даже по мере того, как концентрируется содержимое клетки. Вместе с тем первое положение не может считаться вполне правильным даже при полностью гидратированной клетке. Более того, оба допущения становятся явно ошибочными, когда содержание воды в клетках снижается до 10%, т. е. фактически остается остаточная структурносвязанная вода. Тем не менее данные табл. 6 показывают, что если суспензия находится при постоянной температуре в течение нескольких минут, активность воды в любом жидком незамороженном растворе будет примерно одинакова внутри и вне клетки и близка к равновесию либо к равновесному давлению паров, обусловливаемых заданной температурой. Более того, поскольку активность воды обратно пропорциональна концентрации растворенного вещества, то в жидкой части раствора она будет примерно одинаковой внутри и вне клетки.

Химические аспекты эффекта концентрированных растворов. Совершенно ясно, что скорость химических реакций зависит от концентрации веществ, участвующих в реакции. Однако повышение концентрации участвующих в реакции веществ может в некоторых случаях оказывать более сильное влияние на скорость этого процесса. Такая ситуация может возникнуть именно при низких температу-

рах. Например, разбавленные растворы НАД при температуре —20° реагируют с небольшим количеством ацетона, в результате чего образуется особый продукт желтого цвета, который при субнулевых температурах, как правило, не образуется [246]. Было показано, что при —20° 1 *мкмоль/мл* ацетона дает 1 *мкмоль/мл* НАД-ацетон продукта. Однако при комнатной температуре необходимо 10 *мкмоль/мл* ацетона, чтобы получить 1 *мкмоль/мл* этого же продукта. Это объясняется, очевидно, тем, что концентрация ацетона при температуре —20° (см. уравнение (39)) повышается примерно до 10 М, в то время как при комнатной температуре его концентрация составляет всего лишь 0,001 М. Следовательно, при —20° концентрация ацетона повышается примерно в 10 000 раз. Эффектами концентрации того или иного вещества можно также объяснить наблюдаемый факт, когда УФ-облучение вызывает димеризацию молекул тимина в замороженных растворах, в то время как в обычных жидких средах этого не наблюдается [825]. Кроме общего влияния концентраций регулирующих веществ на скорость химических реакции растворенные вещества могут оказывать и другие специфические влияния на этот процесс. Замораживание растворов в присутствии фосфатного буфера вызывает значительное изменение pH, что способствует осаждению нежелательных компонентов из раствора [860, 861]. Вторичная и третичная структура биологических макромолекул, таких как ДНК и белки, которые содержат заряженные фосфатные или аминокислотные группировки, подвергаются действию ионов и ионной среды, изменение параметров которых при замораживании может повышать способность биомакромолекул к денатурации. Следовательно, указанные выше процессы в клетках при низких температурах могут вызывать необратимые изменения биомакромолекул, которые приводят к летальному исходу.

ФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗАМОРАЖИВАНИЯ. ВЛИЯНИЕ СКОРОСТЕЙ ОХЛАЖДЕНИЯ И ОТОГРЕВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Скорость охлаждения биологических объектов является одним из основных факторов, определяющих, каким образом будет происходить термодинамическое уравновешивание давления паров в клетках. Достигнет ли клетка этого состояния путем дегидратации либо путем внутриклеточного замораживания, зависит от скорости замораживания. Медленное замораживание включает первый механизм уравновешивания, быстрое — второй механизм. Скорость изменения температуры и экспозиция могут также влиять на размер и форму кристаллов льда вне клетки и внутри ее. В настоящее время четко определено, что при высокой скорости замораживания проявляется тенденция к образованию более мелких структур льда [582]. Процесс кристаллизации зависит от скорости формирования ядер кристаллов и от скорости их роста. Если формируется много центров кристаллизации в переохлажденной жидкости, то средний размер

кристалла будет меньше, чем при формировании нескольких центров. Движущей силой для формирования и роста кристалла является разность свободных энергий у переохлажденной воды и льда (см. уравнение (11)). Поскольку свободная энергия увеличивается по мере повышения температуры переохлаждения, то скорость формирования центров и рост кристалла будут увеличиваться по мере снижения температуры пробы.

Скорость I, при которой однородные центры льда критического размера самопроизвольно появляются в воде, определяется уравнением, предложенным Флетчером [292],

$$J \approx \frac{n_L kT}{H} e^{-\Delta g/\kappa T} e^{-\Delta G^*/\kappa T}, \qquad (46)$$

где n_L — число молекул на единицу объема жидкой воды, k — константа Больцмана, H — константа Планка. Множитель Δg представляет свободную энергию для переноса молекул воды через границу раздела вода — лед, а ΔG^* — свободная энергия, необходимая для образования ядра критического размера (т. е. ядра с радиусом кривизны, полученным на основании расчета по уравнению (26) Кельвина)

$$\Delta G^* \approx \frac{16\pi \nu_{SL}^3 \varepsilon T_0^2 \sigma_S^2}{3(L_f \Delta T)^2}, \qquad (47)$$

где ΔT — переохлаждение, ε — фактор, близкий к единице и обозначающий то, что кристалл не является сферическим.

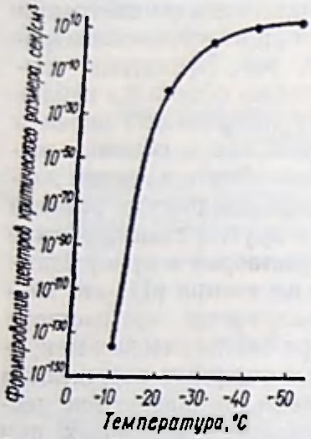


Рис. 44. Кривая теоретических скоростей замораживания в чистой воде, при которой формируются центры кристаллизации льда критических размеров (механизм гомогенного ядрообразования) [292, 533].

На рис. 44 показан температурный график, который построен при использовании параметров, предложенных Масоном [533] и Флетчером [292]. Обращает на себя внимание увеличение скорости, с которой центры кристаллизации появляются при снижении температуры. Флетчер рекомендует уравнение подобного типа для прогнозирования темпов неоднородного формирования центров кристаллизации в переохлажденной воде. В этом случае скорость при данной степени переохлаждения гораздо выше, поскольку величина ΔG^* пропорциональна кристаллографическому профилю поверхности льда и размеру или радиусу кривизны чужеродной частицы. Иначе говоря, при неоднородном ядрообразовании кривая на рис. 44 смещается влево. Однако при достижении определенной температуры скорость формирования центров достигает минимума и снижается, потому что вязкость переохлажденной жидкости достигает высоких значений [582].

Для выражения скорости роста центров линейной кристаллизации обычно можно воспользоваться уравнением (43), поскольку

оно включает величины энергии активации ядрообразования и подчеркивает, что рост кристалла требует упорядоченного встраивания молекул воды в кристаллическую решетку льда. Таким образом, образование ядер происходит как бы в два этапа, т. е. является двумерным. Согласно теории Ван-Хука [862], скорость роста кристаллов

$$j = C_1 e^{-u/kT} e^{-D/(\Delta T)\,T}, \qquad (48)$$

где u — энергия активации диффузии (эквивалентно Δg в уравнении (46)); D—константа; $D/(\Delta T)$ — адекватная энергия активации для ядрообразования; ΔT — степень переохлаждения.

Хиллинг и соавторы [371] допускают, что рост кристалла может происходить иным путем. Они считают, что молекулы воды осаждаются на спирально смещенной решетке льда, которые служат центрами самовозмущения центров ядрообразования согласно уравнению

$$j = C_2 (\Delta T)^2 / T. \qquad (49)$$

Их экспериментальные измерения скорости кристаллизации льда в переохлажденной воде позволяют рассчитывать эти параметры в интервале температур 0—10° по формуле

$$j = 0{,}16 \Delta T^{1.7} \; см/сек. \qquad (50)$$

Следует отметить, что хотя скорость формирования центров кристаллизации и скорость их роста повышаются при переохлаждении, процесс образования центров требует все же большего переохлаждения, чем при росте сформированного кристалла при достижении критической температуры. Следовательно, при медленном охлаждении сформированные вначале центры кристаллизации, очевидно, вырастут в большие кристаллы прежде, чем возникнут возможности образования дополнительных центров кристаллизации. При быстром охлаждении температура обычно снижается до уровня, при котором образуется множество мелких кристаллов. При этом возможности для роста сформированных центров сводятся к минимуму, т. е. температура падает ниже точки «остеклования» раньше, чем могут вырасти сформированные при охлаждении кристаллы льда. В результате этого образуется гомогенное твердое вещество, части которого оказываются как бы в аморфном (стекловидном) состоянии.

Помимо влияния скорости охлаждения на размер отдельных кристаллов, она может изменять форму кристалла. Высокая скорость охлаждения, согласно уравнениям (48) и (49), способствует более интенсивному переохлаждению воды, находящейся вблизи фронта кристаллизации, в связи с чем обусловливает высокую скорость роста кристалла льда. При очень быстром росте кристалл может приобретать аномальную форму. В нем могут отсутствовать некоторые грани и вместо гексагональных многогранников иногда образуются формы с повышенным количеством радиальных ветвей и игл. Подобные исследования форм кристаллов льда из растворов в зависимости от скорости охлаждения и температуры были

проведены Люйе и его сотрудниками [520, 526, 551а, 628]. По данным этих авторов, при сверхбыстрой скорости замораживания в растворах не наблюдается типичного процесса кристаллизации.

Поскольку образование центров кристаллизации и рост кристалла — процессы, сопровождающиеся передвижением сравнительно неупорядоченных молекул воды в жидком состоянии к строго упорядоченным ориентациям, какой является система кристаллической решетки льда, то, вероятно, на скорость этого перехода от одного состояния в другое влияет вязкость раствора. Известно, что растворенные вещества типа сахарозы, глицерина, желатина и других соединений заметно повышают вязкость раствора, в результате чего такие растворы характеризуются более медленным ядрообразованием и ростом кристаллов. Именно подобного рода растворы при сверхбыстрой скорости охлаждения могут приобретать своеобразный вид, описанный ранее как стекловидный.

Роль скорости отогрева. Если вода или раствор охлаждаются довольно быстро и приобретают стекловидный вид, то частичная или полная кристаллизация такого процесса происходит в том случае, если раствор будет находиться при температуре выше точки «остеклененния» либо если он отогревается до 0° со скоростью ниже, чем скорость, необходимая для витрификации. Следовательно, центры кристаллизации, сформированные во время охлаждения, завершат свой рост во время процесса отогревания. Как известно, при формировании стекловидной формы льда исчезают характерные для типичной кристаллической структуры пики поглощения, определяемые с помощью метода рентгеновской или электронной дифракции. Если такой стекловидный образец начинают отогревать, то при этом можно наблюдать появление дифракционных пиков и освобождение скрытой теплоты плавления, которая свидетельствует о завершении процессов кристаллизации (девитрификации).

На основании тщательного анализа литературы и собственных исследований по девитрификации чистой воды, изученной методом рентгеновской дифракции, Дауэлл и соавторы [254, 255, 256, 257] пришли к заключению, что этот процесс почти полностью зависит от температуры. Например, при температуре —135° этот процесс завершается за 1 *мин*, а при —160° — в течение 205 дней. Вместе с тем девитрификация вязких водных растворов происходит при значительно более высокой температуре. Методом рентгеновской дифракции на растворах желатина было показано, что завершение кристаллизации в таких растворах происходит в интервале температур —65 и —25° в зависимости от концентрации желатина. Охлаждение концентрированных растворов глицерина (44—56%) до —196° с последующим медленным отогревом до —110 и —80° сопровождается в этом интервале температур выделением скрытой теплоты плавления в результате кристаллизации стекловидной массы [520]. Известно, что в полностью затвердевшей воде изменяются размер и форма кристаллов льда. Если принять во внимание закон Оствальда о фазных изменениях, то можно понять в некоторой

степени причины возникновения вторичной кристаллизации. Как известно, суть закона Оствальда сводится к тому, что если данная химическая система остается в неустойчивом состоянии, она стремится перейти не в более устойчивую форму, а в форму, устойчивость которой очень близко напоминает ее собственную, т. е. ту временно устойчивую модификацию, образование которой из первоначального состояния сопровождается самой небольшой потерей свободной энергии. Таким образом, очевидным следствием этого закона является то, что если вода замерзает во время охлаждения и образует кристаллы льда, которые находятся в наиболее неустойчивом состоянии, то изменение их формы может измеряться в направлении к самой устойчивой при условии, конечно, если для этого имеется время и соответствующая температура. Количественно было исследовано изменение двух видов форм кристаллов. Первая — это трансформация из стекловидной в кубическую форму и изменение последней в гексагональную. Этот процесс происходит следующим образом. Когда стекловидная твердая фаза замерзшей воды постепенно нагревается, то она вначале при температуре —165° частично трансформируется в лед кубической формы, который при температуре —130° превращается в обычный гексагональный лед [254—257]. Согласно рентгенографическим данным, подобного рода трансформации наблюдаются и в растворах желатина, однако они происходят при температуре порядка —60°. Необходимо отметить, что в некоторых случаях дифракционная картина кубического и гексагонального льда может совпадать. Это происходит в том случае, если гексагональный лед растет только в двух направлениях [521]. Другим типом трансформации, тщательно изученной Кинжером и сотрудниками [423, 424], является агломерация кристаллов, которая изображена в виде термодинамической системы (рис. 45), где две сферы льда соединены узкой перемычкой. Согласно теории Кельвина (см. уравнение (26)), химический потенциал искривленной поверхности во многом отличается от потенциала плоской поверхности:

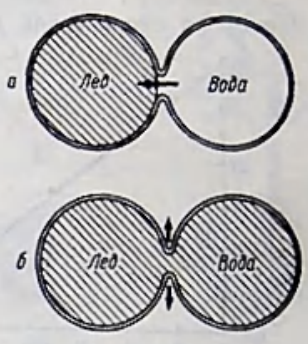


Рис. 45. Две гипотетические модели (*а* и *б*) внутриклеточного повреждения клетки в результате замораживания [541].

$$\mu - \mu_s = \bar{v}RT \ln p/p_s = v_s\sigma\left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2}\right), \qquad (51)$$

где μ и μ_s — химические потенциалы искривленного и плоского льда; p и p_S — соответственно их показатели давления паров; r_1 и r_2 — главные радиусы кривизны искривленной поверхности.

В перемычке на рис. 45 этот радиус y больше, чем радиус ρ, так что

$$\mu \text{ (перемычки)} - \mu_s = RT \ln p \text{ (перемычки)} / p_s \approx \frac{v_s \sigma}{\rho}. \quad (52)$$

Поскольку величина ρ отрицательна при вогнутой поверхности, то химический потенциал и давление паров указанной выше перемычки меньше, чем поверхности плоского льда.

Для сферического льда $r_1 = r_2$, поэтому

$$\mu \text{ (сферы)} - \mu_s = RT \ln p \text{ (сферы)} / p_S = \frac{2v_s \sigma}{r}. \quad (53)$$

Поскольку r — положительный химический потенциал и давление паров сферической поверхности больше, чем плоского льда, то в области перемычки это давление будет еще выше. Эта разница в химическом потенциале может быть уменьшена за счет уменьшения вогнутости перемычки, а это произойдет в том случае, если она будет расти в ширину. Кинжери и соавторы [423, 424] считают, что прирост массы вещества перемычки происходит в результате возникновения таких дополнительных процессов в замороженной системе, как испарение, конденсация, поверхностная диффузия и вязкость потока. Этими авторами были также получены кинетические расчеты указанных выше процессов в зависимости от температуры. При экспериментальном определении роста межкристаллической перемычки в сферическом льду при различной температуре (вплоть до —25°) было установлено, что увеличение ее размеров обусловлено прежде всего поверхностной диффузией молекул. Видно (рис. 46), что скорость роста перемычки была довольно высокой и существенно зависела от температуры, сохраняя высокую энергию активации, равную 27 500 *кал/моль*. Для сфер диаметром 2 *мм* диаметр перемычки при температуре —2° увеличивается от 0 до 0,2 *мм* через 1 *мин*, а при температуре —25° только спустя 10 *мин*. Перемычка в сферах меньших размеров увеличивается значительно быстрее.

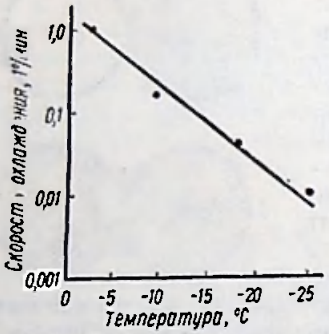


Рис. 46. Температурная зависимость скорости роста ледяной перемычки между сферами [423].

На основе приведенных выше данных можно сделать заключение, что при быстром охлаждении отмечается тенденция к формированию кристаллов с положительными радиусами кривизны в связи с тем, что сам размер кристаллов мал и они образуют ветви. В некоторых случаях формируются соединения кристаллов и их ветвей даже с определенными радиусами кривизны. Такие зоны с малыми радиусами кривизны обладают довольно высокой химической или свободной энергией на поверхности в отличие от зон с большой кривизной поверхности. Поэтому если температура достаточно

велика, а последующий отогрев объекта идет медленно, то возникают условия, способствующие изменению формы и размеров кристалла, поскольку система будет стремиться выравнять резкую кривизну выпуклости и заполнить кривизну вогнутости. Такой процесс может осуществиться либо путем слияния двух маленьких кристаллов в единый блок, либо при переносе воды от меньших кристаллов с более высокими поверхностными энергиями к кристаллам больших размеров, но с низкой поверхностной энергией. Этот рост больших кристаллов за счет маленьких называется подвижной рекристаллизацией, либо ростом зерен. Он может происходить как в процессе сублимации — конденсации, так и отогрева — повторного замораживания, когда небольшие и малые кристаллы находятся в непосредственном контакте. Таким образом, в настоящее время имеются убедительные доказательства того, что в быстро замороженной воде и в водных растворах происходят некоторые виды рекристаллизационных процессов, оказывающих повреждающее действие на компоненты живой клетки. Меримен [557, 558] наблюдал быструю трансформацию малых кристаллов чистого льда в большие уже при температуре —90° (рис. 47). Подобные трансформации кристаллов льда происходят в быстрозамороженных растворах желатина и глицерина, если их медленно отогревать и выдерживать при температуре —20°.

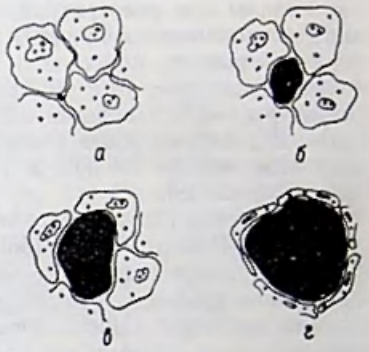


Рис. 47. Динамика формирования внеклеточного (*а, б, в, г*) льда (черные области), сопровождающаяся дегидратацией клетки при замораживании мышечной ткани [564].

Влияние скорости охлаждения и отогрева на кинетику кристаллизации льда в клетке. Скорость охлаждения биологических объектов является одним из основных способов, которые позволяют регулировать не только формирование льда в клетке, но также их размер и конфигурацию кристаллов. Медленное замораживание приводит к образованию больших, относительно устойчивых кристаллов льда, хотя они чаще всего образуются вне клетки. Поскольку в этом случае кристаллы оседают в виде устойчивых форм, то с течением времени их форма и размер будут изменяться незначительно. С повышением скорости охлаждения вероятность формирования внутриклеточного льда будет повышаться, однако сформированные внутриклеточные кристаллы менее устойчивы и изменяют свою форму либо обладают способностью расти во время хранения или отогрева. Однако для разных типов клеток существует своя «быстрая» и своя «медленная» скорость замораживания. Например, согласно уравнению (30) для образования внутриклеточного

льда в яйцах морского ежа требуется скорость всего 1° в минуту, а для эритроцитов человека, имеющих такой же размер,— 5000° в минуту. Следует думать, что кристаллы внутриклеточного льда, которые образуются при скорости 1° в минуту, по-видимому, будут по размерам больше и устойчивее, чем кристаллы, возникшие при охлаждении со скоростью 5000° в минуту.

В настоящее время имеется довольно большая информация о влиянии скоростей замораживания и отогрева, температуры и времени на структуру и функцию кристаллов внутриклеточного льда. При исследовании формирования льда в изолированных волокнах мышц методом световой и электронной микроскопии показано, что такие кристаллы при температуре —16° растут в нити гораздо быстрее в продольном направлении (400 *мк/сек*), чем в поперечном (20 *мк/сек*), причем размер кристаллов обратно пропорционален скорости охлаждения (рис. 48 и 49). Если пробы быстро охлаждать до температуры —150°, а затем в течение одной минуты отогревать их до —15°, зафиксировав температуру отогрева на этом уровне, то при этом можно наблюдать типичный рост кристаллов льда вне клеток (рис. 49).

Аналогичный рост кристаллов наблюдается и внутри клетки. Например, Рапатц и Люйе [661, 662] наблюдали микроскопический рост кристаллов в процессе замораживания эритроцитов лягушки до температуры—80° и последующего их отогрева до —20°. Аналогичный микророст кристаллов внутри быстро замороженных фибробластов при их отогреве наблюдал Рэй [673]. Эти данные свидетельствуют о том, что размер и форма кристаллов льда внутри клеток тесно связаны со скоростью охлаждения и их последующим отогревом, причем поведение таких кристаллов в чистой воде и водных растворах мало чем отличается. Предполагают, что физико-химическая основа этих изменений связана главным образом с кривизной поверхности кристалла и некоторыми дополнительными факторами, повышающими интенсивность формирования их неустойчивых форм в клетках. К таким факторам прежде всего относится внутренняя структура мембраны клетки, которая, как оказывается, благоприятствует росту кристаллов льда именно в тех направлениях, которые соответствуют ее структуре, но вместе с тем не способствует формированию устойчивых форм льда.

Считают, что атипичное снижение температуры в точке замерзания в гелях объясняется влиянием именно их структуры на форму и устойчивость кристаллов льда. Используя термодинамические расчеты, аналогичные уравнению (26), Кун [444] установил, что в случае роста «двухразмерного» льда образующиеся кристаллы обладают более высоким давлением паров и, следовательно, имеют более низкую точку плавления, чем трехмерные микрокристаллы. Действительно, было отмечено, что точка плавления большого, но тонкого кристалла снижается наполовину по сравнению с точкой плавления малого кубического кристалла с длиной его грани S. Более того, взаимосвязанные нити геля обычно ограничивают рост

кристаллов до размеров мицеллы. Если кристалл начинает расти вокруг такой нити, то образующаяся при этом система увеличивает в кристалле площадь поверхности, в результате чего его поверхностная энергия делает кристалл еще менее устойчивым и все больше и больше снижает его точку плавления. В результате этого вода в гелях обычно вымерзает в виде макрокристаллов при более низкой скорости охлаждения, чем при скорости, необходимой для формирования зерен кристаллов в золях. Следовательно, в случае гелей размер макрокристаллов будет определяться размером мицелл. Однако поскольку микрокристаллы неустойчивы по отношению к макрокристаллам, они могут изменять рост кристаллов на нитях геля, как это, очевидно, происходит и в клетках.

Влияние скоростей охлаждения и отогрева на химические реакции. Как известно, равновесная концентрация растворенных веществ в замороженных растворах при постоянном давлении главным образом определяется температурой и быстро наступает при таких условиях в живых клетках. Следовательно, скорость охлаждения и время экспозиции существенно не влияют на окончательную концентрацию растворенных веществ. Вместе с тем указанные выше факторы оказывают косвенное влияние на химические последствия действия таких концентрированных растворов.

С увеличением времени контакта концентрированного вещества при температурах выше эвтектической точки с компонентами клеток степень их повреждения усиливается. Особенно резко эти процессы выражены при медленных скоростях охлаждения, поскольку они способствуют увеличению времени экспозиции концентрированного раствора с мембранами клетки. Как известно, цитоплазма клеток имеет сложный состав и в отличие от растворов с одним каким-либо растворенным веществом она состоит из множества соединений. Все это и объясняет то, что в цитоплазме нет единой эвтектической точки, а скорее существует широкая и диффузная эвтектическая зона, лежащая в интервале температур от —30 до 0° [540]. Было показано, что при низких температурах в клетках остается небольшая часть жидкой воды. Теоретически не исключено, что при температуре —50° в клетке может остаться около 2% воды в жидком состоянии, поскольку в ней растворены в большом количестве такие слои, как хлориды кальция, имеющие эвтектические точки ниже —50°. В дрожжах и *E. coli* около 10% воды не замерзает при таких низких температурах. Считают, что при температурах —130 и —160° скорость замораживания почти всех биологически важных реакций очень низкая либо равна нулю. При таких температурах вся жидкая вода замерзает и превращается в стекловидную массу, в результате чего хранение биологических объектов при таких температурах, казалось, не должно сопровождаться значительными химическими реакциями (за исключением повреждений, вызванных ионизирующей радиацией). Однако установлено, что некоторые химические реакции в клетках могут происходить даже при —130°, хотя характер этих реакций не типичен для биологических объектов,

т. е. в обычных условиях метаболизма клетки их не наблюдается [546, 547].

Скорость отогрева также влияет на жизнеспособность законсервированных клеток, как и скорость замораживания. При отогреве жидкая вода появляется при гораздо более высокой температуре, чем когда она замерзает. Методом дифференциального теплового анализа и электрической кондуктометрии установлено, что эвтектические точки находятся примерно на 10° ниже при охлаждении, чем при отогреве [537, 538, 540, 674, 675]. Такое различие может быть объяснено сверхрастворимостью растворенных веществ в фазе охлаждения [862]. Когда во время отогрева замороженных тканей начинает появляться жидкая вода, то ее равновесная концентрация опять-таки будет зависеть от температуры. Если во время охлаждения происходит кристаллизация воды внутри клетки, то уравновешивание во время отогрева происходит быстро и просто за счет плавления определенного количества внутриклеточного льда, необходимого для разбавления раствора. Если происходит отогрев предварительно дегидратированных при замораживании клеток, то уравновешивание не будет происходить путем миграции воды из экстрацеллюлярного пространства в клетку, поскольку внешнее давление паров будет большим, чем внутреннее. Дифференциальное уравнение (30), описывающее элиминацию воды из клетки, внешне может быть использовано для расчетов, связанных с обратным транспортом воды в клетку при ее отогревании. Поскольку концентрация растворенных веществ в клетках менее 6 *мк* в диаметре остается вблизи равновесной величины при скорости охлаждения менее 10° в минуту (рис. 48 и 49), то при отогреве со скоростью менее 10° в минуту она должна оставаться вблизи зоны равновесия. При повреждении мембраны за счет миграции через мембрану воды и растворенных веществ во время замораживания равновесие в клетке во время ее отогрева будет быстро устанавливаться. При медленном отогреве клетки попадают в неблагоприятные условия, поскольку их структуры будут длительно находиться в контакте с концентрированными растворами. При быстром отогреве замороженной клетки этот момент отсутствует, в результате чего их повреждение будет минимальным.

Таким образом, явления, происходящие в живых клетках в зоне температур ниже 0°, весьма разнообразны и зависят от скорости их охлаждения и отогрева. Снижение температуры влияет само по себе на клетки, а также в связи с формированием кристаллов льда. Формирование льда в клетках в свою очередь ведет к двум основным последствиям: а) повышает концентрацию растворенных веществ вне и внутри клетки, что вызывает биохимическое повреждение ее структур; б) вызывает последующий рост кристаллов льда, когда они формируются внутри клетки при быстром охлаждении. Рост кристаллов происходит в результате того, что при быстром замораживании формируется большое число неустойчивых микрокристаллов, которые обладают способностью сливаться и стимулиро-

вать рост макрокристаллов как при низкотемпературном хранении, так и при отогреве. При медленном замораживании клеток с повышенной проницаемостью возникает дополнительный фактор повреждения — дегидратация, хотя лед образуется главным образом вне клеток. Следовательно, при низких температурах клетки могут повреждаться за счет индивидуального действия этих факторов либо за счет их комбинаций. Если повреждение клеток обусловлено комбинацией факторов, то причины холодовой гибели клеток очень сложны. Если повреждение обусловлено одним каким-либо из факторов, то он по отношению к различным клеткам по-разному себя ведет. Так, если тепловой удар является летальным фактором, то гибель клетки произойдет как при формировании льда, так и при отсутствии этого процесса. В случае формирования внеклеточного льда он может оказаться повреждающим, хотя на его образование не оказывает влияние скорость охлаждения, температура, скорость отогрева и время хранения. Если смерть клетки обусловлена концентрацией растворенного вещества, то условия, при которых возникают эти процессы, являются наиболее вредными и должны вызывать максимальное повреждение. В связи с этим медленное охлаждение является более вредным, чем быстрое. По той же причине длительное хранение при температурах выше эвтектической точки является более вредным, чем хранение объекта при более низких температурах. Как известно, концентрирование растворенных веществ в клетке после ее дегидратации так же вредно, как и увеличение количества растворенных веществ в клетке при замораживании.

Таким образом, выясняя в модельных опытах чувствительность клеток к тому либо другому повреждающему фактору, можно предсказать в некотором приближении исход замораживания биологического объекта.

Глава IV

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ

Основными факторами, оказывающими повреждающее действие на биологические системы при замораживании, являются следующие:

1. Внутри- и внеклеточная кристаллизация воды клетки, сопровождающаяся дегидратацией биомакромолекул и биологических мембран в пределах, вызывающих выпадение их компонентов в осадок.

2. Повышение концентрации электролитов и pH, вызывающее денатурационные изменения биомакромолекул, субклеточных структур и других компонентов клетки.

3. Пространственное сближение биомакромолекул и субклеточных частиц, вызывающее их необратимые структурные перестройки в результате гибридизации или других процессов.

4. Кристаллизация внутримембранной воды и компонентов важнейших мембранных структур клетки (митохондрии, биомембраны, лизосомы) и каталитических белков.

5. Механические повреждения структурных компонентов клеток за счет внутриклеточной и внеклеточной кристаллизации воды и роста кристаллов (рекристаллизационные процессы).

Реализация всех указанных выше факторов повреждения возможна в водной среде, поэтому наиболее существенным является в конце концов вопрос о состоянии свободной и структурносвязанной воды, остающейся в межмицеллярных и межмембранных пространствах и на поверхности активных биомакромолекул. Эта система, как известно, обеспечивает поддержание структурнофункционального состояния компонентов клетки и участвует в таких важных процессах, как перенос протонов и электронов, либо транспорт структурной «информации» в клетке. Некоторые из приведенных факторов криоповреждений в достаточной мере были изучены рядом исследователей [129—132, 253, 466—469, 491, 544, 567, 694—700].

Внутри- и внеклеточная кристаллизация воды. Структуры клеток и окружающие их макромолекулы существенным образом влияют на динамику процессов замораживания. Различия в активности и вязкости воды в местах формирования первичных зародышевых центров кристаллов, проницаемости мембран и многие другие факторы существенно изменяют процесс возникновения и роста льда

в суспензиях, клетках и тканях. Из анализа частоты внутри- и внеклеточной кристаллизации следует, что при медленном охлаждении в большинстве тканей, как и, вероятно, во всех суспензиях, замораживание характеризуется главным образом внеклеточной кристаллизацией. Медленное замораживание способствует росту нескольких кристаллов больших размеров. Когда они во внеклеточном пространстве вырастают до определенных размеров, внутриклеточная жидкость становится все более гипертоничной по мере вымораживания «чистой» воды в лед. Этот процесс сопровождается элиминацией воды из клетки, по мере прогрессирования которой в конце концов наступает значительная дегидратация клетки и увеличение внешних кристаллов льда, которые могут во много раз превосходить размер отдельных клеток. По мере снижения температуры медленного охлаждения рост нескольких первичных кристаллов ввиду быстрой потери тепла увеличивается, что сопровождается переохлаждением системы и образованием дополнительных центров кристаллизации. Мазур [541] считает, что пока рост внеклеточных кристаллов происходит за счет клеточной воды, концентрация внутриклеточной и внеклеточной жидкости остается постоянной. Поскольку на точку плавления внутриклеточной воды оказывает влияние повышение концентрации солей, то температура спонтанного замораживания снижается постепенно, препятствуя внутриклеточному образованию ядер. Однако если диффузия клеточной воды во внеклеточное пространство ограничена вследствие быстрого роста кристаллов либо относительной непроницаемости клеточной мембраны, то концентрация внутриклеточной воды может оставаться более высокой, чем в том случае, когда мембрана клетки более проницаема. Все это может способствовать более энергичному внутриклеточному формированию центров кристаллизации льда при понижении температуры. Сейчас установлено, что в действительности любой вид замораживания биологических объектов характеризуется процессом неоднородного формирования центров кристаллизации. Предполагается, что возникает сразу несколько каталитических центров.

Одной из причин, обусловливающих реализацию этого явления, может быть эффект концентрации растворенного вещества, поскольку оно может по-разному снижать температуру спонтанного замораживания, в результате чего индуцировать неоднородное зарождение центров льдообразования. При этом температура спонтанного замораживания снижается на величину, равную снижению точки плавления. Однако различия в точках плавления как внутриклеточных, так и внеклеточных растворов очень малы, что, очевидно, объясняется повышением концентрации растворенных веществ, которые могут появляться в растворе вследствие автолиза компонентов клеток во время их замораживания.

Например, между точками плавления внутриклеточных растворов и плазмой не установлено каких-либо различий. Поэтому можно прийти к выводу, что преимущественно внеклеточная

кристаллизация является результатом какого-то другого, значительно более важного фактора, чем различия в точках плавления, обусловленные концентрацией растворенного вещества.

Известно, что некоторые клетки имеют довольно низкую температуру спонтанного замораживания. Так, яйца морского ежа, малопроницаемые для воды, можно переохлаждать до температуры —30°, причем даже в присутствии льдинок не индуцируется образование внутриклеточных центров кристаллизации [131]. Насекомых тоже можно переохлаждать до такой же температуры, но без добавления льда, поскольку их организм имеет довольно низкую температуру спонтанного замораживания. Такая низкая температура спонтанного замораживания, как считали, связана с очень небольшим размером их клеток, в которых могут возникать центры кристаллизации только с небольшими радиусами. Однако поскольку критический радиус зародышевого центра при температуре —5° должен быть не менее 100 Å и эти явления для насекомых носят сезонный характер, вряд ли можно объяснить все это только размерами их клеток. Скорее можно предположить, что летальную роль для клетки играет не процесс льдообразования, а рост кристалла. Последнее предполагает существование разницы между точками плавления внутри- и внеклеточных растворов при медленном охлаждении. Поскольку температура образца во внеклеточном растворе может находиться ниже точки плавления, то во внутриклеточной жидкости эта зависимость противоположного характера. Когда раствор охлаждается до температуры ниже его точки плавления, самые крупные неоднородные ядра достигают критического размера, в результате чего становится возможным рост первого кристалла. При медленном замораживании рост такого монокристалла может быть достаточен для обеспечения поглощения всего тепла, в результате чего раствор восстанавливает свою точку плавления. Поскольку возникновение подвижного зародышевого ядра не происходит до тех пор, пока температура не снизится ниже точки плавления, вряд ли можно ожидать формирования ядер в точках плавления. Если объем площади поверхности монокристалла велик, то его размеры могут значительно увеличиться и при своем росте он должен рассеивать довольно значительное количество тепла. Однако при низкой скорости замораживания разбавленной суспензии формируется сравнительно мало ядер в клетках, поскольку клетки составляют небольшую часть общего объема. С повышением скорости охлаждения переохлаждение увеличивается, несмотря на выделение скрытой теплоты плавления. При этом образуются большие ядра и повышается возможность их внутриклеточного образования. Когда скорость замораживания становится достаточной для того, чтобы сформировать кристалл по размеру равный или меньше, чем клетки, вероятность внутриклеточного образования приближается к единице. Хотя реализация этих процессов скорее всего может иметь место в случае клеточной суспензии, в которой внеклеточный объем представляет собой существенную величину, использование этих

расчетов может быть целесообразным также для анализа тканей с очень малым внеклеточным пространством.

Рост кристаллов льда в растворе идет преимущественно в направлении низких концентраций растворимого вещества и замедляется при более высоких концентрациях. Это обусловлено как наличием структурных компонентов в растворе, так и концентрацией растворимых веществ, обусловленной непосредственным ростом кристаллов льда. При быстром росте последних, как правило, сохраняется тенденция накопления концентрированного слоя растворимого вещества на растущие грани кристалла. Такой растущий кристалл льда может в дальнейшем обходить соседние слои концентрированного растворенного вещества и продолжать свой рост в менее концентрированном расплаве. Поэтому окончательная структура будет иметь строение совокупности кристаллов, как это было установлено при исследовании образцов кристалла.

В настоящее время остается неясным, формируется ли сразу несколько ядер кристаллизации либо образуется одно зародышевое ядро, которое сопровождается ростом кристалла льда. Некоторые экспериментальные наблюдения по замораживанию насекомых свидетельствуют в пользу того, что спонтанная кристаллизация является результатом развития именно монокристаллического центра. При дальнейшем снижении температуры, когда скорость охлаждения достаточно высокая для инициации постоянного прироста переохлаждения, формируются дополнительные ядра кристаллизации.

Считают, что первичным местом образования кристаллов льда является межклеточное пространство. Возникшая здесь льдоподобная структура индуцирует внутриклеточную кристаллизацию в результате миграции ее через мембрану клеток. При наблюдении за образованием льда в мышечном волокне в ряде клеток было обнаружено, что вначале появляются кристаллы, растущие в виде длинных ледяных игл во внеклеточное пространство. Затем этот кристалл каким-то образом индуцирует образование внутриклеточных кристаллов, в результате чего вся система оказывается закристаллизованной. Когда такую систему повторно замораживать и оттаивать, то внутриклеточное пространство заполняется внеклеточным кристаллом, в основном у стенки клетки, что свидетельствует о существовании каких-то каналов в мембране, через которые может осуществляться миграция внеклеточного льда во внутриклеточный раствор. Действительно, в некоторых экспериментах по замораживанию непроницаемых для воды оплодотворенных яиц *Hemicentropus pulcherimus* установлено, что если проморозить раствор, в котором взвешены яйца, ниже эвтектической точки, то наступает мгновенная их гибель из-за внутриклеточного образования льда. Под микроскопом видно, что сразу после прикосновения к поверхности яйца кристалла льда внутриклеточное содержимое его быстро замерзает [132]. Считают, что это явление — результат гидратационной денатурации вследствие нарушения процессов проницаемости мембран,

в результате чего внутриклеточный раствор становится доступным внутриклеточному льду. Было также отмечено, что внутриклеточное содержимое таких клеток замерзает при температуре ниже — 35° независимо от состояния внеклеточного раствора. Очевидно, эта температура являлась температурой спонтанного замораживания внутриклеточного содержимого. Следовательно, внутриклеточная кристаллизация может возникать даже тогда, когда клетки почти непроницаемы для воды. Другим примером в этом отношении могут служить оплодотворенные яйца морского ежа, которые не замерзают при температуре —20°. Здесь, как и в первом случае, играет роль водопроницаемость клеточной мембраны. Вместе с тем неоплодотворенная клетка этого же животного очень быстро погибает при гораздо более высоких температурах, поскольку она проницаема для воды. Оплодотворенная клетка очень быстро обезвоживается, и ее повреждение при температуре ниже —20° обычно наступает через несколько часов. Если температуру понижать и дальше до температуры спонтанного замораживания, то происходит формирование льда внутри клетки и наступает ее гибель. Таким образом, оплодотворенные клетки погибают в результате внутриклеточной кристаллизации компонентов ядра и цитоплазмы. Внутриклеточная кристаллизация возникает в этом случае как следствие понижения температуры окружающей среды до температуры спонтанного замораживания, а также в связи с тем, что сформированный вне клетки кристалл не выделяет тепло и температура окружающей среды будет спонтанно снижаться, в силу чего размеры внутриклеточных ядер станут кристаллическими. Принято считать, что медленное охлаждение способствует превращению одного или нескольких кристаллических центров в критические, от которых лед распространяется во внеклеточное пространство. В этом случае повреждение клетки может происходить по следующим причинам: а) в силу быстрого формирования единого большого кристалла льда, захватывающего сразу вне- и внутриклеточное пространство; б) в результате плазмолиза клетки внеклеточными кристаллами льда; в) в связи с тем, что водонепроницаемые клетки повреждаются очень медленно и их гибель наступает обычно после значительного переохлаждения, вызывающего внутриклеточное образование льда.

При быстром охлаждении повреждение клетки происходит главным образом из-за постоянного переохлаждения и многочисленного формирования внутриклеточных центров кристаллизации, которые при дальнейшем понижении температуры образуют, как правило, один большой кристалл. При таком быстром понижении температуры обычно перед замораживанием образца в нем наблюдается температурный скачок до точки плавления. Этот феномен, очевидно, объясняется тем, что переохлаждение — это процесс, сопровождающийся дефицитом тепла. При кристаллизации скрытая теплота может, очевидно, поглощаться некоторое время самим образцом и не уходит наружу. Поэтому отведение тепла наружу будет ничтожным, температура окружающего пространства почти не изменит-

ся и кристалл будет расти довольно быстро, что графически выразится некоторым температурным перепадом.

Несмотря на это, в вопросах механизма образования внутри- и внеклеточного льда существует еще много неясностей. Например, не выяснено, как влияет скорость переохлаждения на формирование внутриклеточных ядер, каковы закономерности этого процесса и его пусковые механизмы. Слабо исследованы теплодинамические процессы кристаллообразования в биологических объектах и их связи с явлениями кристаллизации и рекристаллизации.

Механические эффекты замораживания. До настоящего времени нет ясности в вопросе, происходят ли механические повреждения клеток при замораживании, и если они имеют место, то обратимы ли эти процессы. Некоторые наблюдения (рис. 50) показывают, что они, очевидно, могут происходить, однако большинство данных говорит в пользу того, что если такие криоповреждения и наступают, то они подвергаются быстрой регенерации после оттаивания пробы [810]. Почти во всех случаях, связанных с гибелью клеток в результате внеклеточного образования льда, не удалось установить, что гибель связана именно с механическими повреждениями. Однако то, что клетки и ткани выживают даже при внеклеточном замораживании или в иных, лучших для них условиях, свидетельствует о том, что физическое присутствие внеклеточных кристаллов льда не обязательно должно вызывать летальный исход. При образовании внутриклеточного льда после замораживания клеток животных и растений, наоборот, наблюдаются очень частые повреждения. Правда, клетки животных, хотя и подвергаются внутриклеточной кристаллизации, они более приспособлены к регенерации, чем клетки растений [58, 59, 698, 699].

Шерман [733—735] считает, что более значительные разрушения клеток возникают при быстром замораживании, когда образуются кристаллы меньших размеров, причем в этом случае допускаются значительные механические повреждения клетки в связи со сложностью ее внутренней компоновки и роста внутриклеточных кристаллов. Однако четких доказательств в пользу этого пока нет. Конечно, очень быстрое замораживание может вызвать механические большие повреждения биологических тканей и затвердение внешней поверхности еще до полного промерзания вследствие очень быстрого расширения их внутренних частей. Более того, после полного замораживания ткани могут разрываться при резких температурных изменениях, которые возникают в результате появления значительных тепловых градиентов с большими напряжениями, обусловленными расширением. Действительно, под электронным микроскопом видно, что при очень быстром замораживании и высушивании бычьих сперматозоидов происходит их полное разрушение или отмечается отсутствие внешней мембраны. Использование крифилактиков в таком случае полностью предохраняет объект от разрушения.

Однако в настоящее время считают, что наблюдаемые в клетках механические повреждения являются не прямым следствием влияния кристаллов льда, а результатом резкого осмотического шока. Действительно, в ряде экспериментов показано, что быстрое замораживание эритроцитов в присутствии полимерных криофилактиков дает более высокую выживаемость при отогревании их в изотоническом солевом растворе с примесью защитных агентов. Если эритроциты оттаивали в изотоническом растворе солей, то наблюдались значительные повреждения клеток. Поскольку полимерные криофилактики представляют собой поверхностно активную молекулу, то предполагают, что они обволакивают клетки в момент оттаивания, обеспечивая этим механическую защиту от гемолиза, обусловленную осмотическими напряжениями. Следует также указать на возможность повреждения клеток в результате теплового воздействия (тепловой удар). Оказывается, что некоторые биологические системы весьма чувствительны к быстрым изменениям температуры даже при отсутствии предварительного замораживания. Очевидно, ответственным компонентом за тепловую чувствительность клетки являются некоторые формы липидов. Показано, что процедуры, ведущие к уменьшению в мембранах лецитина, снижают чувствительность клетки к тепловому воздействию. Повторное введение лецитина в эритроцитарную суспензию частично восстанавливает их чувствительность к тепловому удару. Поэтому предполагают, что дифференциальное тепловое расширение липидно-протеиновых компонентов клеточной мембраны является, очевидно, причиной гемолиза в результате теплового удара [495, 496, 759].

Биохимические последствия замораживания. Считают, что в случае охлаждения сложных биологических систем до температуры выше точки замораживания нарушенные биохимические процессы в них оказываются обратимыми. Летальный исход при замораживании среди гомойотермных животных обычно связан с изменением таких физических функций, как дыхание или кровообращение, в которых особую нужду испытывают периферические области. Однако большинство живых организмов выживает сравнительно легко при переохлаждении, хотя их метаболические процессы, как и у гомойотермных животных, также зависят от температуры тела. Вероятно, что если бы не кристаллизация воды, температуру клеток и тканей таких животных удалось бы снизить еще больше, вплоть до полного прекращения жизненных процессов, что позволило бы сохранить их в течение длительного времени. Однако в действительности при температурах несколько ниже нуля вода начинает кристаллизоваться со всеми вытекающими отсюда последствиями. Кроме физического роста кристаллов льда и морфологических повреждений экстрацеллюлярного пространства в результате непосредственно низкотемпературного воздействия возникает явление дегидратации, поскольку «чистая» вода из клеток очень быстро вымораживается и участвует в формировании крис-

таллов льда во внеклеточном пространстве. В связи с этим в клетках постепенно повышается концентрация растворенных веществ. Процесс дегидратации клеток при замораживании по-разному отражается на их структурно-метаболическом состоянии. Например, эритроциты можно замораживать до температуры —3°, при этом удаляется до 80% воды, но гемолиз не происходит. Вместе с тем удаление около 79% воды из мышечного волокна приводит к летальному исходу. Например, личинки хирономий переносят потерю до 90% воды при замораживании, а такие простейшие, как Metazoa, могут также длительно сохраняться, если их подвергнуть дегидратации до замораживания. Имеются данные о том, что частичное замораживание переносят и некоторые млекопитающие. Описаны эксперименты по выживанию хомяков после замораживания, когда температура в подкожной клетчатке у них снижалась до —2 —4,5°, а во внутренних органах — до —1 —2° [762]. При этом кристаллизовалось примерно 50% воды их тела. Все это лишний раз подтверждает факт, что повреждение не обязательно должно быть связано с физическим присутствием льда, а может быть результатом избыточной дегидратации либо повреждающего действия концентраций растворенных веществ. Кроме того, полагают что при замораживании нарушаются связи в липопротеиновых комплексах мембран, что является немаловажным биохимическим механизмом криоповреждений.

Как известно из данных литературы, в отличие от простых белков липопротеины не удерживаются сильными ковалентными связями, их ассоциации значительно слабее. Лавлок [497] считает эти комплексы как бы «наследственно неустойчивыми», которые удерживаются лишь благодаря беспрерывному обновлению в процессе синтетических процессов. Более того, эти комплексы могут довольно быстро распадаться уже при небольших изменениях в среде, изменяя тем самым ковалентные связи в других соседних макромолекулах белков. К таким изменениям, вызывающим распад липопротеинового комплекса, прежде всего следует отнести увеличение концентрации электролитов с последующим повышением ионной силы среды, изменением pH, концентрации растворенных веществ. Кроме того, процесс дегидратации способствует пространственному сближению макромолекул и их физическому контакту. При очень низких температурах повреждение клетки аккумулируется медленно, а интенсивность повреждений увеличивается с повышением температуры и становится максимальной вблизи точки замерзания (но не в ней), поскольку в этой зоне из раствора вымораживается мало воды и очень сильно повышается концентрация растворенных веществ и электролитов в клетке, что способствует значительным повреждениям. Однако не следует думать, что соотношение между температурой и интенсивностью повреждения при замораживании будет таким же, как и при оттаивании. Дело в том, что при отогреве остается больше воды в замороженном состоянии, чем бывает при охлаждении при такой же температуре. Поэтому

при температуре —2 —3° будут происходить более серьезные повреждения, чем при охлаждении в интервале таких же температур.

Концентрационные факторы криоповреждений. Значение повышенной концентрации солей как криоповреждающего фактора было установлено вначале на водорослях. Отмечено, что эти растения очень быстро погибали, если их перенести в концентрационный раствор морской воды. Несколько позже эксперименты по выяснению эффекта концентрированных растворов были проведены на различных клетках, и особенно эритроцитах. Было обращено внимание на соотношение концентрации солей и проницаемость мембраны клеток. Оказалось, что при повышении концентрации солей (особенно NaCl) выше физиологических значений происходит потеря фосфолипидов мембранами клеток, что значительно повышает ее проницаемость для катионов. При отогреве таких клеток в связи с резким перепадом ионной силы наступает их осмотический лизис. Вместе с тем известно, что для удаления фосфолипида из клеточных мембран требуется несколько минут, в то время как гемолиз, вызванный замораживанием, происходит мгновенно. Более того, оказалось, что быстрое оттаивание должно вызывать более сильный осмотический лизис. Однако в действительности быстрое оттаивание никогда не вызывает повреждений замороженных клеток, а, наоборот, способствует их быстрой регенерации.

В дальнейшем было показано, что между степенью повреждения клеток при замораживании и концентрацией электролита имеется непрямая зависимость. Например, гладкая мышца хорошо регенерирует после размораживания, когда концентрация электролитов в среде остается постоянной при замораживании, что можно достичь путем постепенного добавления такого крифилактика, как ДМСО. Следовательно, играет роль не столько содержание электролитов в среде, сколько их концентрационные перепады в процессе замораживания и оттаивания. Помимо значения электролитов исследовался механизм действия и других соединений. Например, рассматривался вопрос о возможном увеличении в процессе низкотемпературного замораживания концентрации ферментов и повышения их активности в клетке по отношению к белкам и другим компонентам клетки. Некоторые ферменты, такие как дегидрогеназы, относительно чувствительны к замораживанию, а каталаза и липаза, наоборот, более активны именно при замораживании, чем при охлаждении в пределах такой же температуры. Таким образом, замораживание может способствовать значительному накоплению промежуточных веществ в цепи реакции ферментов [398, 802].

При обезвоживании клетки вследствие замораживания изменяется реакция субстратов, участвующих в обменных процессах. Например, при исследовании первичной реакции между глюкозой и казеином было выявлено, что одна молекула углевода при низких температурах связывается со свободной группой белка. При добавлении определенного количества воды в клетку эта связь становится

довольно прочной, после чего дополнительная дегидратация не вызывает существенных изменений этой связи. Полагают, что в процессе обычного метаболизма при нормально гидратированном слое реакции подобного рода не протекают. Когда дегидратация достигается с помощью замораживания, свободные связи аминогрупп белков могут связывать энергетически важные субстраты, что вызывает дополнительные повреждения в отогретой клетке [455].

Изменение концентрации водородных ионов (pH.) Максимальная денатурация белков при замораживании наблюдается при температуре —3°; при дальнейшем снижении температуры явления денатурации уменьшаются. Наряду с этим очень быстро снижается и pH раствора, уровень которого при —3° достигает примерно 5—5,8. При дальнейшем понижении температуры pH обычно выравнивается. Таким образом, было выяснено, что белок денатурируется уже при температуре выше точек замерзания, причем этот процесс тесно связан с концентрацией электролитов и снижением pH ниже 6. Образцы тканей, замороженные с первоначальным pH 6,2, подвергаются более сильной денатурации, чем пробы, имеющие до замораживания pH 6. При медленном замораживании молока до температуры —30° pH в нем падает с 7 до 5,8. Быстрое замораживание вызывает очень незначительное изменение этого показателя. Весьма тщательные исследования pH при замораживании водно-солевых растворов были проведены в 1952 г. Ван дер Бергом и сотрудниками [860, 861]. По их фазовым диаграммам можно предсказать последовательность эвтектической температуры и связанные с ней изменения pH растворов для любой концентрации солей. Эти диаграммы также свидетельствуют о том, что показатели pH претерпевают довольно значительные колебания, особенно в присутствии NaCl, который, как правило, вызывает дополнительное снижение pH во время замораживания, а также влияет на pH эвтектической температуры. KCl в этом отношении действует иначе и, как правило, не изменяет pH эвтектической температуры.

Установлено, что pH всех эвтектических растворов, содержащих NaCl, при добавлении к фосфатам составляет менее 4, а pH того же раствора, содержащего KCl,— 6. В связи с этим были сделаны выводы, что для замораживания биологических материалов целесообразнее пользоваться сбалансированными растворами, содержащими только соли калия, которые образуют слабощелочные растворы с pH 7,5.

Денатурация и молекулярный контакт. Как уже отмечалось, важным механизмом криоповреждений является изменение липопротеинов мембран клеток [492—495].

Исследования, проведенные на изолированном липопротеине, показали, что денатурация этого комплекса, предварительно взвешенного в 0,16M NaCl, была ничтожной при температуре —20°. Такая устойчивость липопротеина в присутствии высоких концентраций солей подтверждалась также при погружении липопротеина в насыщенный раствор NaCl на 24 ч. При этом отмечалась незначитель-

ная потеря его растворимости. Последующие эксперименты с буферными растворами и при изменении pH не позволили установить каких-либо соотношений между pH и повреждением липопротеинов при замораживании. Однако, когда липопротеин замораживают в различных солевых растворах, эвтектическая температура которых колеблется от —4 до —86°, денатурация бывает очень выраженной при более высокой эвтектической температуре. Это происходит в результате дегидратации клеток до уровня, способствующего физическому контакту липопротеиновых молекул. При добавлении в среду 0,5% метанола или 0,7% глицерина денатурация этого комплекса при замораживании не происходит, причем такого количества криофилактиков достаточно только для того, чтобы предотвратить кристаллизацию того минимального количества воды, которое необходимо для поддерживания белка в нативном состоянии. Можно думать, что образование физических контактов между белками способствует образованию нежелательных связей, приводящих к изменению их функции или разрыву при повторной гидратации. Согласно гипотезе Лавлока [491, 493, 495], защитный эффект проникающих внутрь криофилактиков сводится именно к заполнению пространства между структурами клетки, что предотвращает контакты при замораживании. Оказывается, что при замораживании в растворах формируются активные фотодимеры (например, 1,3-диметилурацил), которые образуют зоны концентрированных растворенных веществ, обусловливающих контакт молекул, способствующий их полимеризации. Большинство экспериментов, проведенных на моллюсках и эритроцитах человека, показывает, что летальный исход связан не с температурой, которая в разных тканях различная, а зависит от количества вымораживаемой воды ниже критического уровня. Поэтому в описанных опытах по замораживанию миозина [281—283, 341—343] хорошие результаты были получены именно потому, что удалось сохранить некоторую адекватную промежуточную жидкую фазу, предупреждающую пространственный контакт биоструктур. Дальнейшие опыты по замораживанию этого белка показали, что характер его криоденатурации очень напоминает денатурацию под влиянием мочевины, сущность которой сводится к изменению молекулярной конфигурации белка.

Тот факт, что мочевина оказывает действие, аналогичное замораживанию, подтверждает общие взгляды о том, что разрыв водородных связей в белке является наиболее частым механизмом, вызывающим повреждения при замораживании. Как известно, мочевина — это вещество, которое очень сильно связывает водород, и потому можно думать, что она нарушает водородные связи на той же конкурирующей основе, что и процесс дегидратации. Предполагают также, что денатурирующий эффект мочевины, как и процесс дегидратации при замораживании, может быть обусловлен ее способностью растворять структурную воду, которая оказывает стабилизирующее действие на определенные боковые цепи аминокислот [434, 435].

Согласно модели Левитта [467—469], повреждение белковых структур при замораживании происходит в результате пространственного сближения поверхностей макромолекул и их конформационных изменений, наступающих в результате нарушения водородных связей между растворителем и биомолекулами. Предполагают, что в основе молекулярного механизма этого криоповреждения лежит окисление сульфгидрильных групп белков в направлении образования более прочных дисульфидных связей между соседними белковыми молекулами или даже отдельными участками одной и той же молекулы. При вторичной гидратации такой макромолекулы S—S-связи, обладающие энергией связи 50—60 *кал*, не разрушаются, в то время как остальные части биомолекулы разрушаются за счет разрыва более слабых связей, таких, например, как водородные. То, что этот механизм имеет место, косвенно подтверждалось количественным увеличением титруемых S—S-групп в биологическом материале в том случае, когда происходило их криоповреждение. Предполагают, что развитие холодоустойчивости во многом зависит от образования излишних запасов НАДФ·Н, который способен либо восстанавливать S—S-группы до SH, либо предотвращать образование S—S-групп.

Более высокое содержание SH-групп в растениях, подвергнутых холодовой закалке, свидетельствует о развитии повышенной устойчивости этих групп к окислению в условиях пониженных температур, что имеет большое значение в сохранении их ферментативной активности [714]. Несколько позже положения этой гипотезы проверялись экспериментально на модели замороженных до температуры —196° хлоропластов в присутствии таких сульфгидрильных соединений, как цистеин и глутатион. Поскольку эти соединения содержат большое число SH-групп, то была надежда, что они могут при окислении конкурировать с SH-группами хлоропласта и таким образом повышать защиту хлоропластов при замораживании. Однако как в опыте, так и в контроле не было выявлено каких-либо различий в содержании SH-групп и криоустойчивости растений к замораживанию. В связи с этим было сделано заключение, что окисление SH-групп не является столь важной причиной криоповреждений, как это предполагали раньше. Концепция сульфгидрильного окисления поддерживается и в настоящее время, поскольку было показано, что инактивация при замораживании дегидрогеназы триозофосфата мышцы кролика и дегидрогеназы молочной кислоты мышцы сердца понижается при добавлении в среду инкубации такого сульфгидрильного соединения, как β-меркаптоэтанол, т. е. при блокировании активного центра фермента. Кроме того, было установлено, что глутатион оказывает некоторый защитный эффект по отношению к глутаминодегидрогеназе печени быка и неочищенной дегидрогеназе молочной кислоты [853, 854].

Хебер и соавторы [357—362] установили, что очень чувствительными к замораживанию являются ферментативные системы большинства растений, участвующие в переносе электронов при фотосинтезе.

Например, уже после двухчасового замораживания хлоропластов до температуры —25° происходит полное разобщение окислительного фосфорилирования. Добавлением в среду 1—2%-ного раствора сахарозы почти полностью предотвращают указанные изменения в хлоропластах. Оказывается, что именно такое повышение концентрации сахаров наблюдается в растениях при их естественной холодовой закалке. Было также установлено, что сахароза предохраняет цепь транспорта электронов от криоповреждений даже в присутствии солевых растворов, концентрация которых может быть выше 0,15 М.

Таким образом, приведенные выше экспериментальные данные свидетельствуют о том, что основным фактором, обусловливающим повреждение клетки, является ее низкотемпературная дегидратация. Конечно, при этом следует учитывать и такие факторы повреждения, как высокое содержание солей и непосредственно низкая температура. Обезвоживание клетки ведет к очень быстрому разрыву водородных связей в липопротеинах, скорее всего в системе вода — белок, которые, как известно, стабилизируют эти макромолекулы и препятствуют их взаимодействию. Считают, что сахароза и другие защитные соединения способствуют удержанию функциональной воды в клетке путем стабилизации водородных связей внутри этой системы либо непосредственно на поверхности макромолекулы.

Нарушение структурной воды. В настоящее время существование высокоструктурированной воды, окружающей молекулы белков и других макромолекул, не вызывает особых возражений. Известно, что вода в таком состоянии находится в тонких межмицеллярных каналах, особенно мембран, извитых капиллярных сетях эндоплазматического ретикулума и других мембранных структурах клетки [279, 360, 361, 434, 435]. Функция полимерной воды в составе клеток весьма разнообразна: она стабилизирует конформацию белковых цепей, регулирует специфическую проницаемость мембран, участвует в транспорте протонов, обусловливает передачу структурной информации на биомакромолекулах. Ввиду функционально-структурной важности полимерной воды в жизнедеятельности клеток целесообразно рассмотреть вопрос об изучении ее структуры при низких температурах.

Как известно, вода составляет 30—50% систем мембран клетки и более 5—10% ее участвует в их формировании и стабилизации. Эта вода, как считают, не замерзает при низких температурах. Однако нам пока мало известно об изменениях в системе структурной воды при дегидратации клетки и при замораживании биологического объекта. Особенно это касается физиологического состояния воды в мембранах в процессе воздействия низких температур. Таким образом, эта проблема пока мало разработана, хотя очень важна при разработке общей теории криоповреждений биологических объектов.

Как видно, существует множество механизмов повреждений при замораживании. Однако все эти механизмы играют неодинаковую

роль в нарушении жизнедеятельности клетки под влиянием низких температур. Очевидно, имеется какая-то зависимость между интенсивностью криоповреждений и состоянием той системы, на которую действует низкая температура. Нам еще мало известно (вернее этот момент не учитывается), к чему может привести предварительная подготовка тканей к замораживанию. Системы, которые оказывают сопротивление холодовому воздействию, могут повреждаться в силу неучитываемых факторов повреждения. Поэтому предстоит дальнейшее углубленное экспериментальное изучение процессов, происходящих в клетках при действии низких и сверхнизких температур.

Глава V

ДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ФЕРМЕНТЫ

Изучение физико-химической структуры и функции индивидуальных ферментов и ферментативных систем имеет большое значение в криобиологических исследованиях в связи с возможностью повреждения их низкими температурами при длительном хранении различных объектов. В связи с этим представляет интерес криобиохимическое изучение структурно-функционального состояния различных ферментов как в очищенном виде, так и в составе клеток, где они могут находиться в виде свободных водорастворимых ферментов, энзимов, ассоциированных с биологическими мембранами, а также мультиэнзимных комплексов, обеспечивающих катализ основных ферментативных циклов клеток.

Изучение состояния ферментов в тканях при их низкотемпературной обработке было предметом многих исследований. Уже в 1940 г. Люйе и Гехенио [514] показали, что летальные повреждения биологических объектов при замораживании могут быть связаны с денатурационными изменениями макромолекул каталитических белков. В литературе существуют различные мнения о сохранении нативности ферментов после низкотемпературных воздействий и процессов оттаивания.

В настоящее время известно, что многие ферменты функционируют при низких температурах, хотя, конечно, скорость каталитических реакций для подавляющего числа энзимов постепенно замедляется с понижением температуры. Например, в мышце лягушки гликолитический цикл протекает при температуре —5° и даже —10°, о чем можно судить по накоплению в ней молочной кислоты. Образование лактата в мышце другого животного — терпуга происходит при —20° и даже при —30° [806]. Вначале считали, что большинство ферментов при замораживании и оттаивании не теряет своей активности. Позже было показано, что устойчивостью к низким температурам обладают главным образом водорастворимые ферменты, в то время как ферменты, встроенные в структурные белки (например, глутамиидекарбоксилаза, АТФаза, энзимы окислительного фосфорилирования и т. д.), являются более чувствительными к холодовому воздействию.

Такие ферменты, как липаза, трипсин и инвертаза, при понижении температуры сохраняют свою активность в мышцах, причем

скорость гидролиза субстрата экспоненциально возрастает согласно уравнению Аррениуса [749]. Однако при температуре —2° активность этих ферментов снижается примерно в пять раз по сравнению с исходным. В противоположность этому АТФазная активность миозина в мышцах повышается в процессе низкотемпературного хранения. Фермент в течение трех месяцев сохраняет устойчивость при температуре —18° [619—621], однако быстро подвергается деградации при —3,5°. Эта активность сохраняется даже тогда, когда актомиозин оказывается уже полностью нерастворимым [226].

Примером подобного рода поведения фермента в замороженной ткани печени является также маликоэнзим, который быстро теряет активность при температуре —7°, хотя при —29° он может сохраняться в течение длительного времени [320]. Другие ферменты при низких температурах относительно стабильны. Хорошо сохраняется при низких температурах, например, активность ферментов гликолиза, таких как глюкозо-6-фосфатазы [205], и некоторых ферментов обмена липидов, такие как фосфолипаза, которая, наоборот, активируется в замороженной ткани, а при 0° проявляет более низкую активность [500]. Причиной этого уникального процесса, как считают, является явление так называемого концентрирования фермента в результате пространственного сближения его компонентов.

Большинство так называемых растворимых ферментов гликолиза локализовано непосредственно в цитоплазме. Ключевыми ферментами этого цикла являются: гексокиназа (белок, содержащий SH-группы), фосфофруктокиназа — лимитирующее звено цикла; SH-содержащий фермент — ФГАД; пируваткиназа и лактикодегидрогеназа. Ферменты, включающие в свою структуру SH-группы, представляют интерес в криобиологическом аспекте с двух точек зрения. Во-первых, SH-группы ферментативного белка участвуют в связывании важнейших коферментов (НАД, НАДФ, ФМН, ФАД, КОА и др.), без участия которых не могут осуществляться важнейшие функции клетки, связанные с ее биоэнергетикой. Во-вторых, SH-группы стабилизируют структурно-химическую конфигурацию макромолекул белков. Согласно данным Чанга и сотрудников [205], даже незначительное замораживание до температуры —5° и хранение в течение 10 недель миофибриллярных белков курицы приводит к потере белками SH-групп, снижению их растворимости и способности к связыванию воды. Это свидетельствует о том, что низкотемпературное хранение каталитических белков сопровождается разрушением SH-групп, ответственных за структурную целостность и ферментативные свойства белков. Выяснилось, что такие стандартные криофилактики, как ДМСО, глицерин, оказывают тормозящее влияние на межмолекулярное образование S—S-связей в тканях, что было доказано в модельных опытах с тиогелем [727].

Подтверждением того, что низкие температуры оказывают инактивирующее действие на цитоплазматические ферменты, являются опыты с замораживанием эритроцитов. Замораживание эритроцитов до температуры —196° на короткий срок и последующее

их оттаивание ведет к значительному снижению активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы и изоэнзимов лактикодегидрогеназы. При таких условиях фосфофруктокиназа теряет свою активность в незначительной степени, но ее аллостерический центр для активирующего эффектора АТФ разрушается. Пируваткиназа и гексокиназа обладают относительной устойчивостью к таким режимам замораживания и оттаивания. Однако при удлинении сроков хранения до пяти дней указанные выше очищенные ферменты, замороженные без криофилактиков, теряют полностью свою активность [772]. Следует отметить, что хорошим криопротекторным эффектом по отношению к ключевым гликолитическим ферментам обладает вновь синтезированное соединение — гидроксиэтилкрахмал, который позволяет хранить некоторые клетки в жидком азоте длительное время.

Таким образом, изучение ключевых ферментов гликолитического цикла в процессе низкотемпературной обработки клеток может дать объективную картину устойчивости структурных клеток к действию низких температур. Очевидно также, что прямое биохимическое изучение лишь активности этих ферментов в составе клеток крови является явно недостаточным для конечной оценки активности цитоплазматических и мембранных ферментов и должно быть дополнено биофизическими методами изучения активных центров фермента и его конформационным состоянием (методы ЯМР, спектрополяриметрия, спектрофлуориметрия и другие спектрофотометрические методы).

Представляется весьма перспективным исследование динамики активности того или иного фермента в средах замораживания после деконсервации клеток, поскольку объем и степень криогенного повреждения структур должны коррелировать с освобождением ферментов из органелл клетки и их поступлением в окружающую среду. Целесообразность такого методического подхода к исследованию активности ферментов иллюстрируется рядом работ, в которых изучалась активность ферментов как во внеклеточной, так и внутриклеточной среде [321]. В этих работах обращается внимание на то, что в зависимости от скорости замораживания и эквилибрации различных классов криопротекторов наблюдается различное по интенсивности нарастание активности фермента в среде хранения в результате выхода ферментов из клеток.

В настоящее время установлено, что любые субклеточные образования (ядро, митохондрии, рибосомы, лизосомы, эндоплазматическая сеть) могут повреждаться при различной интенсивности и скорости замораживания и оттаивания. Общие принципы влияния низких температур на организованные энзимные системы лучше всего изучать на изолированных митохондриях и лизосомах. Показано, что увеличение активности некоторых ферментов митохондрий и ферментов лизосом наблюдается при их замораживании низкими температурами или в момент оттаивания. Последнее известно в литературе как процесс «латентного» повреждения [212]. В опытах,

в которых смешивались митохондрии и лизосомы, было обнаружено, что к «латентным» митохондриальным ферментам относятся прежде всего такие, как цитохромоксидаза, дегидрогеназы глутаминовой, изолимонной, яблочной кислот и гидроксибутираза. К латентным гидролазам также относятся АТФаза, ацетил-СоА-гидролаза и щелочная ДНКаза. В дальнейшем были выявлены две латентные гидролазы и две трансферазы. В обстоятельной работе Бендала и соавторов [145] установлены различия в проявлении активности между тремя митохондриальными дегидрогеназами и лизосомальной кислой фосфатазой.

Такие модельные системы подвергали замораживанию и оттаиванию, осмотическим изменениям и другим разрушительным эффектам [145, 212]. При пятикратном замораживании и оттаивании таких смесей почти полностью выделяется лизосомальная кислая фосфатаза в среду, в то время как митохондриальные ферменты оказываются более стойкими. Например, для дегидрогеназ глутаминовой кислоты и гидроксибутирата потребовалось 16-кратное замораживание — оттаивание, для того чтобы снизить 70% активности.

В последнее время продолжают публиковаться работы, посвященные криоденатурации различных ферментативных белков, например каталазы [608, 737, 738], миозина [226, 227], ЛДГ и ГОТ [200, 402, 403, 439, 411, 532, 830, 851], сукцинат-цитохром-С-редуктазного комплекса [287—289], гидролитических ферментов лизосомального и митохондриального происхождения [801, 802]. Необходимо отметить, что в указанных работах рассматривается главным образом изменение активности того или иного фермента при замораживании — оттаивании и в присутствии криопротекторов, однако очень мало исследована их молекулярная структура.

Низкотемпературное повреждение ферментов в биологических объектах происходит в результате действия комплекса факторов, таких как дегидратация, повышение концентрации электролитов, среди которых особый биологический интерес представляют хлористые соли натрия, NH_4^+, калия, а также некоторых анионов —Cl^-, F^-, J^-, SO_4^{--}, NO_3^- и ацетата [837]. Не меньший интерес представляет исследование поведения ферментов в растворах различных криофилактиков, используемых для защиты биологических объектов от повреждающего действия низких температур. В этом отношении широко изучаются такие криопротекторы химического происхождения, как глицерин, ДМСО, моноспирты — метанол, этанол, изопропанол, этилен, пропиленгликоли, полиэтиленоксиды (ПЭО) и ПВП различного молекулярного веса, оксиэтилированные производные пентаэритритов, глицерина и др. [81—87, 564, 679—683]. Как известно, точки замерзания водных растворов некоторых из этих веществ довольно низкие. Например, точка замерзания 60%-ного раствора глицерина равна —30°, 40%-ного метанола — 40°, 5М ацетата натрия —18,5°, 23%-ного раствора натрия —21°. Защита ферментов от криоденатурации может быть хорошо осуществлена

специфическими и неспецифическими кофакторами, некоторыми нейтральными растворимыми соединениями, содержащими в своем составе SH-группы. Подобного рода соединения (цистеин, глутатион) оказывают защитный эффект по отношению к таким SH-ферментам, как глутамат- и глицеральдегидфосфат дегидрогеназы [214, 801, 802,853, 854]. Многие SH-ферменты быстро подвергаются окислению даже при комнатной температуре и требуют для сохранения своей активности in vitro присутствия цистеина или другого SH-соединения с низким молекулярным весом. Выделенные из свежих листьев растений НАД и НАДФ зависимые глицеральдегидфосфат дегидрогеназы и каталаза могут вообще не подвергаться криоденатурации, если в среду добавлены цистеин или глутатион. Эксперименты показывают, что их активность в этом случае очень близка к нормальным показателям.

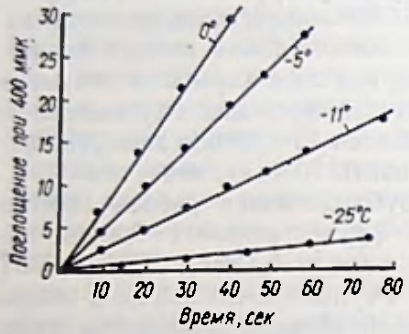


Рис. 51. Кривые скорости реакции щелочной фосфатазы в водном 60%-ном растворе глицерина при различных температурах [529].

Таким образом, использование этих растворов позволяет получать переохлаждение среды до температур, реально существующих при замораживании биологических жидкостей. Однако использование их для исследовательских целей должно проводиться с таким расчетом, чтобы, снижая точку замерзания реактивных водных систем до интересующих нас температур, добавленные криофилактики были вместе с тем совместимы с реакциями энзиматического катализа, т. е. не оказывали при этом тормозящего влияния на ход нормальной ферментативной реакции. Считают, что подходящими растворами для изучения поведения ферментов в зоне низких температур являются такие моноспирты, как метанол, этанол, изопропанол, а из гликолей наибольший интерес представляют различные модифицированные глицерины, а также этилен- и пропиленгликоли, которые изучены более детально. В частности, при низких температурах методом прямой спектрофотометрии в этих растворах изучена активность фосфатазы и пероксидазы [529]. На рис. 51 в качестве примера показана измеренная прямым спектрофотометрическим способом скорость реакции (активности) щелочной фосфатазы, катализирующей гидролиз *п*-нитрофенилфосфата. При этом четко видна скорость начальной реакции и ее динамика. Вместе с тем необходимо отметить, что определение активности ферментов в таких модельных условиях в присутствии криофилактиков очень сильно отличается от истинного состояния ферментов, которые находятся в биологической среде при низкой температуре главным образом из-за возможности влияния криофилактика непосредственно на конформацию фермента и их различий в структурно-энерге-

тических состояниях. Известно, что каталитическая активность ферментов как гетерогенных катализаторов определяется наличием на их поверхности особых участков ограниченного размера — активных центров, обладающих специфической реакционной способностью. Многие ферменты, например ферменты переноса электронов и окислительно-восстановительных реакций, биосинтеза белка и ряд других ферментов, функционируют будучи «вмонтированными» в сравнительно жесткие структурные компоненты клетки (рибосомы, митохондрии), обладающие макроповерхностью раздела. Это свидетельствует о существовании в клетках иных, чем в растворе, межмолекулярных взаимодействий, связанных прежде всего с образованием гидрофобной рубашки вокруг белковой глобулы. Если в качестве примера рассмотреть влияние мочевины на активность внутриклеточных ферментов [342, 343], то можно видеть, что АТФазная активность изолированного из клетки миозина уже полностью инактивируется в растворе 2М мочевины, в то время как этот же фермент, локализованный в мышечном волокне, не изменяется даже в присутствии 10 М раствора мочевины (рис. 52). Приведенный рисунок наглядно иллюстрирует поведение фермента в клетке и в изолированном состоянии. Аналогичные данные были получены в других исследованиях по изучению действия различных добавок на температурную инактивацию Na^+- и K^+-АТФаз, 5-нуклеотидаз, непосредственно в плазматических мембранах клеток и на моделях очищенных ферментов в растворах [276]. Значительные различия в температурных зависимостях каталитических активностей были выявлены при исследовании таких ферментов, как тимидинкиназа, аденозинкиназа и уридинкиназа в растворе и клетке [716].

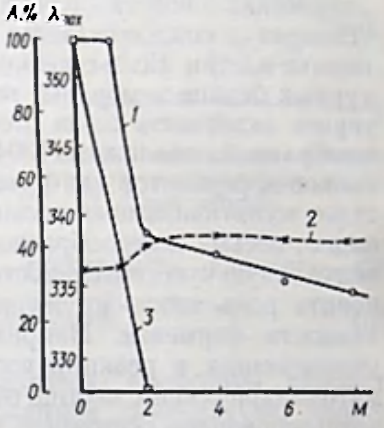


Рис. 52. Влияние различных концентраций мочевины на АТФазную активность (*1*) и положение максимума флуоресценции (*2*) миозина, находившегося во время действия мочевины в мышце, а также на АТФазную активность растворов миозина (*3*).

Необходимо отметить, что помимо различий в активности ферментов в растворах клеток наблюдается индивидуальное различие в температурной чувствительности одних и тех же ферментов в составе различных мембран (печень, неоплазма, сердце и др.) и, более того, различных ферментов в составе одной и той же мембраны. Следовательно, при изучении поведения ферментов в зависимости от температуры либо других факторов необходимо учитывать эти особенности, поскольку основной предпосылкой, обусловливающей изменение свойств фермента, является именно структура мембранного микроокружения энзима (подложка). Такое представление о значении структуры мембранного микроокружения позволяет

понять результаты различных опытов по изучению инактивации ферментов в клетках сравнительно мягкими температурами (до 0°) и другими модифицирующими мембрану химическими (поверхностно-активными) веществами или физическими (ультразвук) воздействиями. Понижение температуры среды, окружающей клетку, в значительной мере меняет микроокружение фермента, а переход в зону субнулевых температур и особенно достижение эвтектической точки очень сильно изменяет осмотическую среду, pH и другие химические параметры, которые нарушают «монтировку» фермента в полимолекулярных комплексах для проявления его каталитических свойств. Кроме того, переход клетки в зону низких температур сопровождается изменением функции генетического аппарата клетки. Если генетически повредить синтез одного из структурных белков мембраны, то локализованные в ней ферменты могут терять активность из-за отсутствия места для включения в состав мембранной подложки [304]. Все же исследование очищенных белков и ферментов как в модельных системах in vitro, так и в составе мультиэнзимных ассоциированных комплексов in vivo, очевидно, весьма целесообразно, поскольку позволяет выяснить индивидуальную чувствительность энзима к низким температурам и установить роль микроокружения для сохранения каталитической активности фермента. Например, один из каталитических белков, участвующих в реакции сопряжения у нефосфорилирующих субмитохондриальных частиц, очень быстро инактивизируется холодом в изолированном состоянии, а in vivo весьма устойчив к низким температурам [337, 659].

Не менее важной задачей при изучении скоростей энзиматических реакций в биологических объектах при низких температурах является определение ряда термодинамических констант, в частности таких, как энтальпия, энтропия, энергия активации и других кинетических параметров. Как видно, при понижении температуры возникает множество факторов, сильно влияющих на скорость реакции, протекающей с участием фермента. Сюда относятся концентрация субстрата, температура, pH, отсутствие или наличие металлов и т. д. Все эти факторы прямо или косвенно изменяют свои характеристики в зависимости от температуры.

ТЕРМОДИНАМИКА И КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ СУБНУЛЕВЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Известно, что скорость большинства химических реакций зависит от температуры, причем с понижением температуры скорость реакции обычно уменьшается, а с повышением температуры до определенного уровня — увеличивается (рис. 53). Это в полной мере относится и к ферментам. Качественно характер зависимости скорости реакции от температуры вполне понятен, поскольку увеличение или уменьшение кинетической энергии должно способствовать их химическому взаимодействию либо, наоборот, тормозить взаимодействие.

Однако ранее было отмечено, что изменение температуры оказывает количественно неодинаковое влияние на скорость различных реакций. Аррениус, используя работы Худа и Вант-Гоффа, нашел зависимость, связывающую скорость химической реакции с температурой. Оказалось, что производная от логарифма константы скорости температурной реакции обратно пропорциональна квадрату абсолютной температуры:

$$\frac{d \ln K_{+2}}{dT} = \frac{E}{RT^2}, \qquad (54)$$

где R — универсальная газовая постоянная (1,987 *кал/моль · град*); E — энергия, которую следует сообщить реагирующей системе молекул для перехода ее из исходного состояния в промежуточное активирование; K — константа скорости реакции, T — температура, °С. Уравнение Аррениуса в интегральной форме может быть записано как

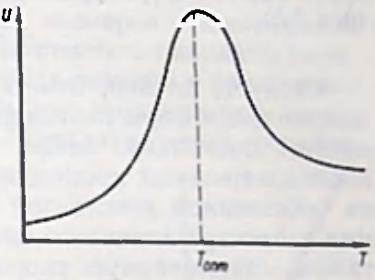


Рис. 53. Схема влияния температуры на скорость ферментативной реакции.

$$\ln K_{+2} = \frac{E}{RT^2} + \text{const}, \qquad (55)$$

из которого следует, что между логарифмом константы скорости реакции и величиной, обратной абсолютной температуре, должна быть линейная зависимость, т. е. графически это выражается прямой с тангенсом наклона, равным E/R. Наклон этой прямой сохранится в том случае, если вместо константы скорости K_{+2} использовать пропорциональную ей величину максимальной скорости реакции (рис. 54). Выражая зависимость $\lg V$ от $1/T$, можно получить значение энергии активации — важной кинетической константы, характеризующей одну из стадий ферментативной реакции. Чаще всего наиболее медленной и, следовательно, определяющей скорость всей реакции является стадия распада ферментсубстратного комплекса. В этом случае энергия активации, определяемая по максимальной скорости, характеризует энергетически процесс в целом. При анализе механизма действия ферментов весьма важно также исследование относительного значения энтальпии ΔH и энтропии ΔS, поскольку эти термодинамические параметры определяются конкретными межмолекулярными силами образования и распада ферментсубстратных комплексов. При этом величина ΔH характеризует изменение потенциальной свободной энергии ΔF

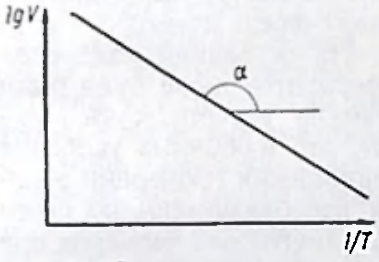


Рис. 54. Схема зависимости максимальной скорости ферментативной реакции от температуры в координатах Аррениуса.

системы при образовании и разрыве химических связей в ходе образования ферментсубстратного комплекса ES. Величина ΔS отображает меру изменения числа степеней свободы системы и, следовательно, связана со структурными (пространственными) изменениями в ходе реакции. Зная эти термодинамические параметры, можно рассчитывать температурное изменение T свободной энергии активации ΔF:

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S. \qquad (56)$$

Следует, однако, отметить, что развитие термодинамического направления ферментативной кинетики — проблема особой сложности, поскольку любая ферментативная реакция — это цепь последовательных процессов, каждое звено которой характеризуется собственной константой скорости, значениями энергии активации и пространственного фактора. Поэтому, определяя экспериментально стационарную скорость ферментативной реакции при разных T и вычисляя по этим данным термодинамические параметры, можно получить значение кажущейся ΔF, которое трудно отнести к какой-либо стадии реакции. Как показывает опыт, закон Аррениуса сохраняется для большинства химических реакций. Однако в дальнейшем было установлено, что кривая Аррениуса, построенная при различных температурах, теряет свою линейность. Это объясняется тем, что изменение каталитической функции фермента обусловлено нарушениями в распределении конформационных изомеров в макромолекуле энзима [381, 405, 406, 502, 529, 749]. Предполагалось также, что увеличение внутримолекулярных водородных связей при низких температурах сопровождается более плотной упаковкой молекулы фермента, что в свою очередь приводит к снижению его каталитической активности. На основании измерения каталитической активности некоторых ферментов ниже нуля были сделаны соответствующие термодинамические расчеты, суть которых сводится к следующему. Допускают, что в обычных условиях существует равновесие между конформационными изомерами энзима, причем один вид изомера является преобладающим по своей активности при комнатной температуре E, другой вид изомеров при изменении температуры подвергается падению активности

$$E \rightleftharpoons E_1 \rightleftharpoons E_2 \rightleftharpoons E_3 \cdots \rightleftharpoons E_i. \qquad (57)$$

Считают, что крайний конформационный изомер может подвергаться значительной инактивации — E_i. Тогда константа равновесия для крайней субъединицы может описываться как

$$K = \frac{E_i}{E}. \qquad (58)$$

Как видно, влияние температуры на скорость отдельных стадий ферментативной реакции базируется на теории переходного состояния. Согласно этой теории, взаимодействующие молекулы при их сближении образуют переходные состояния (переходный или активированный комплекс), причем между исходными и переходными

состояниями устанавливается динамическое равновесие. Вместе с тем переходный комплекс (крайний изомер) претерпевает непрерывное превращение с образованием продуктов реакции. С этой точки зрения простейшую реакцию $E \rightleftarrows E_1$ следует рассматривать как многостадийную. При отрицательном равновесии и низких температурах возрастает энтальпия ΔH системы, в результате чего происходит накопление конформационных изомеров с пониженной каталитической активностью. Необходимо отметить важность определения начальной кинетики энзиматических реакций в замороженных средах. На рис. 55 показаны результаты исследования интенсивности реакции окисления гваякола, катализируемой пероксидазой. Кривые *1*, *2*, *3* показывают течение реакции в 1-миллиметровых прозрачных кюветах, в которых каждое реагирующее вещество переохлаждалось или медленно замораживалось при температуре —4,2°. Такое медленное замораживание дает возможность сконцентрировать субстрат и фермент в небольшом объеме жидкой фазы. Средняя кривая (2) отражает кинетику реакции системы в процессе перехода из переохлажденной жидкости в замороженное состояние при сохранении жидкой фазы концентрированных компонентов. Эта система при стартовом охлаждении находилась в жидком состоянии, замораживалась в течение 2 *мин* и оставалась в таком состоянии. Две другие кривые (*1*, *3*) иллюстрируют замораживание проб, реакция которых была прекращена после использования реагирующих компонентов. На второй части рис. 54 показаны кривые *4*, *5*, полученные в результате измерения ферментативной реакции при переохлаждении до температуры —5,4°, а также при быстром замораживании реагирующих проб до —5,6°. При быстром замораживании реакционная смесь остается гомогенной, а начальная скорость реакции оказывается меньше, чем в случае переохлажденной жидкости. Обращает на себя внимание то, что ферментативная реакция при замораживании прекращается внезапно, в то время как реакции в переохлажденной жидкости идут до тех пор, пока не исчерпаются реагирующие компоненты.

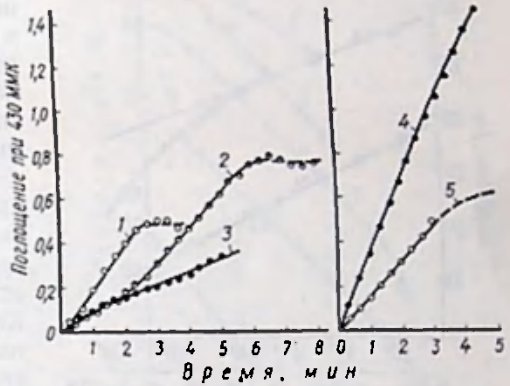


Рис. 55. Катализ пероксидазной реакции в различных концентрированных растворах при низких температурах [802].

Объяснение в тексте.

Как уже упоминалось, при небольших колебаниях комнатной температуры кривые Аррениуса для энзиматических реакций имеют вид прямой линии с энергией активации ΔF, рассчитанной для определенной энзиматической реакции E. По мере снижения температуры

и соответствующих изменений фермента энергия активации будет равна $\Delta F - \Delta H$. Если ΔH имеет отрицательные значения, то энергия активации значительно увеличивается по мере превращения субъединиц фермента в неактивные формы. Кинетически это можно выразить так:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{K[E_0]}{K+1}, \qquad (59)$$

где $-\frac{dp}{dt}$ — скорость образования продукта; K — константа скорости реакции, E_0 — общая концентрация фермента.

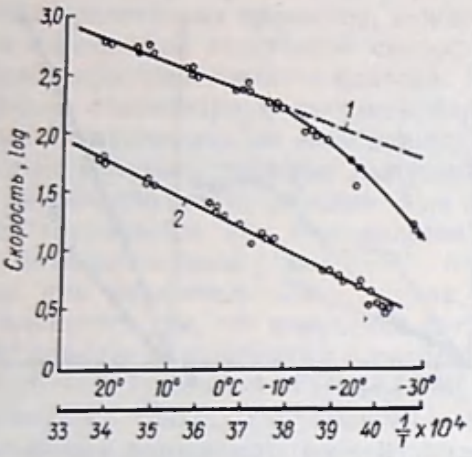


Рис. 56. Катализ окисления пероксидазы (*1*) и гемина (*2*) гваяколом [802].

Трактовка таких нелинейных кривых была проведена в экспериментальных условиях на ферменте пероксидазе, катализирующей окисление гваякола в среде 40%-ного метанола при температуре от +25 до —30° (рис. 56). На кривых кружочками обозначены скорости энзиматической реакции, измеренной при соответствующей температуре. Как видно, имеется значительное искривление прямой хода каталитической реакции, активируемой гемином при температурах ниже 0°, что указывает на явное изменение функции белковой части пероксидазы в этих условиях, поскольку этот каталитический белок представлен единственным компонентом, обусловливающим различие в этих двух каталитических реакциях. В других опытах было обнаружено, что фосфатазная и пероксидазная реакции в зоне низких температур обнаруживают значительные отклонения при 0° от линейной зависимости, имеющей место при более высоких температурах. В случае пероксидазной реакции взаимосвязь различий между экстраполированной кривой и экспериментальными значениями выражается как $\lg(K+1)$, причем константа равновесия (рис. 57, 58) K определяется для каждой экспериментальной точки. Кривая $\ln K \cdot v \cdot \frac{1}{T}$ согласно уравнению Вант-Гоффа имеет прямолинейный вид. Величины ΔH определялись по кривой Вант-Гоффа, значение K использовали для теоретического определения наклона кривых Аррениуса при 0°. Теоретические кривые, представленные на рис. 55 и 56, свидетельствуют о хорошей корреляции между теоретическими расчетами и экспериментальными данными. Рассчитанные в этих опытах изменения свободной энергии активации ΔF^0, энтальпии ΔH^0 и энтропии ΔS^0 для равновесного состоя-

ния между активным и неактивным энзимом имели следующее значение: ΔF^0 от 0,05 до 0,8 *ккал*; ΔH равно 17—26 *ккал*; ΔS колеблется от 65 до 100 единиц энтропии. Эти значения также хорошо согласуются с представлениями о том, что при низкотемпературном воздействии увеличивается число водородных связей и конформационные изменения фермента, способствующие снижению его специфической активности. Величины ΔH^0 и ΔS^0 отличаются по знаку от подобных величин при разрыве водородных связей в ре-

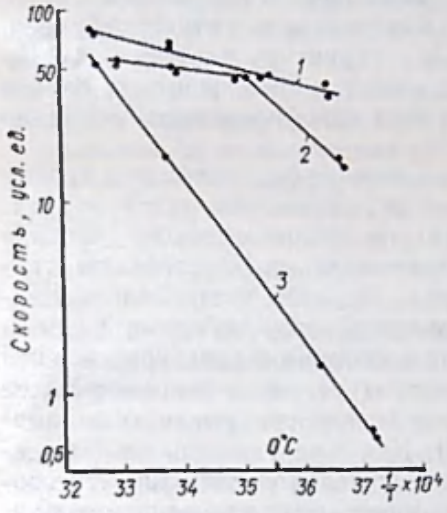


Рис. 57. Катализ фосфатазной реакции в различных концентрированных растворах:

1 — контроль (вода); *2* — 50%-ный раствор сахарозы; *3* — 23%-ный раствор NaCl [802].

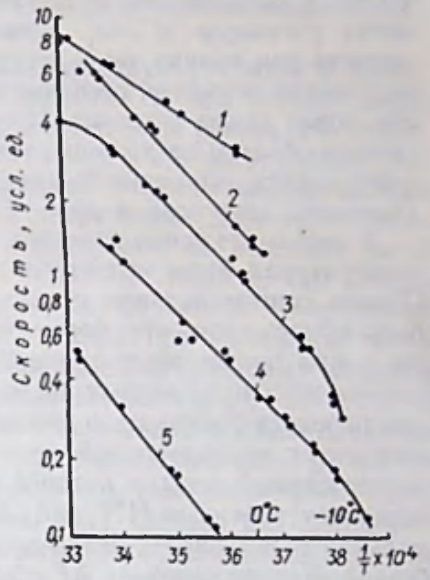


Рис. 58. Кинетика реакции пероксидазы в переохлажденной среде и замороженном состоянии [802]:

1 — контроль (вода); *2* — 50%-ный раствор сахарозы; *3* — 60%-ный раствор глицерина; *4* — 23%-ный раствор NaCl; *5* — 5М ацетат натрия.

зультате обратимой денатурации белков при высоких температурах. Если принять разность энергии ΔH^0 для образующейся водородной связи равной примерно 4—7 *ккал/моль* водородной связи, то в таком случае изменение ΔS^0 будет равно в среднем 22 энтропийным единицам на 1 *моль* образующейся водородной связи при низких температурах и 17 энтропийным единицам на 1 *моль* водородной связи, разрывающейся при высокотемпературной денатурации. Необходимо отметить, что вследствие сложного характера изменений различных параметров в ходе ферментативной реакции при снижении температуры для более глубокого объяснения этих процессов необходимы дальнейшие исследования в этом направлении. Например, усиление водородных связей в условиях низких температур может обусловить внутримолекулярное увеличение содержания воды вокруг каталитического центра ферментов, снимая тем самым его

специфическую активность. Усиление водородных связей между субстратом и водой может также приводить к снижению энзиматического катализа. Не исключается также возможность ассоциации молекул фермента в полимерные единицы. Такая склонность к ассоциации может быть следствием усиления внутримолекулярных водородных и вандерваальсовых сил. Образование указанных выше полимерных единиц фермента при низких температурах может привести к ингибированию активации фермента, субстрата и буферных систем с уменьшением константы равновесия. При увеличении вязкости растворов в силу повышения концентраций растворимых веществ при низких температурах очень сильно изменяется микроокружение фермента, особенно при замерзании эвтектической смеси. Это может также изменить функцию и структуру фермента. Аналогичным образом на каталитические свойства специфических белков могут влиять различные соединения типа криофилактиков, например глицерин, декстроза и др.

В настоящее время известно, что хранение ферментов при низких температурах более устойчиво, чем при повышенных температурах. Однако совсем недавно с помощью термодинамического анализа было обнаружено, что ферменты потенциально неустойчивы также и при пониженных температурах. Методом экстраполяции экспериментальных данных было показано, что свободная энергия для перехода белков из нормального состояния в денатурированное становится отрицательной при температуре, не достигающей еще температурной зоны, в которой белок можно считать термодинамически неустойчивым [177, 801, 802]. Как уже указывалось, максимальная стабильность белка при положительной величине его свободной энергии перехода ΔF обычно имеет место при температурах, близких к комнатной, либо немного ниже. Повышение или понижение температур, естественно, обусловливает уменьшение значения ΔF. Степень уменьшения этого показателя является функцией структурных свойств отдельных белков и обусловлено разворотом их третичной структуры в результате влияния термодинамических сил и аполярных групп на растворитель. При низких температурах вследствие ограничения термодинамических флуктуации вода образует структуру с максимально упорядоченной и количественно усиленной водородными связями системой. Возникают так называемые айсберговые структуры, которые формируются вокруг аполярных групп, тем самым стабилизируя разветвленную конфигурацию белка-фермента [592, 593]. Ранее было отмечено, что к пониженным температурам, и особенно при 0°, повышенную чувствительность проявляют такие ферменты, как карбоксилазы пировиноградной и глутаминовой кислот, ацетил-СоА и др. В одних случаях криоденатурация была вполне обратимой, в других — неполной [328, 605, 724, 741]. Считают, что потеря активности ферментов при низких температурах в основном зависит от их диссоциации подобно тому, как аполярные группы белков изменяют свою конфигурацию в присутствии растворителя.

Таким образом, не все ферменты имеют одинаковую степень чувствительности к низким температурам. Можно ожидать, что скорость перехода фермента из обычного в денатурационное состояние будет уменьшаться при понижении температуры, поскольку для осуществления конформационных переходов в белке необходимо преодолеть энергию связей, интенсивность которой весьма различна у разных ферментов. Например, химотрипсиноген и рибонуклеаза являются весьма устойчивыми при низких температурах и даже в растворе кислот, поскольку они обладают уникальными термодинамическими свойствами [177].

При образовании льда упорядоченная структура воды в значительной мере нарушается из-за повышения в ней концентрации ионов и метаболитов, поступающих в клетку. В результате возникают условия для дестабилизации фермента и его денатурации указанными выше факторами. При умеренной скорости замораживания в условиях физиологических pH и в присутствии кофакторов большинство растворимых ферментов существенно не изменяет своей активности даже в отсутствие таких защитных веществ, как сахара. Наоборот, часто активность некоторых ферментов значительно повышается по сравнению с их активностью при комнатной температуре или при 0°. Такие явления можно наблюдать при холодовом экстрагировании ферментов из гомогенатов ткани, их очистке и других манипуляциях, методически связанных с использованием отрицательных температур. Более того, ряд растворимых ферментов клеток не подвергается особым изменениям, если даже ткань перед этим была сильно проморожена [344, 855]. Однако ряд таких очищенных ферментов, как каталаза, лактат- и глутаматдегидрогеназы, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа и некоторые другие дегидрогеназы под действием низких температур теряют свою активность [214, 342, 343, 402, 532]. Считают, что инактивация этих ферментов прежде всего связана с денатурирующим влиянием солей, изменением pH и окисления их SH-групп.

КРИОБИОХИМИЯ СУЛЬФГИДРИЛЬНЫХ ГРУПП

Исследование процессов криоденатурации белков показало, что чем устойчивее ткань или орган к повреждению при замораживании, тем ниже требуется температура для преципитации белков. Впервые Горке [318] в опытах in vitro установил, что при замораживании сока растений некоторые белки выпадают в осадок при низких температурах; они получили название криопротеинов. Было также выяснено, что сахара, добавленные в среду замораживания, снижали температурную точку замерзания жидкости и выпадения белков в осадок. Аналогичные изменения, очевидно, и происходят в цитоплазме растительных и животных клеток при низких температурах — в осадок выпадают белковые макромолекулы — криопротеины, которые сосредоточены внутри и на поверхности клетки и содержат от 2 до 10% липидов. Считают, что преципитация этого липопротеи-

нового комплекса наступает в результате изменений, происходящих в липидном компоненте. В дальнейшем было обнаружено, что во время замораживания клеток появляется большее количество белков, образующих S—S-связи, что объяснялось либо их окислением, либо обменом SH-групп в результате дегидратирующего действия замораживания по типу

$$2p\,\mathrm{SH} \rightleftharpoons p\,\mathrm{SS}\,p + 2\mathrm{H};$$

$$p_1\,\mathrm{SH} + p_2\,\mathrm{SH} \rightleftharpoons p_1\,\mathrm{SS}\,p_2 + 2\mathrm{H}, \qquad (60)$$

где p_1 и p_2 — различные белки.

В связи с дегидратацией клетки при замораживании между молекулами белков быстрее возникают контакты, которые могут сопровождаться образованием межмолекулярных связей типа S—S, приводящие в конечном итоге к денатурации белков либо ферментов из-за разрушения их активных центров, содержащих SH-группы. Известно, что энергия связей S—S равна 50—60 *ккал*, а связей SH—H — всего 2—9 *ккал*. Естественно, что при низких температурах последние быстрее разрываются, что ведет к денатурации белков либо инактивации ферментов. Если этот процесс захватывает множество белковых молекул, то это приводит к гибели клеток. В последнее время стали предполагать, что предотвратить образование интрамолекулярных или дисульфидных связей S—S в процессе холодового воздействия на клетку можно путем повышения содержания в клетке кофермента НАДФ-Н. Этот важнейший клеточный коэнзим участвует в обмене сахаров, окисляющихся в цикле Кребса. При понижении температуры окружающей среды в клетках быстро уменьшается количество НАДФ-Н, в результате чего возникший дефицит способствует окислению SH-групп и образованию S—S-связей. Избыток НАДФ-Н предотвращает образование S—S-мостиков в ферментах во время замораживания. Факт повреждения поперечных связей белковых цепей и активных центров ферментов, который ведет к их денатурации, был подтвержден в самых разнообразных опытах с белками, а также ферментами, в частности с кристаллической карбоксипептидазой А. Когда в ферменте пытались стабилизировать его поперечные связи, например, глутаральдегидом, то карбоксипептидаза становилась нерастворимой и теряла свою активность [656].

Криоденатурация также является своеобразным стрессовым фактором подобно действию глутаральдегида. Образующиеся при этом связи в белке типа S—S лишают белок специфической активности, однако способствуют его стабилизации и устойчивости к нагреванию, различным диапазонам pH, действию концентрированных растворов мочевины и детергентов. Цитохромоксидаза — фермент, содержащий S—S-связи в местах сшивок, поэтому его можно получить в активной форме после ее экстракции из замороженно-высушенного материала [228]. Такой фермент, как уреаза, является белком с S—S-связями и также может быть извлечена из семян растений в активной форме после замораживания до —20°. Вместе с тем име-

ются ферменты, которые хотя и содержат в своем составе SH-группы, но довольно стабильны к замораживанию. Например, такой SH-фермент, как фосфорилаза, может быть выделен из замороженно-высушенного томатного сока без добавления защитных веществ. Устойчивы к замораживанию также и такие SH-ферменты, как каталаза, декарбоксилаза глутаминовой кислоты, лактатдегидрогеназа, глутаматщавелевая трансаминаза и фосфоглюкоизомераза [357—362, 855].

Для предохранения ферментов от криоденатурации они могут быть стабилизированы не только соединениями, содержащими SH-группы, но и сахарами, которые в естественных условиях являются защитными соединениями. Часть ферментов находится в тканях в контакте с различными низкомолекулярными соединениями и субстратами. Это способствует выраженной криорезистентности таких ферментов, в то время как в чистом виде они не устойчивы к действию низких температур. Например, глутаминаза — фермент, содержащий SH-группы, легко может быть экстрагирована из растения после продолжительного хранения ее в замороженном состоянии. Однако в чистом виде этот фермент при температуре +4° через неделю теряет уже 75% своей активности. Аналогичным образом может быть повышена температура (с +60 до +72°) тепловой денатурации глутаматщавелевой трансаминазы после добавления к ней малата. Довольно стабильна в замороженных тканях каталаза, однако в чистом виде этот фермент подвергается быстрой инактивации и денатурации [737, 738]. Некоторые ферменты, наоборот, подвергаются, очевидно, криоденатурации или криоинактивации в замороженных тканях вследствие каких-либо изменений, наступающих в результате контакта молекулы фермента с несубстратными веществами, которые в обычных физиологических условиях в клетке пространственно отделены от фермента. Например, было обнаружено, что энергетическая активность хлоропластов листьев шпината не изменялась, когда эти органеллы замораживались в растворах сахаров, и нарушалась, если замораживание проводили в среде, в которой отсутствовали эти криофилактики. Следовательно, в результате криоденатурации белков мембран этих субклеточных частиц в среде могут появляться, очевидно, токсические продукты, которые при отсутствии других защитных молекул легче вступают во взаимодействие с ферментом, вызывая его инактивацию либо денатурацию.

Приведенные выше примеры указывают на необходимость исследования поведения ферментов при замораживании не только в составе тканей, но и в виде очищенных изолированных форм, из которых устранены все защитные или вредные факторы.

Известно, что криоустойчивость биологических молекул может быть сравнима с устойчивостью клеток к дегидратации и нагреванию [465—469]. Поэтому считают, что криостабильность ферментов может быть коррелирована с их устойчивостью к нагреву. Прямые свидетельства в этом отношении были получены при изучении де-

гидрогеназы 17-β-гидроксикортикостероида [173]. В обычных природных условиях этот фермент весьма неустойчив, однако он быстро инактивируется при замораживании — оттаивании и теряет свои свойства уже при пониженных положительных температурах. Однако в 50%-ном глицерине или других криофилактиках этот фермент при температуре +2 — 5° полностью устойчив в течение года и выдерживает нагревание в глицерине несколько часов, не утрачивая при этом своей активности. Доказательством наличия общих черт между эффектом нагревания и замораживания служит тот факт, что при этих воздействиях на белки повышается содержание белков с S—S-связями [466, 468]. Ранее было показано, что эта тепловая денатурация яичного и бычьего сывороточного альбумина сопровождается образованием повышенного числа S—S-связей [826]. Большинство ферментов сразу же инактивируется при температуре +70—60°, хотя другие виды белков могут переносить и более высокие температуры (+100°) с незначительной потерей активности либо без ее потери. Точно определить температуру тепловой инактивации фермента вообще трудно, поскольку она в значительной мере зависит от pH, содержания солей и других факторов. Однако если очищенный фермент при определенном pH, содержании солей и без криофилактиков выдерживает температуру до +60° или выше, то можно думать, что такой фермент относится к классу довольно стойких соединений и может быть устойчив при замораживании.

Из известных к настоящему времени примерно 1000 ферментов и других белков количественно SH- и S—S-группы были более или менее точно определены у 25—30. В табл. 7 и 8 представлены те белки и ферменты, для которых была определена термоустойчивость и роль SH- и S—S-групп. На основании анализа указанных таблиц можно отметить два основных момента: а) устойчивые к нагреву ферменты характеризуются низким молекулярным весом (ниже 10 000) и отсутствием в своем составе SH-групп (за исключением фермента миокиназы, которая содержит специальное защитное вещество); при диализе этого вещества фермент полностью инактивируется кипячением; б) неустойчивые ферменты, как правило, имеют высокий молекулярный вес и содержат SH-группы.

Многие SH-содержащие ферменты, алкогольдегидрогеназа и нуклеозидфосфорилаза до такой степени неустойчивы к нагреву, что уже при температурах ниже +60° инактивируются [469, 795]. Наоборот, фермент энолаза, выделенный из термофильных бактерий (мол. вес 6800) и, очевидно, не содержащий вообще цистеина, весьма устойчив к нагреванию. Возможным промежуточным вариантом может служить β-амилаза картофеля, которая незначительно денатурируется при температуре 60—65°, хотя фактически содержит SH-группы. Эти SH-группы, очевидно, находятся в каком-то защищенном экранированном состоянии [173]. Считают, что SH-группы могут быть успешно экранированы с помощью белков больших размеров, которые имеют пространственные условия для взаи-

Таблица 7

Свойства ферментов, неустойчивых к нагреву [173]

Фермент	Температура инактивации, °С	Время, *мин*	Молекулярный вес, М	Число SH-групп	Число S—S-молекул
β-Галактозидаза	+55	Через 1 *мин* потеря активности на 50—60%	750 000	12	2
L-Глутаматдегидрогеназа	+55		1 000 000	90—120	0
L-Глицерофосфатдегидрогеназа	+55		78 000	15—16	0
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Комнатная (может быть стабилизирован ЭДТА при +39)	То же	120 000	11±2,0	0
Сукцинатдегидрогеназа	Нестабилен даже при +25	» »	200 000	SH-фермент	0
Ксантиноксидаза	+56	» »	290 000	SH-фермент	0
Глюкозооксидаза	Выше +40	» »	154 000	SH-фермент	0

Таблица 8

Свойства протеинов, устойчивых к нагреву [173, 243, 335]

Белок	Температура инактивации, °С	Время, *мин*	Инактивация, %	Молекулярный вес, М	Число SH-групп	Число S—S-молекул
Пепсин	+65 (в кислоте)	15	50	35 000	0	3
α-Амилаза (*Bac. subtilis*)	+65	30		48 700	0	0
Аргиназа	+70	177	50	140 000	0	0
α-Амилаза (thermophile)	+90	60	10	15 000	0	2
Пирофосфорилаза неорганическая	+90—100	—	—	63 000		
Цитохром С	+100 *	—	—	13 000	0	0
Мурамидаза лизосом	+100	—	—	15 000	0	4
Рибонуклеаза	+100 (в кислоте)	—	—	12 700	0	4
Трипсин	+100	—	—	24 000	0	6
Аденилаткиназа (миокиназа)	+100 **	—	—	21 000	2	0

* Фермент не инактивируется при +100°.

** Стабильна в присутствии диализующегося белкового фактора. При диализе полностью инактивируется кипячением. При добавлении неорганического фосфата устойчива к нагреву.

модействия с цистеиновыми группами фермента [503]. Установлена зависимость между молекулярным весом и содержанием SH-групп. В белковых макромолекулах небольших размеров SH-группы обычно отсутствуют. Большие молекулы ферментов, как известно, являются соединениями мономерных единиц (с мол. весом 17 000—25 000), которые содержат, как правило, SH-группы, позволяющие «сшить» полимерную цепь белка. При отсутствии таких групп в мономере подобной сборки фермента может не происходить, и субъединицы небольших размеров, которые содержат часто S—S-связи, останутся в свободной форме. Из табл. 7 и 8 видно, что половина устойчивых ферментов, включая большинство тех, которые имеют экстремальную термостабильность (+100°), также содержат S—S-группы и имеют сравнительно небольшой молекулярный вес. Наиболее устойчивая к нагреву α-амилаза содержит S—S-связи, а в менее устойчивых формах такие группы отсутствуют. Поэтому можно считать, что первичное денатурирующее действие нагрева сведено к влиянию на сульфгидрильные группы, а вторичное при более высоких температурах — к разрыву водородных связей. Если молекула белка содержит S—S-связи, то они могут поддерживать его конформацию в неизменном состоянии даже после ослабления либо разрыва водородных связей. Поэтому содержащиеся в белках S—S-связи обеспечивают ему защитный эффект. В связи с этим ряд исследователей пришли к выводу, что, например, чрезвычайно высокая устойчивость лизоцина к низким pH не столько зависит от структуры H-связей, сколько от состояния поперечных связей. Устойчивость ферментов, приведенных в табл. 9, нельзя объяснить только на основании характера водородных связей, поскольку повышение внутренней стабильности структур с водородными связями происходит при увеличении длины цепей. Поэтому устойчивость, обусловленная H-связями, привела бы к противоположному результату — прямой зависимости от молекулярного веса. В частности, устойчивость чистой рибонуклеазы нельзя объяснить только H-связями, поскольку она содержит всего три такие связи, удерживающие конформационную конфигурацию цепи. Общая интенсивность этих связей составила бы лишь около 7% интенсивности четырех связей типа S—S. Следовательно, вполне очевидно, что стабильность конфигурации фермента объясняется присутствием в его составе S—S-связей.

В табл. 9 приведены данные о криоденатурации нескольких ферментов, в четырех из которых SH-группы были экранированы меркаптоэтанолом и глутатионом. Такой SH-фермент, как нуклеотидилтрансфераза-ДНК, при выделении в присутствии меркаптоэтанола мог сохраняться без потери активности при 0° на протяжении 2 месяцев, а при температуре —70° — один год. При отсутствии этого соединения фермент теряет свою активность при 0° уже через 5 дней. Наоборот, три белка, содержащие S—S-группы (рибонуклеаза, бычий сывороточный альбумин, цитохромоксидаза), могут быть заморожены и лиофилизированы без потери активности. Вместе

с тем миокиназа — фермент, содержащий SH-группы, является в этом отношении исключением и может быть заморожен и высушен без повреждения его специфической функции.

Анализируя приведенные выше факты, можно думать, что значительная денатурация ферментов холодом, особенно если она яв-

Таблица 9

SH-содержащие ферменты, инактивирующиеся при замораживании [469]

Фермент	Молекулярный вес. М	Количество		Криопротектор (стабилизатор)	Автор
		SH-групп	S—S-молекул		
Лактатдегидрогеназа	170 000	14		Глутатион Меркаптоэтанол	[214]
Триозофосфатдегидрогеназа	100 000	11—12	0	Меркаптоэтанол	[214]
Глутамикодегидрогеназа	1 000 000	90—120		Меркаптоэтанол	[214]
Липоилдегидрогеназа	100 000	8—12	2	Окислитель SH-групп	[534]
Каталаза	248 000	Инактивируется SH-реагентом			[737,738]
Миозин	594 000	94			[737,738]
Дегидрогеназа 17-β-гидроксикортикостероида		Инактивируется SH-реагентом			[173]
Сукцинатдегидрогеназа	200 000	22—30			[173]
Фосфоглюкомутаза	74 000	7			[173]

ляется частично или полностью необратимой, может вызвать серьезные изменения в метаболизме клетки и повлиять, таким образом, на ее выживаемость.

КРИОБИОХИМИЯ ФЕРМЕНТОВ КРОВИ

Развитие метода низкотемпературной консервации клеток крови и других ее компонентов тесно связано с улучшением исследований в области биохимии замороженной крови. В этом отношении эритроциты, пожалуй, были одними из первых клеток, на которых испытывали действие низких температур с целью изучения изменения в них метаболических процессов и, в частности, активности самых разнообразных ферментов. Активность ферментов в консервируемой крови — важный показатель сохранения функций и структуры ее компонентов. Поэтому подобного рода исследования могут иметь не только общетеоретическое значение в аспекте разработки наиболее эффективных мер криозащиты клеток крови от замораживания, но и служить довольно чувствительным диагностическим и прогностическим тестом.

Стабильность ферментов крови при замораживании зависит от очень многих факторов, включая такие важнейшие, как скорость замораживания, наличие в среде защитных веществ, pH и др. Несмотря на развитие исследований в этом направлении в литературе по-прежнему нет единого мнения по данному вопросу — одни авторы указывают на высокую лабильность ферментов в клетках крови [791], другие, наоборот,— на высокую резистентность к холоду [710—713]. В этом отношении определенный интерес представляют работы, в которых исследовалась стабильность ферментов клеток крови при различных температурах, что позволяет провести более четкий сравнительный анализ влияния на них как положительных, так и отрицательных температур. Кроме того, сохранение специфических свойств ферментов в консервированной крови играет очень важную роль, учитывая следующее:

1. При трансфузии консервируемой крови для реципиента иногда крайне необходимо сохранить активность в перелитой крови отдельных ферментов, которые могли бы обеспечить быстрый распад различных токсических продуктов, образующихся в процессе стрессового воздействия на организм. Примером в этом отношении может служить переливание крови в хирургической практике, когда трансфузией до, во время или после хирургической операции очень важно сохранить в активном состоянии такие ферменты, как ацетилхолинэстеразу, псевдохолинэстеразу и другие, которые быстро гидролизуют сукцинилхолин. Если эти ферменты оказываются инактивированными, то это удлиняет апноэ, которое может быть очень опасным для жизни больного.

2. Определение уровня ферментов крови имеет значение для выявления патологии. Например, определение ЛДГ и некоторых трансаминаз используется для выявления скрытых форм гепатитов.

3. Плазма либо сыворотка крови может быть использована в качестве ферментных стандартов, для чего необходимо сохранение их стабильности во время хранения.

4. От стабильности ферментов консервируемой крови во многом зависят проблемы ее транспортировки. В связи с этим большой интерес представляют исследования, направленные на выяснение гидролиза ферментов после длительного низкотемпературного хранения.

Энергетический обмен лейкоцитов. Низкотемпературное замораживание лейкоцитов даже под защитой криопротекторов сопровождается изменением активности различных ферментов. Исследование лейкоконцентрата, полученного из трупной крови, свидетельствует об изменении энергетического обмена нативных лейкоцитов и лейкоцитов, которые выдерживались в среде с ПЭО-400. Этот криопротектор тормозит дыхание и особенно анаэробный гликолиз клеток. После замораживания и оттаивания проб наблюдается дальнейшее снижение анаэробного гликолиза, в то время как интенсивность потребления кислорода и анаэробный гликолиз остаются почти на прежнем уровне (табл. 10).

Среди изученных ферментов гликолиза только ЛДГ оказалась чувствительной к ингибирующему действию этиленоксида, активность же ферментов, катализирующих начальные звенья гликолитического процесса (гексокиназа, фосфоглюкомутаза, фосфогексоизо-

Таблица 10

Показатели энергетического обмена лейкоцитов при низкотемпературной консервации [61]

Условия опыта	Анаэробный гликолиз	Аэробный гликолиз	Дыхание
Нативные лейкоциты	893,0±58,0	584,0±41,9	443,0±35,7
Лейкоциты + ПЭО-400	642,0±43,1	238,0±35,2	322,5±30,2
$p<$	0,01	0,001	0,05
Лейкоциты после замораживания — оттаивания	471,0±31,0	227,0±35,1	302,0±54,5
$p<$	0,01	0,5	0,5

Примечание. Аэробный и анаэробный гликолиз и дыхание определяли манометрическим методом Варбурга. Интенсивность гликолиза выражали в *мкг* образовавшейся молочной кислоты за 1 ч инкубации при +37° на 10⁸ клеток. Интенсивность дыхания выражена в *мкл* O_2 за 1 ч инкубации при +37° на 10⁸ клеток. Экспозиция лейкоцитов в 15%-ном ПЭО-400 в течение 30 *мин*, замораживание по двухступенной программе со скоростью 1° в минуту до —15°, затем со скоростью 300° в минуту до —196°. Отогрев при +42° на водяной бане.

мераза), не изменялась. После замораживания — оттаивания лейкоцитов активность ЛДГ в присутствии ПЭО-400 не претерпевала дальнейших изменений, а активность остальных ферментов гликолиза снижалась (рис. 59). Возможно, отмеченное торможение анаэробного гликолиза после замораживания — оттаивания лейкоци-

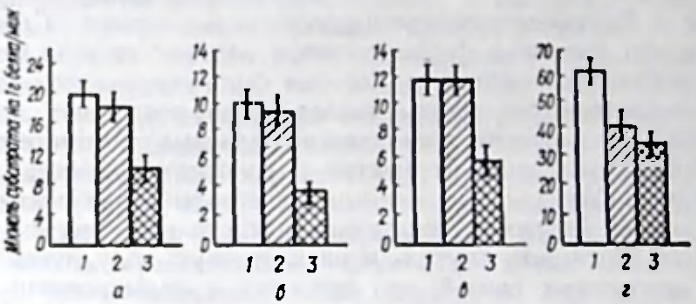


Рис. 59. Влияние низкотемпературного консервирования на активность ферментов гликолиза в лейкоцитах [61]:

а — гексокиназа; *б* — фосфоглюкомутаза; *в* — фосфогексоизомераза; *г* — лактатдегидрогеназа; *1* — нативные лейкоциты; *2* — лейкоциты + ПЭО-400; *3* — лейкоциты после замораживания — оттаивания.

тов обусловлено прежде всего снижением активности гексокиназы, являющейся для этих клеток лимитирующим звеном в ферментативной цепи гликолиза. Отсутствие дальнейшего снижения аэробного гликолиза в аналогичных экспериментальных условиях, по-ви-

димому, может быть объяснено меньшей его активностью по сравнению с гликолизом в анаэробных условиях, в связи с чем частичная потеря гексокиназной активности не отражается на скорости процесса в целом. Таким образом, снижение активности ферментов гликолиза, вызванное как ингибирующим действием применявшегося криопротектора, так и влиянием замораживания — оттаивания, проявляется в конечном счете в уменьшении гликолитической активности лейкоцитов после низкотемпературной консервации.

Данные, приведенные на рис. 59, показывают определенную зависимость между ингибирующим влиянием криопротектора и последующим действием низкотемпературного фактора на активность изученных энзимов гликолиза. Тормозящий эффект полиэтиленоксида в отношении активности ЛДГ был, вероятно, одной из причин, предупреждающих дальнейшее снижение активности этого фермента при замораживании, тогда как остальные ферменты гликолиза, оказавшиеся нечувствительными к первоначальному криопротекторному влиянию, подвергались последующему изменению при консервировании лейкоцитов.

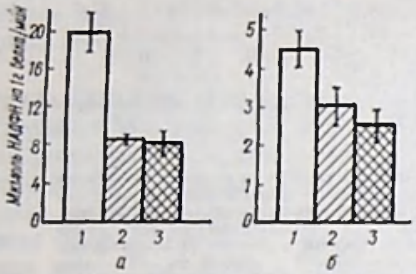


Рис. 60. Активность дегидрогеназ пентозофосфатного шунта в лейкоцитах после низкотемпературного воздействия:

а — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; б — 6-фосфоглюконатдегидрогеназа; 1 — нативные лейкоциты; 2 — лейкоциты + ПЭО-400; 3 — лейкоциты после замораживания — оттаивания.

На рис. 60 показано влияние полиэтиленоксида и замораживания — оттаивания на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы лейкоцитов. Следует отметить, что динамика ферментативной активности этих дегидрогеназ подобна тем изменениям, которые были обнаружены для ЛДГ.

Приведенные результаты исследований позволяют высказать некоторые соображения, касающиеся механизма защитного действия ПЭО-400 в отношении ферментов в условиях действия низких температур. Согласно современным представлениям, криопротекторные свойства многих ограждающих веществ обусловлены их способностью связывать внутри- и внеклеточную воду путем образования водородных связей, что приводит к формированию мелкокристаллических структур льда, к снижению точки эвтектики и уменьшению повреждающего действия концентрированных растворов солей и метаболитов, возникающих в процессе замораживания [492—497]. Установлено, что такого рода механизм криопротекции в основном характерен и для полиэтиленоксида [81, 83, 85]. В связи с этим можно полагать, что тормозящее влияние полиэтиленоксида на активность некоторых ферментов является результатом его дегидратирующего влияния на энзиматические белки с соответствующим изменением их конформации и каталитической функции.

Нельзя также исключить возможности непосредственного действия полиэтиленоксида на молекулу фермента вследствие образования вокруг последней защитного слоя криопротектора, как это показано, например, для одного из широко применяемых защитных агентов — диметилсульфоксида [309]. Очевидно, основные физико-химические характеристики этого слоя будут определяться особенностями структуры каждого ферментативного белка и прежде всего количеством и свойствами функциональных химических групп, способных к образованию водородных связей с молекулами криопротектора. Таким образом, различная степень химического воздействия полиэтиленоксида с белковой молекулой является причиной избирательной чувствительности ферментов к ингибирующему влиянию криопротектора.

Остается неясным, обратимо ли действие полиэтиленоксида на структуру и функцию ферментов или в данном случае имеет место истинное токсическое влияние, вызывающее их денатурацию. Выяснение этого вопроса имеет существенное практическое значение, поскольку отсутствие токсичности является одним из основных требований, которые предъявляются к ограждающим веществам, применяемым при низкотемпературном консервировании различных биологических объектов. Изучение дыхания лейкоцитов после удаления из них полиэтиленоксида путем отмывания клеточной суспензии сывороткой крови показало, что при этом наблюдается восстановление потребления кислорода клетками до исходного уровня, что свидетельствует об обратимости угнетающего влияния криопротектора на этот метаболический показатель. Следовательно, в данном случае наблюдается так называемый псевдотоксический эффект полиэтиленоксида, который характерен и для других защитных веществ, широко применяемых в настоящее время при низкотемпературном консервировании органов и тканей.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно прийти к заключению, что использование полиэтиленоксида в качестве криопротектора для низкотемпературной консервации лейкоцитов даст удовлетворительные результаты. В то же время необходимы дальнейшие поиски таких условий и режимов замораживания, которые смогут обеспечить максимальную сохранность метаболических процессов клеток при действии низких температур.

Активность «растворимых» ферментов крови. Исследование в плазме крови активности таких ферментов, как ацетилхолинэстераза (АХЭ), псевдохолинэстераза (ПХЭ), ГОТ, ГПТ, ЛДГ, кислая (КФ) и щелочная (ЩФ) фосфатаза и амилаза, показало, что при низких положительных либо субнулевых температурах эти ферменты проявляют бóльшую устойчивость, чем при хранении при температуре +22° или +38° (табл. 11) [369, 370, 453, 830, 851].

Определенную роль в сохранении ферментативной активности крови играет присутствие стабилизатора или антикоагулянта (табл. 12, 13). Как видно из табл. 12, цельная кровь, сохраняющаяся при температуре +4° на гепарине, теряет активность ацетил-

Таблица 11

Ферментативная активность сыворотки крови (без сгустка) после хранения ее при различной температуре [400]

Фермент	Хранение при —20°, сутки			Хранение при +4°, сутки			Хранение при +22°, сутки		
	0	1-е	8-е	0	1-е	8-е	0	1-е	8-е
Псевдохолинэстераза	4,1	3,9	4,1	4,1	3,7	4,2	4,0	3,9	3,8
Глутамикооксалтрансаминаза	20,0	14,0	18,0	20,0	19,0	20,0	24,0	19,0	19,0
Глутамикопируваттрансаминаза	15,0	13,0	14,0	15,0	14,0	15,0	12,0	12,0	13,0
Лактатдегидрогеназа	317,0	208,0	198,0	317,0	220,0	200,0	250,0	195,0	175,0
Кислая фосфатаза	0,39	0,41	0,37	0,39	0,40	0,27	0,38	0,31	0,13
Щелочная фосфатаза	1,9	1,7	1,8	1,8	1,9	1,9	1,9	1,8	1,5
Амилаза	72,0	60,0	66,0	72,0	59,0	63,0	46,0	50,0	45,0

Таблица 12

Активность ферментов цельной крови, хранящейся при температуре +4° с цитратом либо гепарином [400]

Фермент	Хранение с цитратом, день					Хранение с гепарином, день				
	0	1-й	7-й	30-й	60-й	0	1-й	7-й	30-й	60-й
Ацетилхолинэстераза	8,5	7,9	8,0	7,4	6,1	9,1	10,7	8,8	6,6	5,5
Псевдохолинэстераза	3,0	2,7	2,5	2,6	3,0	3,2	2,8	2,9	3,7	3,3
Глутамикооксалтрансаминаза	15,0	15,0	18,0	12,0	16,0	20,0	19,0	24,0		
Глутамикопируваттрансаминаза	8,0	12,0	12,0	8,0	5,0	26,0	26,0	26,0	—	103,0
Лактатдегидрогеназа	223,0	310,0	573,0	832,0	1387,0	223,0	343,0			
Кислая фосфатаза	0,34	0,27	1,49			0,55	0,71			
Щелочная фосфатаза	1,6	1,1	0,8	0,5	0,5	1,7	1,4	1,3	1,3	—
Амилаза	39,0	36,0	—	39,0	—	76,0	56,0	—	69,0	—

холинэстеразы лишь через месяц от начала хранения. Цитрат в этом отношении более эффективен. Псевдохолинэстеразная активность сохраняется при всех указанных температурах, за исключением температуры +38°. Такие ферменты, как ГОТ и ГПТ, ведут себя более стабильно в сыворотке, а также в цельной крови, взятой на цитрате. При образовании сгустка у сывороточных ГОТ и ГПТ резко повышается активность, как и в плазменных ферментах на гепарине. ЛДГ стабильна в плазме при +4° и неустойчива при

Таблица 13

Ферментативная активность плазмы крови, сохраняющейся при температуре +4 и +38° с цитратом [400]

Фермент	Хранение при +4°, день						Хранение при +38°, день					
	0	1-й	8-й	30-й	60-й	120-й	0	1-й	8-й	30-й	60-й	120-й
Псевдохолинэстераза	2,0	2,0	—	1,8	1,7	2,0	3,3	3,3	2,6	2,5	2,7	2,4
Глутамикооксалтрансаминаза	12	12	—	13	11	11	36	31	21	17	11	17
Глутамикопируваттрансаминаза	10	10	—	9	10	11	30	29	20	19	15	17
Лактатдегидрогеназа	210	220	—	265	225	210	345	298	258	285	140	125
Кислая фосфатаза	0,33	0,22	—	0,30	0,24	0,11	0,35	0,23	0,17	0,08	0,07	0,07
Щелочная фосфатаза	1,55	0,80	—	1,00	1,10	1,00	1,40	1,65	1,60	0,55	0,20	0
Амилаза	71	51	—	58	71	60	47	51	54	64	67	50

всех других изучаемых температурах. В цельной крови при +4° уже на 7-й день ее активность увеличивается более чем в два раза. КФ в сыворотке крови стабильна лишь при температуре —20, +4 и +22° на протяжении одной недели, при других температурах хранения активность ее быстро изменяется. ЩФ нестабильна в цельной крови в плазме при +4° и особенно при +38°. В этом случае уже к 8-му дню активность этого фермента снижается вдвое (табл. 12, 13). Наряду с этой высокой устойчивостью в крови обладает такой фермент, как амилаза, активность которого не изменяется при любых условиях.

Следовательно, при низких положительных и субнулевых температурах эти ферменты проявляют разную стабильность при хранении. При комнатной температуре, как видно из результатов

исследований, тотальная активность ЛДГ в плазме крови не изменяется на протяжении нескольких дней, а при рефрижераторных и субнулевых температурах — в течение нескольких недель [369, 370, 400, 453]. Несмотря на то, что большинство исследований свидетельствует о стабильности ЛДГ в сыворотке крови при низкотемпературном хранении, имеются данные, что активность этого фермента при хранении уже в течение 24 ч падает при температуре +4° на 60%, а при —20°— на 70% [791]. Более того, изоэнзимы ЛДГ значительно отличаются по своей холодовой стабильности. Если хранить сыворотку крови в рефрижераторе, то на протяжении пер-

Таблица 14

Тотальная активность и процент изоэнзимов ЛДГ в сыворотке крови, сохраняющейся на протяжении двух дней

Условия опыта	Общая активность, единиц	ЛДГ$_1$	ЛДГ$_2$	ЛДГ$_3$	ЛДГ$_4$	ЛДГ$_5$
Свежая сыворотка	380	26	34,5	19	12	9
После хранения при температуре +16—18°	380	20	38	19,5	12	10,5
После хранения при 0—4°	315	27	38,5	17	8	9,5
После хранения при —10°	225	36	46	15,5	0	3

вой недели как общая активность ЛДГ, так и ее изоэнзимный спектр почти не изменяются. Однако по истечении шести недель хранения общая активность значительно снижается, причем фракции 4 и 5 быстро исчезают, а фракция 3 уменьшается лишь на 50%. Такая закономерность была получена и при исследовании сыворотки, взятой от больных людей. Хранение такой патологически измененной сыворотки при температуре —10° приводит к более быстрой потере активности ЛДГ, чем при 0 и при +4°. При субнулевых температурах через неделю полностью исчезает фракция 5, фракция 4 существенно не изменяется. При комнатной температуре в течение недели изменений со стороны фракций ЛДГ обычно не наблюдается.

В нескольких из исследуемых проб крови, хранящихся при комнатной температуре, исчезновение малых субъединиц, в том числе фракций 1 и 3 ЛДГ, наблюдалось лишь через 10 недель на фоне уменьшения общей активности фермента с 1040 до 70 единиц. При температуре +37° очень быстро уменьшается фракция 5. В свежей плазме общая активность ЛДГ, по данным Крейтцера и соавторов [442], составляет 380 единиц (фракция 1 составляла 26% общей активности, фракция 2 — 34,5%, фракция 3 — 19%, фракция 4 — 12%, фракция 5 — 9%). Электрофоретические разделения фермента показывают, что уменьшение активности различно для каждой из пяти фракций (табл. 14).

Как видно из данных табл. 14, при субнулевых температурах наблюдается падение активности ЛДГ в сыворотке, зависящее, очевидно, от резкого снижения процента $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$. При хранении сыворотки крови в течение месяца тотальная активность ЛДГ при комнатной температуре (+ 16 — 18°) изменяется очень мало (рис. 61), а при температуре 0—4° к этому времени теряется 50% активности. Хранение сыворотки при более низких температурах (— 10°) способствует изменению активности фермента почти на 80% по сравнению с контролем (100%). Анализ состояния фракций ЛДГ сыворотки крови после 2 дней хранения свидетельствует о том, что фрак-

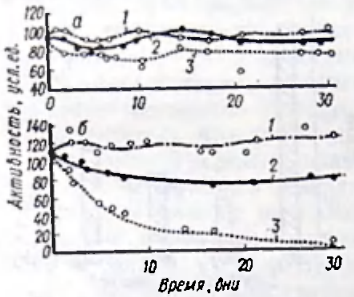


Рис. 61. Активность $ЛДГ_1$ (*а*) и $ЛДГ_2$ (*б*) в сыворотке крови после хранения при комнатной температуре (*1*), при 0° и +4° (*2*), при —10° (*3*) [442].

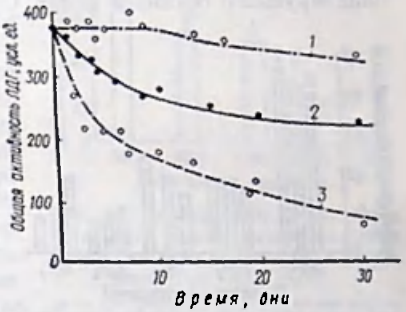


Рис. 62. Суммарная активность ЛДГ в сыворотке крови, хранящейся при комнатной температуре (*1*), при 0° и +4° (*2*), при —10° (*3*) [442].

ция $ЛДГ_1$ практически не изменяется при любых температурах хранения (рис. 62). При комнатной температуре фракции 2—5 почти не изменяются на протяжении первых 10 дней. По истечении этого времени уровень активности фракции 2 и 3 несколько снижается на фоне резкого уменьшения активности $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$. При температуре —10° активность фракций 5 и 4 быстро снижается и через 2 дня полностью исчезает. Фракции $ЛДГ_3$ и $ЛДГ_2$ после 8 дней хранения теряют 50% своей активности. При температуре 0 и +4° также наблюдаются выраженные изменения со стороны фракций $ЛДГ_{2-5}$.

Таким образом, при субнулевых температурах очень быстро происходит инактивация и разрушение малых субъединиц фермента — $ЛДГ_5$ и особенно $ЛДГ_4$. Природа такой высокой чувствительности этих фракций фермента остается неясной.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО СПЕКТРА ПЕРФУЗАТОВ

В последнее время в связи с интенсификацией разработки методов низкотемпературного консервирования органов назрела необходимость всестороннего морфо-функционального тестирования консервируемых объектов.

Успехи органной трансплантации тесно связаны с разработкой эффективных методов длительного хранения органов при низких и умеренных температурах. В этом отношении в настоящее время ведутся интенсивные работы по консервированию почки, поскольку эта проблема является первостепенной в связи с большими запросами клинической медицины. Однако ввиду сложного анатомического и физиологического строения этого органа решение проблемы низкотемпературной консервации почки вызывает значительные затруднения, поскольку нарушение функции одних систем органа приводит к значительным физиологическим расстройствам функции трансплантируемого органа в целом. Одним из наиболее чувствительных

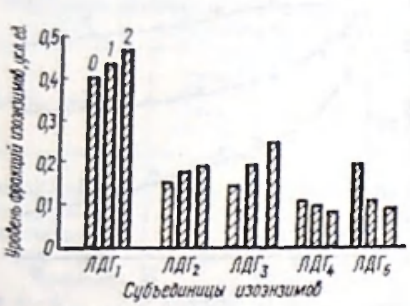


Рис. 63. Фракции изоэнзимов ЛДГ после предварительного замораживания почки и хранения при +4° [214]:
0 — исходные данные; *1* и *2* — сроки хранения в неделях.

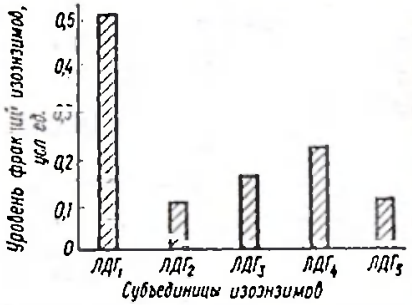


Рис. 64. Фракции изоэнзимов в перфузате после предварительного замораживания почки до —196° и хранения при этой же температуре [214].

показателей, свидетельствующих о сохранении жизнеспособности консервируемых органов, является определение ферментативного спектра оттекающей из органа жидкости после гипотермической перфузии и реконсервации.

В этом отношении может представлять интерес изучение элиминации из почки такого ключевого фермента гликолиза, как ЛДГ, и важного фермента, катализирующего реакции переаминирования — ГОТ. Как известно, ЛДГ катализирует восстановление пирувата до лактата с потреблением НАД-H_2 в анаэробных условиях, т. е. участвует в терминальных реакциях гликолиза, а ГОТ осуществляет перенос аминогрупп от глутаминовой и аспарагиновой кислот на кетокислоты. Как известно, ГОТ обладает высокой активностью в тканях животных. Таким образом, указанные выше два фермента катализируют важнейшие метаболические реакции клеток и с этой точки зрения могут быть показателями их жизнеспособности после воздействия низких температур. Однако литературные данные о нарушении структуры и функции ЛДГ и ГОТ при действии низких температур весьма противоречивы; по данным одних авторов, активность этих ферментов в сыворотке крови как при комнатной температуре, так и при температуре —20° снижается, согласно другим,— не изменяется. В качестве примера можно при-

вести опыты, в которых почки собаки после их перфузии смесью, состоящей из плазмы крови и 15% глицерина, замораживали со скоростью 1° в минуту и хранили в жидком азоте (рис. 63 и 64). Итак видно, что активность ЛДГ и ГОТ после отогрева и хранения органа при положительных и низких температурах ведет к довольно выраженной потере ферментативной активности. Установлено, что через две недели при температуре +4° теряется всего 10% активности, а через два месяца — 30—40%. Из приведенных рисунков видно, что хранение органа при температуре — 20° и особенно при —196° способствует лучшему сохранению фермента. Представляет также интерес, что различные по своему составу среды, используемые при перфузии, в незначительной степени влияют на выход ферментов в оттекающую жидкость.

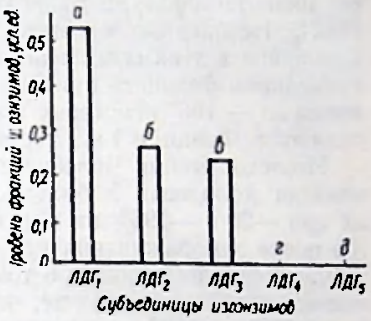


Рис. 65. Субъединицы изоэнзимов в перфузате после предварительного замораживания почки собаки и хранения при —20° [532]:

а — контроль; б, в — снижение активности в процессе хранения при —20°; г, д — холодовая гибридизация.

Как видно из рис. 65, активность ЛДГ и ГОТ при хранении во всех трех экспериментальных средах лучше всего сохраняется при замораживании до —20 и —196° по сравнению с 0°. При этом необходимо отметить важность и перспективность исследований по изучению изоэнзимного спектра ЛДГ как показателя распада полимерной молекулы фермента либо появления новых атипичных

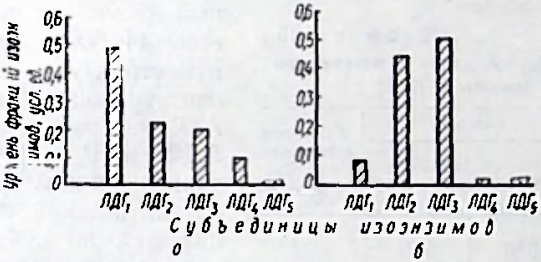


Рис. 66. Фракции изоэнзимов в перфузате сразу же после оттаивания замороженной почки (перфузия плазмой крови) [532]:

а — неустойчивость изоэнзимов; б — гибридизация ЛДГ1 и ЛДГ5.

субъединиц. На рис. 65 представлены фракции изоэнзимов ЛДГ в плазменном перфузате из замороженной почки. Как видно, при повреждении клеток почки изменяются все пять фракций этого фермента. Однако при замораживании почки до —20° изменяются

главным образом только фракции $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$ в результате выраженной их гибридизации (рис. 66). Как видно, фракции 2 и 3 фермента определяются в перфузате в достаточном количестве, в то время как остальные его формы ($ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$) обнаруживаются с трудом. Считают, что гибридизация изоэнзимов зависит именно от низкотемпературного воздействия на субъединицы фермента [532]. Необходимо отметить, что использованные концентрации глицерина в этих опытах не предотвращают процесс гибридизации субъединиц фермента при температуре — 20°. При замораживании почки до — 196° некоторые изоэнзимы в перфузате вообще не определяются. Фракции 4 и 5 фермента как бы исчезают.

Исследованиями Чилсона и сотрудников [214] также была установлена холодовая лабильность изоэнзимов ЛДГ при хранении их при —20 и —196° на протяжении недели. При хранении объектов после замораживания при температуре + 4° получены результаты, свидетельствующие о том, что в таких условиях спектр изоэнзимов сохраняется лучше, чем при замораживании до температуры — 20 и — 196°, однако активность в перфузате почки фракции $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$ после двухнедельного хранения значительно снижается. Результаты опытов показали, что активность ЛДГ, а также ГОТ в перфузате после отогрева замороженного объекта может быть использована для количественного определения степени разрушения органа в результате низкотемпературной консервации.

КРИОБИОХИМИЯ ФЕРМЕНТОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Активность и структурное состояние миозинов. Наиболее важными фибриллярными белками мышц являются миозин и актин, поскольку они участвуют в мышечном сокращении. Миозин-фибриллярный белок с молекулярным весом 440 000 имеет α-спиральную структуру, обладает ферментативной активностью АТФазы, расщепляя АТФ до АДФ и $Р_н$. Под влиянием трипсина и химотрипсина этот каталитический белок гидролизуется на субъединицы — меромиозины. Различают миозин В, миозин α и меромиозины G и Н. Функциональное значение Н-меромиозина состоит в том, что именно он обладает всей АТФазной активностью, а также способен очень быстро соединяться с основным белком — миофибриллактином. Важным является то, что АТФазное действие α-миозина и актомиозина различно. Свойство АТФазы миозина сильно изме-

Таблица 15

Влияние замораживания — оттаивания на миозин В [343]

Температура, °С	Вязкость		АТФазная активность, мкг $Р_н$ в минуту
	начальная	минимальная с АТФ	
Контроль	0,87	0,27	3,4
—30	0,48	—	1,4
—79	0,58	0,32	2,0
—196	0,63	0,32	2,2

Примечание. Раствор миозина В замораживали в растворе 0.6М KCl; 0.02М-трис-HCl-буфере (pH 6.8); отогрев быстрый — при температуре +30°

няется при соединении его с актином. Например, АТФазная активность свободного миозина повышается в присутствии ионов Ca^{2+} и ингибируется магнием, в то время как АТФазная активность актомиозина и интактной мышечной ткани повышается под действием Mg^{2+}.

Установлено, что в результате замораживания заметно изменяются ферментативная активность и конформационные параметры



Рис. 67. Зависимость денатурации миозина В от его концентрации при замораживании — оттаивании [341].

Белок растворен в 0,6 М растворе KCl; 0,02М-трис-HCl-буфере (pH 6,8). Температура замораживания —30°.

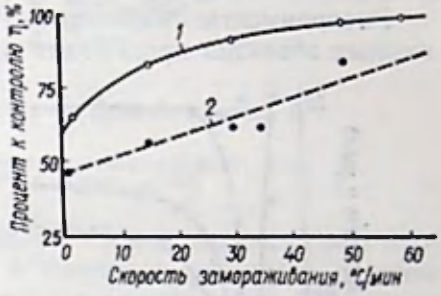


Рис. 68. Влияние скоростей охлаждения на вязкость (*1*) и АТФазную активность (*2*) миозина В при температуре замораживания —50° [342].

миозинов, в то время как актин и каталаза подвергаются меньшим изменениям. Показано, что низкие температуры вызывают в фибриллярных белках частичное развертывание их спиральных участков, в то время как подобных конформационных изменений в глобулярных белках, как правило, не происходит, т. е. молекулярная структура этих белков при замораживании более стабильна.

Если замораживать миозин В до низких температур, то, как видно из табл. 15, отмечается падение вязкости раствора и его АТФазной активности, хотя ни помутнения, ни выпадения белков в осадок не наблюдается.

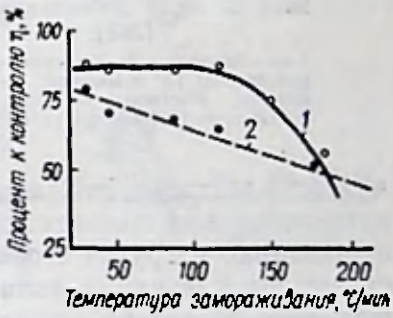


Рис. 69. Влияние низких температур на специфическую вязкость (*1*) и АТФазную активность (*2*) миозина В при скорости охлаждения 20° в минуту [341].

Необходимо подчеркнуть, что криоденатурация ферментативных белков очень зависит от их концентрации в растворе (рис. 67), скорости охлаждения и присутствия того или иного криопротектора. Как видно из приведенного рисунка, денатурирующее действие холода проявляется именно при низких концентрациях каталитических белков, и по мере увеличения их в среде до 1% они оказываются более стабильными. Если такие 1%-ные растворы миозина В

замораживали до температуры — 50° со скоростью около 20° в минуту (рис. 68 и 69), то наряду с этим уменьшалась вязкость и АТФазная активность, а денатурация увеличивалась лишь при достижении конечной температуры замораживания. Вместе с тем при анализе полученных седиментограмм в ультрацентрифуге никаких изменений в белке обычно не обнаруживается, что свидетельствует об отсутствии каких-либо реассоциативных процессов со стороны этих каталитических белков.

Эксперименты показывают, что изменение вязкости в замороженных объектах происходит через некоторое время после добавления АТФ (рис. 70). Замораживание при активировании АТФазной активности способствует понижению скорости восстановления

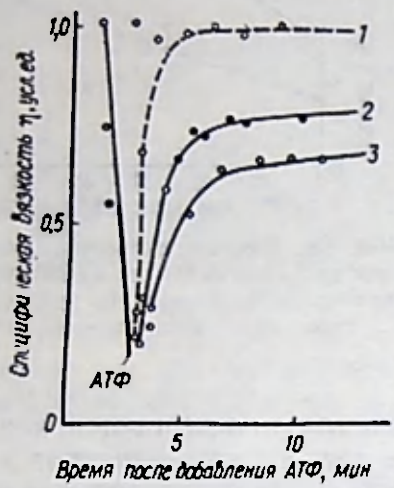


Рис. 70. Изменение вязкости замороженного и отогретого миозина В после добавления АТФ [343]:

1 — контроль; *2* — скорость замораживания 15° в минуту; *3* — 1° в минуту. Растворы — 0,6М KCl; 0,02М-трис-HCl-буфер (pH 6.8); 1М Ca^{2+}.

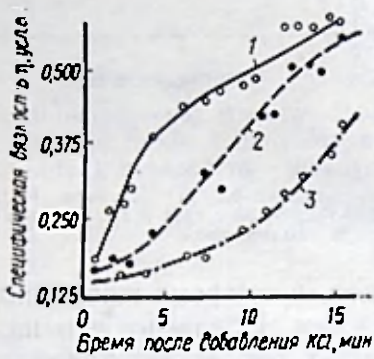


Рис. 71. Влияние замораживания и оттаивания на полимеризацию G-актина [341]:

1 — контроль; *2* — замораживание до —50°; *3* — замораживание до —170°. Концентрация белка — 2—5 *мг/мл*. Скорость замораживания 50° в минуту.

вязкости раствора. Это свидетельствует о том, что, с одной стороны, актомиозиновый комплекс сам по себе устойчив к замораживанию — оттаиванию, с другой стороны — что ответственным за нарушение структуры и функции является АТФазная активность миозина В. При этом не только снижается ферментативная активность, но и изменяется конфигурация белков, входящих в состав актомиозинового комплекса, т. е. происходит разворачивание молекулы белка.

Действительно, как видно из рис. 71, при замораживании увеличивается активность G-актина за счет образования F-форм. Если замораживать миозин и актин отдельно, то после рекомбинации этих белков в растворе такого синтетического актомиозина заметно снижается вязкость и постепенно падает АТФазная активность, т. е. это свидетельствует о слабых межмолекулярных связях этих белков в комплексе, которые быстро нарушаются при замораживании — оттаивании. Появление конформационных изменений в ка-

талитических белках особенно четко проявляется при исследовании дисперсий оптического вращения изолированного миозина А. Как видно из рис. 72, уменьшение — b_0 с одновременным увеличением — a_0 и вязкости прямо свидетельствует о молекулярных изме-

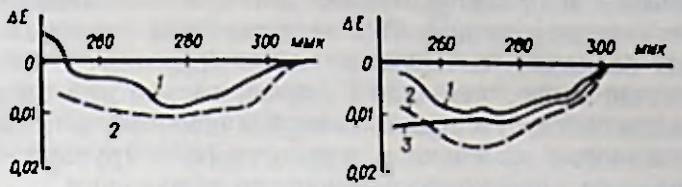


Рис. 72. Спектры замороженного и оттаянного миозина А [737].

Концентрация белка 0,1%. Температура замораживания: *1* — при —10°; *2* — при —50°; *3* — при —100°.

нениях спиральной структуры фермента. При этом, очевидно, происходит разворачивание спиралей в белковой молекуле подобно тому, как это наблюдается при денатурации фермента под влиянием физических (ультразвук) либо химических (мочевина) факторов. То, что — b_0 миозина А уменьшается от 330 *нм* при замораживании до температуры — 196°, свидетельствует о том, что около 25% спиральных структур разворачивается при замораживании. Смещение спектра в коротковолновую область (отрицательное значение $\Delta 0 - Д_{290}$) при замораживании свидетельствует об изменениях поведения гидрофобных хроматофоров белка, таких как триптофановые либо тирозиновые остатки, вызванных переходом в водном растворе от «скрытого» скрученного состояния в развернутую незащищенную цепь. Как видно, значение $\Delta 0 - Д_{290}$ увеличивается при понижении температуры замораживания. Следовательно, спиральная структура миозина А частично деструктурируется при замораживании — оттаивании в зависимости от температуры.

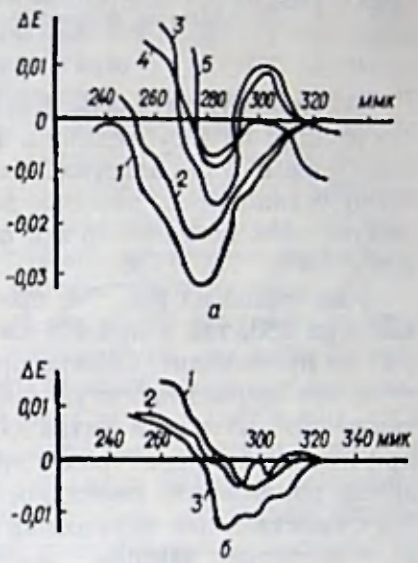


Рис. 73. Спектры замороженного и оттаянного 0,1%-ного раствора Н-меромиозина (*а*) и L-меромиозина (*б*) [738].

Температура замораживания Н-меромиозина: *1* — при —196°; *2* — при —100°; *3* — при —50°; *4* — при —20°; *5* — при —10°. Температура замораживания L-меромиозина [342]: *1* — при —20°; *2* — при —50°; *3* — при —196°.

Исследования структурно-функционального состояния при замораживании таких субъединиц миозина, как L- и Н-меромиозин, с которым связана основная масса ферментативной активности, указывают (рис. 73) на то, что изменение величины — b_0 и — a_0,

вязкости, $\Delta 0 - Д_{285}$ и ферментативной активности в этих белках связано с температурой замораживания. Особенно заметные изменения наблюдаются при замораживании субъединиц до температуры — 196°. Значения $-b_0$ при этом уменьшаются от 240 до 150 *нм* для H-миромиозина и от 250 до 80 *нм* для L-миромиозина, что свидетельствует о развертывании 70% спиральных участков в фибриллярных белках, т. е. значения $\Delta 0 - Д_{285}$ для H-миромиозина в этом случае выше, чем для L-формы, только при определенной концентрации белка, т. е. в данном случае изменяется конфигурация белка, связанного с изменением жидкостного окружения белков, так называемого трансконформационного окружения.

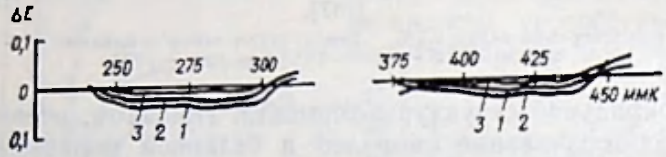


Рис. 74. Спектры замороженного и оттаянного 0,14%-ного раствора каталазы [738].
Температуры замораживания: *1* — при —20°, *2* — при —80°; *3* — при —196°.

Активность каталазы. Каталаза — типичный глобулярный белок, состоящий из 4 субъединиц. Путем регистрации дифференциальных спектров в УФ-областях, вязкости и ферментативной активности было установлено, что при замораживании этого фермента его молекулярная конформация и особенно активные гем-группы изменяются [608, 737, 738].

Как видно из рис. 74, при медленном замораживании каталазы, как при 280, так и при 405 *нм* изменений в дифференциальных спектрах не происходит. Однако при этом снижение температуры заметно угнетает ферментативную активность. Подобный факт отмечался также при изучении активности миозина (рис. 72). Следовательно, при низких температурах у этого фермента в отличие от других миозинов изменяется, очевидно, функция его каталитического центра без существенных нарушений его молекулярной структуры. Согласно некоторым данным, замораживание — высушивание вызывает распад каталазы на субъединицы, в результате чего происходит потеря ее ферментативной активности [799]. Действительно, анализ седиментограмм, полученных в ультрацентрифуге, показывает, что при замораживании — высушивании каталазы она, как правило, диссоциирует на 3,7 S субъединицы — мономеры. Особенно быстро снижается в таких условиях ферментативная активность этого белка после дополнительной деградации, созданной диффузионными насосами. В области около 280 *нм* иногда наблюдается смещение на дифференциальных спектрах в УФ-область, а иногда в инфракрасную. Такое смещение при 280 *нм* не зависит от условий замораживания или высушивания. Вызвано ли это конформацией диссоцииро-

ванных субъединиц, отличающихся от нативного белка, остается неясным. Вместе с тем видно, что содержание спиральных участков очень резко уменьшается в L-миозине (фибриллярный белок) и в незначительной степени в H-форме (глобулярный белок). G-актин и каталаза, являющиеся типичными глобулярными белками, также не изменяют своей конформации. Поэтому считают, что в этих глобулярных белках находится значительно меньше гидратационных участков внутри их спирали, в результате чего возмущение гидратной оболочки при низких температурах значительно ниже, чем в фибриллярных белках.

ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

В 1955 г. Де Дювом [262—264] были описаны открытые им субклеточные образования — лизосомы, представляющие собой органеллы, ограниченные липопротеиновой мембраной и содержащие богатый набор гидролитических ферментов. Согласно проведенным наблюдениям, лизосомы являются весьма нестабильными структурами и при их выделении могут легко повреждаться. По своему составу лизосомы являются гликолипидбелковым комплексом, имеющим гетерогенную морфологическую и химическую структуру. Ферментативный состав лизосом зависит как от вида животного, так и от типа ткани, из которой они получены. Характерным для лизосом является высокое содержание в них гидролитических ферментов (табл. 16). Как известно, часть ферментов лизосом связана с мембраной, часть растворена в их матриксе. В интактных клетках эти ферменты благодаря своей локализации отделены от остального клеточного содержимого и вследствие этого не действуют на него.

При повреждении мембран лизосом ферменты вступают в контакт с компонентами клетки и могут оказывать на них воздействие, благодаря чему резко повышается интенсивность процессов распада. Считают, что гидролитические ферменты гранул соединены либо ионными связями с матриксом гликолипидной природы, либо в лизосоме существуют электростатические связи между ферментом и мембраной. Необходимо отметить, что лизосомы различных тканей и органов по-разному реагируют на действие различных экстремальных факторов — стероидов, эндотоксинов, облучения, замораживания — высушивания и т. д. Например, лизосомы почки при изменении осмотической концентрации среды повреждаются меньше, чем лизосомы печени. Считают, что ферменты из лизосом выделяются в два этапа: а) вначале ферменты становятся более доступными для наружных субстратов, но из частиц они не выделяются и морфологически лизосомы не изменяются; б) на втором этапе происходит одновременное освобождение ферментов и разрушение лизосом.

В связи с высоким содержанием гидролитических ферментов, обладающих широким спектром разрушительного действия, лизосомы являются, пожалуй, наиболее опасными клеточными органеллами,

которые повреждаются при замораживании. Поскольку лизосомы являются структурами, в которых ассоциации неактивных гидролитических ферментов размещены в ячейках, имеющих однослойную фосфолипопротеиновую мембрану, то в условиях замораживания или оттаивания они могут резко изменять свою проницаемость либо подвергаться механическим разрывам, в результате чего вышедшие внутрь клетки гидролазы вступают во взаимодействие с важнейшими структурами клетки, вызывая переваривание белков, нуклеиновых кислот, гликозаминогликанов и других субстратов. Лизосомы

Таблица 16

Классификация лизосомальных ферментов [782]

Фермент	Ткань, из которой получены лизосомы	Автор
Кислая фосфатаза	Печень крысы	[264]
Кислая РНКаза	Почка крысы	[262]
Кислая ДНКаза	Лейкоциты	[781, 782]
	Макрофаги	[224, 225]
β-Глюкуронидаза	Селезенка	[124]
Катепсины	Кишечник, головной мозг	[172, 376, 437]
Арилсульфатаза	Печень	[691, 692, 865]
β-Галактозидаза	»	[723]
N-Ацетилглюкозаминода-за	»	[723]
β-Маннозидаза	»	[723]
Коллагеназа	»	[299]
β-Глюкозидаза	»	[470]
Гиалуронидаза	»	[125]
Фосфатидатфосфатаза	»	[722]
Фосфопротеидфосфатаза	»	[838]
Эстеразная активность	»	[736]
Цитохром-С-редуктаза	Гранулы лейкоцитов и печень	[686]

широко распространены в клетках животных, особенно ими богаты различные фагоциты (макрофаги, лейкоциты, остеокласты и др.).

Латентная способность лизосомальных ферментов и их активация при низких температурах и последующем отогреве также впервые была изучена в лаборатории Де Дюва [262—264] и Таппеля [801, 802]. Было исследовано влияние различных факторов, вызывающих лабилизацию лизосом и выход гидролаз в окружающую среду. В табл. 17 представлены результаты исследований, указывающие на изменения, происходящие в лизосомах в момент замораживания — оттаивания, при перепаде осмотического давления и изменении концентрации растворенных веществ. В тех экспериментах, в которых лизосомы подвергали 10-кратному замораживанию — оттаиванию, а затем фракционировали на мембранную фракцию и растворимые ферменты, арилсульфатаза и β-глюкуронидаза освобождались в виде растворимого фер-

мента на 100%, РНКаза — на 73%, кислая фосфатаза — на 55%. После освобождения лизосомальных ферментов возникают такие летальные метаболические реакции, как разобщение окислительного фосфорилирования, гидролиз митохондриальных мембран. Эксперименты показали, что митохондриальные мембраны в присутствии гидролаз через 30 *мин* при температуре +37° подвергаются диссоциации на 20%, а через 3 *ч* — на 40%. Параллельно происходят изменения в микросомной фракции и ядре клетки.

Поэтому при замораживании и отогреве клеток и тканей необходимо соблюдать условия, при которых повреждения лизосом

Таблица 17

Активность лизосомальных ферментов в среде при различных экспериментальных условиях [801]

Характер ферментов	Энзимы, расположенные в порядке уменьшения их активности	Воздействия, вызывающие выход гидролаз из лизосом
Энзимы, легко высвобождающиеся из лизосом (свободная активность)	Арилсульфатаза	Обработка детергентом, повторное замораживание — оттаивание. Переокисление, радиация. Осмотическое давление, pH, связывание катионов, ЭДТА - комплексирование
	β-Глюкуронидаза	Обработка детергентом, замораживание — оттаивание. Радиация, осмотические градиенты, pH
Энзимы, ассоциированные с лизосомальными мембранами	Катепсины, кислая фосфатаза	Обработка детергентом, замораживание — оттаивание. Радиация, осмотическое давление, pH
	Рибонуклеаза	То же, что и в случае арилсульфатазы

были бы минимальными. Эксперименты показывают, что при постепенном повышении молярности сахарозы в среде даже до 0,8 М лизосомы могут быть фракционированы в интактном состоянии. Максимальная устойчивость лизосом наблюдается в 0,45 М растворе сахарозы с добавлением в нее 0,4 *мг* гликогена на 1 *мл* среды при 0°. Кроме гликогена устойчивость лизосом повышают декстраны и сывороточный бычий альбумин. Однако до настоящего времени нет достаточно эффективных способов стабилизации лизосом при низких температурах.

Активность лизосомальных ферментов при замораживании клеток костного мозга. Развитие и совершенствование метода низкотемпературного консервирования клеток костного мозга неразрывно связано с биохимическим изучением параметров клеток при воздействии на них низких температур и криопротекторов. Одним из таких важных показателей успешного консервирования является появление в среде инкубации после оттаивания гидролитических

ферментов в результате нарушения проницаемости мембран лизосом либо их деструкции [262, 237, 569]. В результате выхода латентных гидролаз из лизосом в клетке возрастает степень литических процессов, приводящих к ее гибели [483, 728—733].

С целью предотвращения подобного рода нарушений при замораживании клеток костного мозга в последнее время наряду с традиционными криопротекторами широко используются стабилизаторы типа гидрокортизона, хориквина, холестерола и ацетилсалициловой кислоты. На основании данных, полученных в результате изучения способности клеток расти в культуре и их дыхательной активности, можно сделать вывод, что эти параметры клеток сильно нарушаются при замораживании объектов, если в среду замораживания не был добавлен раствор 10%-ного ДМСО; эти изменения наступали в связи с резким повышением в окружающей среде активности кислой фосфатазы. Из всех изученных стабилизаторов наибольшее влияние на активность кислой фосфатазы оказывает ацетилсалициловая кислота в концентрации 0,001 М [630—632].

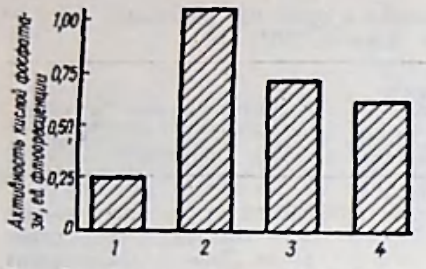


Рис. 75. Активность кислой фосфатазы в среде суспендирования после замораживания клеток костного мозга [630]:
1 — контроль; *2* — без криопротекторов; *3* — 10%-ный ДМСО; *4* — 0,001 М ацетилсалициловая кислота.

В последующих исследованиях на клетках костного мозга было подтверждено, что ни гидрокортизон, ни хлориквин не оказывают выраженного стабилизирующего влияния на лизосомы и не предотвращают выход гидролитических ферментов в среду инкубации после оттаивания замороженных клеток. Оказалось, что более выраженным эффектом в этом отношении обладает ацетилсалициловая кислота, которая в сочетании с ДМСО используется при криоконсервации клеток костного мозга. Увеличение активности свободной кислой фосфатазы во всех пробах костного мозга после замораживания — оттаивания, в том числе и в присутствии ДМСО (рис. 75), свидетельствует о том, что лизосомы клеток костного мозга весьма чувствительны к этим экстремальным воздействиям. Из приведенного рис. 75 видно, что использование ДМСО в качестве криопротектора само по себе снижает уровень кислой фосфатазы, т. е. этот криопротектор, проникнув в клетку, положительно влияет на структурное состояние лизосом, которое может быть дополнительно стабилизировано ацетилсалициловой кислотой. Такое комбинированное действие этих двух соединений заметно уменьшает количество свободной кислой фосфатазы в среде замораживания [575, 632, 798].

Вместе с тем имеются сообщения, что такая комбинированная методика обработки клеток костного мозга не всегда эффективна и не предотвращает появления свободных гидролаз в среде замораживания

вания [185, 186, 274]. Такие расхождения в результатах, очевидно, связаны с различными методическими подходами при изучении одного и того же объекта: температурной инкубации, pH, присутствия хелатирующих веществ в среде замораживания, скорости замораживания или оттаивания и др. Исследования показали, что между уровнем свободных гидролаз и выживаемостью существует прямая корреляция, хотя не ясно, какое причинное соотношение существует между лизосомальной активностью и клеточным повреждением. Остается также не ясным, каким образом влияет ацетилсалициловая кислота на стабилизацию лизосом и является ли это действие специфичным, либо речь идет об универсальной стабилизации биомембран клеток, что способствует их более высокой устойчивости к действию экстремальных температур. Полученные к настоящему времени данные по этому вопросу весьма противоречивы, поскольку использованные для исследования лизосомы могли быть в различном физиологическом состоянии перед замораживанием, их мембраны могли быть в разрыхленном либо, наоборот, в стабильном состоянии.

Согласно некоторым данным, неустойчивое состояние лизосомальных мембран зависит от различий в метаболическом состоянии тканей и физико-технических условиях, возникающих в процессе замораживания — оттаивания [163]. Эти факторы очень влияют на уровень свободных гидролаз в среде замораживания и обусловливают прочность связей с биомембраной лизосомы. Поэтому поиски веществ, более или менее специфически стабилизирующих лизосомы клеток костного мозга при замораживании, привели к заключению Персидского и соавторов [631, 632], что подобным действием обладает такой краситель, как трипановый синий, который избирательно действует на мембраны лизосом при внутрибрюшинном введении его крысам. Клетки костного мозга, выделенные из таких животных, инкубировали в дальнейшем в среде с 10%-ным раствором ДМСО и с C^{14}-глицином и замораживали постепенно до температуры —80°. Оказалось, что включение радиоактивного предшественника было гораздо выше у тех клеток, которые перед замораживанием подвергали обработке in vitro красителем. Эти предварительные результаты как будто свидетельствуют о том, что трипановый синий оказывает стабилизирующее влияние на лизосомы, предотвращая выход из них гидролаз. Несколько раньше было показано, что этот краситель по своей природе является резко выраженным ингибитором гидролитических процессов, и клетки животных, дополнительно обработанные этим соединением, сохраняют более высокую выживаемость при замораживании — оттаивании, чем клетки, консервируемые только в присутствии криопротекторов. Это позволяет сделать определенные выводы, суть которых может заключаться в том, что первоочередным в ответе клетки на действие низкой температуры является именно лизосома, нарушение структуры и функции которой может играть ведущую роль в механизме криоповреждения.

Активность свободных гидролаз и других ферментов в тромбоцитах. Ряд исследований, проведенных в этой области, свидетельствует об актуальности биохимических исследований активности свободных гидролаз при замораживании ядросодержащих клеток крови [237]. Необходимо отметить, что подготовка тромбоцитов к низкотемпературному консервированию, связанная с их выделением, растворением и суспендированием в солевых растворах при добавлении сахарозы, маннита или сорбита при обычной комнатной температуре, способствует высвобождению из этих клеток до 20% гидролитических ферментов. После быстрого замораживания тромбоцитов капельным способом до температуры — 196° свободная активность очень сильно возрастает в отогретых объектах, особенно при добавлении сахарозы. Несколько меньшее влияние в этом отношении оказывают солевые растворы, а глицерин в 15%-ной конечной концентрации после замораживания — оттаивания с большей эффективностью, чем сахароза, предотвращает освобождение β-глюкуронидазы и катепсинов из тромбоцитов, суспендированных в солевых растворах. Вместе с тем глицерин не предохраняет выделение из лизосом кислой фосфатазы. Считают, что из всех «латентных» гидролаз β-глюкуронидаза является наиболее чувствительным индикатором лизосомальных повреждений, обусловленных изменением осмотического микроокружения мембран. Показано, что «латентные» ферменты лизосом активируются по-разному, как и криопротекторы по-разному влияют на их интрагранулярную стабилизацию. Поэтому необходимо для оценки состояния лизосомальных ферментов при замораживании — оттаивании определять несколько их видов, а при решении проблемы стабилизации использовать несколько типов стабилизаторов.

Для выяснения возможности сохранения жизнедеятельных тромбоцитов в некоторых опытах их замораживали в плазменных растворах с добавлением ДМСО при температуре от — 20 до — 196° и определяли до и после замораживания интенсивность гликолиза, активность ферментов гексокиназы, дегидрогеназы, ФГАД, ЛДГ, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и содержание АДФ и АТФ. Установлено, что после замораживания — оттаивания уровень лактата в клетках повышается, а АТФ подвергается частичной дегидратации. Активность ЛДГ и дегидрогеназы глюкозо-6-фосфатазы сохраняется; остальные ферменты были менее активны [104].

Элиминация лизосомальных ферментов при перфузии изолированных органов. С целью тестирования жизнеспособности цельной почки в последнее время широко используют исследование в перфузате активности лизосомальных ферментов после гипотермической перфузии различными растворами. Наряду с этим очень часто применяют и такие специфические тесты, как аккумуляцию парааминогиппурата (ПАГ) и потребление кислорода, которые отображают состояние функции различных ферментативных систем ткани почки. Как известно, концентрация ПАГ отражает функцию ферментативных систем, обеспечивающих транспорт веществ через мембраны

клеток клубочкового слоя, а уровень дыхания свидетельствует о функциональном состоянии ферментов электронотранспортной цепи клеток коркового слоя. В качестве примера можно привести данные экспериментов, в которых изолированную почку подвергали гипотермической перфузии раствором гомологичной сыворотки на растворе Рингера. В перфузируемую жидкость для стабилизации лизосом добавляли хлориквин (0,005 М) или гидрокортизон (0,001 М). Орган хранили при температуре + 2—4° в течение 2—30 *ч*. Из рис. 76 видно, что хранение почки, перфузированной с добавлением стабилизаторов, способствует более высокой аккумуляции ПАГ после 24—30 *ч* хранения при температуре + 2—4°. Такое же влияние оказывают стабилизаторы на поглощение кислорода (рис. 77).

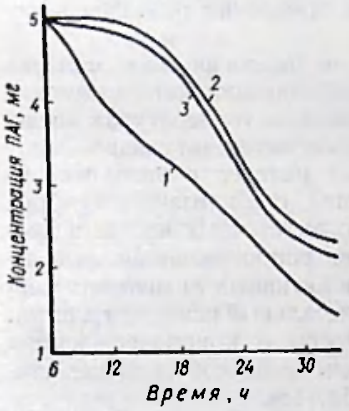


Рис. 76. Уровень поглощения ПАГ почкой, хранящейся при +4° после перфузии ее хлориквином (0,005М) и гидрокортизоном (0,001 М) [631]:

1 — контроль; *2* — хлориквин; *3* — гидрокортизон.

Из представленных данных видно, что замораживание срезов почки до —40° без стабилизаторов и криопротекторов ведет к значительному снижению этих параметров. При добавлении в никуба-

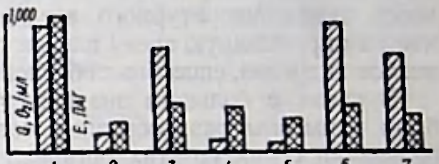


Рис. 77. Влияние стабилизаторов на поглощение кислорода (*Q*) и аккумуляцию ПАГ (*E*) срезами замороженной почки до —40° [483]:

1 — контроль; *2* — замораживание без криопротекторов до —40°; *3* — 10%-ный ДМСО; *4* — гидрокортизон; *5* — хлориквин; *6* — хлориквин + ДМСО; *7* — гидрокортизон + + ДМСО.

ционную среду 10%-ного раствора ДМСО значительно увеличивается поглощение кислорода ($p < 0{,}001$) и несколько меньше (но выше, чем без криопротектора) повышается концентрация ПАГ ($p < 0{,}05$). Вместе с тем видно, что использование лишь одних стабилизаторов без криопротекторов неэффективно [483]. При изучении активности свободной и связанной кислой фосфатазы и кислой РНКазы в срезах кортикального слоя замороженной до температуры —40° почки установлено, что гидрокортизон или хлориквин в условиях гипербарической или нормобарической перфузии почки хотя и способствуют пролонгации биохимических процессов в срезах, но не предотвращают выделения в среду «латентных» гидролаз, что особенно выражено при гипербарической перфузии органа. Хранение почек в условиях нормобарического давления оставляет в среднем 6 *ч*, а при гипербарическом — 48 *ч*. Эти наблюдения согласуются по времени с дестабилизацией лизосом в среде свободных

кислых фосфатаз, рибонуклеаз, катепсинов и β-глюкоронидазы. Следовательно, изучение этих ферментов в перфузате является важным биохимическим и функциональным тестом, оценивающим жизнеспособность консервируемого органа.

В последнее время появились сообщения о положительном влиянии на стабилизацию мембран клеток и, в частности, лизосом печени при ее перфузии растворами, содержащими хлорпромазин и дибензилен. После добавления этих препаратов в перфузируемые растворы уровень кислой фосфатазы, β-глюкоронидазы и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови снижается, что способствует лучшему сохранению морфологических и биохимических свойств печени. Особенно эффективным в этом отношении оказался хлорпромазин [258].

Проблема стабилизации ферментов и биологических мембран при низких температурах. Проблема стабилизации каталитических белков и биологических мембран при низких температурах соединениями криопротекторной природы является актуальной задачей современной криобиологии. Особый интерес в этом отношении представляет изучение возможностей стабилизации мембран лизосом, поскольку повреждение этих субклеточных частиц в процессе низкотемпературного воздействия сопровождается выделением в окружающую среду клетки очень активных литических ферментов гидролаз, способных обусловить летальный исход для клетки.

В связи с большим значением лизосом в криоповреждениях были испытаны разнообразные соединения, способствующие стабилизации структур этих органелл (табл. 18).

Как видно из табл. 18, наиболее выраженным стабилизирующим эффектом на лизосомы обладают соединения золота — миохризон и сольганал, а также некоторые противовоспалительные препараты, такие как ацетилсалициловая кислота, фенилбутазон. Представляет интерес механизм действия некоторых красителей на стабилизацию лизосомальных мембран, например трипанового синего. Из стероидных соединений наибольшей активностью обладают хлорпромазин и солюкортеф.

Необходимо отметить, что действие того или иного стабилизатора зависит от состояния биологического объекта перед замораживанием, природы самого стабилизатора, pH среды, генетического и метаболического состояния клеток, концентрации стабилизатора, наличия солей в среде, среды суспендирования, фракции лизосомальных ферментов и т. д. Например, ацетилсалициловая кислота, фенилбутазон и фторфенаминовая кислота значительно подавляют выделение кислой фосфатазы и β-глюкоронидазы из клеток печени, если эти клетки были предварительно суспендированы при 37° в буферном растворе, содержащем 0,25 М раствор сахарозы и ацетатный буфер с нейтральными значениями pH 7,4.

Если эти соединения использовать в качестве стабилизаторов в такой же среде, но с кислым pH 6,0, то ацетилсалициловая кислота, наоборот, будет слегка ускорять выделение кислой фосфатазы из

лизосом. Было также показано, что при нейтральных pH эффективность таких стабилизаторов, как ацетилсалициловая кислота и фенилбутазон, очень зависит от присутствия в инкубационной среде солей NaCl и KCl [346].

Результаты экспериментов по изучению эффективности таких стабилизаторов, как кортизон и ацетилсалициловая кислота, влияющих на выделение свободной кислой фосфатазы при pH 5,0, показали, что присутствие кортизона в среде инкубации в концентрации 3,5 ×

Таблица 18

Природа стабилизаторов лисозом и степень их эффективности

Стабилизатор	Активность	Автор
Гидрокортизон	Мало эффективен	[483, 630, 631, 632]
Хлориквин	» »	[483, 631, 632]
Аспирин (ацетилсалициловая кислота)	Эффективен	[575, 632]
Фенилбутазон	»	[798]
Фторфенаминовая кислота	»	[798]
Индометазин	Неактивен	[798]
Трипановый синий	Эффективен	[631, 632]
Хлорпромазин	»	[258]
Дибензилен	Мало эффективен	[258]
Цистеин	» »	[274]
Соли золота	Весьма эффективны	[274]
тиомалат золота (миохризин)	» »	
тиоглюконат золота (сольганал)	» »	
Дексаметазон в смеси с 1%-ным ДМСО	Мало эффективен	[765]
ДМСО в концентрации 5—25%	Эффективен	[631, 632, 456]
Солюкортеф	»	[274]

$\times 10^{-4}$ М не влияет на начальную скорость выделения фермента. Ацетиласкорбиновая кислота в этих условиях при концентрации 3×10^{-4} М и 3×10^{-3} М, наоборот, ускоряет элиминацию энзима из лизосом. Зависимость устойчивости лизосомальных ферментов от концентрации водородных ионов была отмечена в более ранних исследованиях, в которых была установлена лабилизация этих субклеточных образований при pH ниже 6,4 [158, 708].

При изучении влияния ацетилсалициловой кислоты, фенилбутазона, фторфенаминовой кислоты и индометазина на изолированные ферменты установлено, что in vitro эти противовоспалительные препараты не оказывают существенного влияния на активность кислой фосфатазы в соответствующих концентрациях (табл. 19). В то же время активность β-глюкоронидазы значительно снижается под влиянием фенилбутазона и индометазина в концентрации соответственно выше 10^{-3} М и 3×10^{-4} М. Вместе с тем этот фермент совершенно не реа-

гирует на присутствие ацетилсалициловой и фторфенаминовой кислот. Следовательно, кислая фосфатаза ведет себя более стабильно под влиянием различных препаратов и должна использоваться как обязательный тест при изучении криоповреждений лизосом.

В табл. 19 представлены результаты исследований по изучению ингибирующего действия указанных выше препаратов при нейтральных значениях pH и подборе соответствующего буфера. Было установлено, что ацетилсалициловая кислота (10^{-3} М) снижает фермен-

Таблица 19

Действие нестероидных противовоспалительных препаратов на активность лизосомальных ферментов печени (% к контролю) [798] *

Препарат	Концентрация, М	Ферментативная активность — время преинкубации			
		Кислая фосфатаза		β-Глюкоронидаза	
		10 *мин*	90 *мин*	10 *мин*	90 *мин*
Ацетилсалициловая кислота (АСК)	10^{-3}	102,2 ± 1,5	102,4 ± 1,0	102,0 ± 4,1	99,4 ± 0,5
Фенилбутазон (ФБ)	10^{-3}	100,3 ± 2,1	96,0 ± 1,8	66,5 ± 2,1	65,4 ± 5,3
	3×10^{-4}	98,2 ± 0,7	94,1 ± 1,1	85,9 ± 4,6	75,5 ± 1,6
	10^{-4}	—	—	96,3 ± 6,0	82,7 ± 3,6
Фторфенаминовая кислота (ФФК)	10^{-4}	98,3 ± 1,5	99,4 ± 0,7	98,3 ± 1,2	100,8 ± 2,1
Индометазин (ИМ)	3×10^{-6}	96,5 ± 1,9	93,8 ± 1,1	91,1 ± 2,2	78,6 ± 3,9

* Энзимы были выделены из тяжелой фракции лизосом после инкубации в течение 90 *мин* при +37° в буферном растворе с pH 7.4, содержащем 0,25 М сахарозы. Преинкубация энзимов с растворами препаратов осуществлена в течение 10—90 *мин* при +37° в буферно-сахарозной среде, содержащей 0,5% этанола.

тативную активность кислой фосфатазы и β-глюкоронидазы после 90 *мин* инкубации, что свидетельствует о стабилизирующем влиянии этого препарата непосредственно на лизосомы. Фенилбутазон и фторфенаминовая кислота оказывают одинаковое ингибирующее действие на активность кислой фосфатазы, однако фенилбутазон в концентрации 3×10^{-4} М подавляет активность β-глюкоронидазы сильнее, чем фторфенаминовая кислота. Однако ни одно из использованных соединений в течение ближайших 30 *мин* не проявляет ингибирующего эффекта на активность лизосомальных ферментов, и эта способность возрастает с увеличением времени инкубации до 2 *ч* и более (табл. 19).

Такие же закономерности при низких значениях pH отмечаются при изучении активности лизосомальных ферментов, выделенных от других животных (табл. 20).

Из приведенных в табл. 20 данных видно, что из всех исследуемых препаратов только гидрокортизон проявляет тенденцию к

Таблица 20

Влияние противовоспалительных препаратов на выделение кислой фосфатазы лизосомами печени кролика [274] *

Препарат **	Количество опытов	Свободная суммарная активность, %
Контроль	13	35,5 ± 4,7
Гидрокортизон-натрий сукцинат	6	27,5 ± 3,5
Ацетилсалициловая кислота (АСК)	6	40,0 ± 4,2
Индометацин (ИМ)	8	45,8 ± 5,3
Фенилбутазон (ФБ)	4	85,1 ± 5,0
Тиомалат золота	14	43,0 ± 4,6

* Лизосомы выделяли из свежей печени методом дифференциального ультрацентрифугирования при 0° в 0,25 М сахарозе [262] совместно с ацетатным буфером (pH 5,0).

** Гидрокортизон-натрий сукцинат (солюкортеф) использовали в концентрации 5,0—0,1 *мг/мл* в растворе 95%-ного этанола; АСК—10^{-3}—10^{-6} М в водном или 50%-ном спиртовом растворе; ИМ (индометазин) —2,0—0,02 *мг/мл*; ФБ—5,0 *мг/мл* в водной среде; тиомалат золота (миофризин) и тиоглюконат золота (сольганал) в концентрации 5,0—0,01 *мг/мл*.

некоторому снижению свободной активности, в то время как остальные препараты при pH 5,0, наоборот, способствуют увеличению выхода кислой фосфатазы в среду инкубации.

Согласно последним данным [263, 264], лизосомы по своей природе гетерогенны, среди них выделяют несколько групп. Например, из печени крысы можно получить так называемую тяжелую и легкую фракцию лизосом и испытать в них чувствительность тех или иных ферментов. Согласно экспериментальным данным (табл. 21),

Таблица 21

Влияние АСК, ФБ и ФФК на выделение кислой фосфатазы с тяжелых и легких фракций лизосом [798]

Лизосомы*	Начальная свободная активность, % общей активности			Свободная активность, время					
				0 и 30 *мин*			30 и 90 *мин*		
	АСК	ФБ	ФФК	АСК	ФБ	ФФК	АСК	ФБ	ФФК
Тяжелые	98	105	102	102	104	90	38	58	56
	101	107	100	91	85	104	32	44	70
	98	97	101	89	87	103	46	56	65
Легкие	105	99	102	74	95	110	89	74	114
	91	95	105	104	85	100	82	95	92
	105	104	102	85	88	94	87	109	88

* Тяжелые и легкие лизосомы — это лизосомы, осевшие в тяжелой и легкой митохондриальных фракциях. Гомогенат из печени центрифугировали при 2700 *об/мин*. Полную лизосомальную фракцию получали путем центрифугирования надосадочной жидкости со скоростью 14 000 *об/мин*. Для получения тяжелой и легкой фракции лизосом надосадочную жидкость центрифугировали либо при 6000 *об/мин*, либо при 14 000 *об/мин* в среде сахарозы и ацетатного буфера.

лизосомы легкой митохондриальной фракции являются компонентами главным образом паренхиматозных клеток, тяжелой фракции — компонентом купферовых клеток, осаждаемых с тяжелым митохондриальным или ядросодержащим материалом клеток [780, 781].

Как видно из приведенных данных, имеющиеся в легкой митохондриальной фракции лизосомальные ферменты в присутствии указанных выше препаратов изменяются в гораздо меньшей степени по сравнению с тяжелыми фракциями лизосом. Ацетилсалициловая кислота в концентрации 10^{-3} М, фенилбутазон — 3×10^{-4} М и фторфенаминовая кислота — 10^{-5} М заметно подавляли выделение из лизосом кислой фосфатазы уже через 30 *мин* после начала инкубации с лекарственным препаратом.

Как уже отмечалось, эффективность различных препаратов ингибирующего действия на лизосомы зависит от концентрации препарата. В качестве примера могут служить данные Танака и сотрудников [798], которые изучали это действие на лизосомах из печени крыс. Как свидетельствуют результаты исследований, выделение ферментов лизосом подавляется ацетилсалициловой кислотой по мере повышения ее концентрации. Испытанные в этом отношении препараты фенилбутазон, фторфенаминовая кислота и индометацин оказывают максимальный эффект только в определенной концентрации, причем индометацин оказывается наименее эффективным. Наиболее эффективной является ацетилсалициловая кислота, которая подавляет выделение лизосомальных ферментов на 58%; фенилбутазон и фторфенаминовая кислота ингибируют эти процессы соответственно на 32,6 и 36,9%. Однако применение специальных растворов показало, что наиболее активным препаратом в этом отношении является фторфенаминовая кислота.

Установлено, что значительным ингибирующим действием на лизосомы обладают также соли золота. Ниже приведены данные по ингибированию (в %) ферментативной активности лизосом тиомалатом золота в печени кроликов и в синовиальной жидкости (1,0 *мг/мл* при pH 5,0 и температуре +37°; преинкубация — 30 *мин*).

	Лизосомы печени кролика	Синовиальная жидкость человека
Кислая фосфатаза	64,5 ± 3,9	48,4 ± 6,1
β-Глюкоронидаза	32,5 ± 5,2	50,2 ± 3,1
Катепсины	30,0 ± 4,3	62,5 ± 4,5

Как видно, цистеин сам по себе не стабилизирует лизосомы, а более того — инактивирует действие тиомалата золота, т. е. тиоловые соединения обратимо действуют на этот процесс. Вместе с тем табл. 18 и 20 свидетельствуют о том, что эффективность солей золота зависит от их концентрации в среде суспендирования.

Полагают, что ионы золота довольно специфично могут связываться с молекулой фермента и изменять их способность проникать

сквозь мембрану лизосом. Таким образом, проблема стабилизации биологических мембран и ферментов — вопрос, не полностью разработанный в настоящее время. Пока еще ничего не известно о молекулярном взаимодействии различных стабилизаторов с биомембранами, о последствиях этого взаимодействия на метаболическую активность реконсервированной клетки. Эти вопросы и ряд вопросов механизма действия этих соединений требуют дальнейшего изучения.

ЛЕД — КАТАЛИЗАТОР ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

В последнее время появились сообщения о том, что понижение температуры биологических объектов до образования в них льда сопровождается ускорением некоторых ферментативных реакций [322—324].

При изучении, например, реактивности амидных связей в пенициллине обнаружено, что гидролиз имидазола и гистидинсодержащей аминокислоты улучшается, если реагирующую смесь инкубировать при температуре не +37°, а при 0° или —18°. Действительно, после 65 *ч* инкубации при +37° ферментативная реакция не происходит, а в переохлажденных растворах она протекает медленно. Максимальная скорость гидролиза происходит в диапазоне температур — 8—28°. Эта реакция тормозится, если в замораживающий раствор добавлены соли NaCl; соли KCl оказывают менее выраженный эффект. Считают, что это связано с более сильным взаимодействием ионов с жидкой фазой клетки. При этом разрушается гидратная оболочка воды и нарушается упорядоченность ее структуры. Было установлено также, что амид-6-аминопенициллиновой кислоты (продукт гидролиза пенициллина) скорее разрушается в

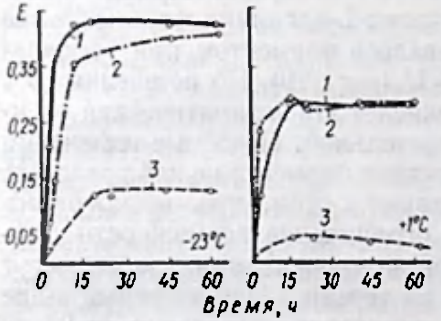


Рис. 78. Гидроксиламинолиз субстратов, распад которых катализируется трипсином [324а]:

1 — этиловый эфир аргинина, *2* — метиловый эфир лизина, *3* — метиловый эфир аргинина. Смесь перед замораживанием содержала 2 *мкг* трипсина на 1 *мл* среды; 0,005 М эфиры; 0,4 М солянокислый гидроксиламин, pH 7,5.

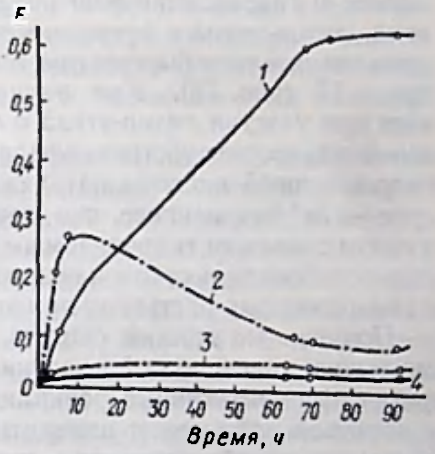


Рис. 79. Гидроксиламинолиз этилового эфира бензоил-L-аргинина [324]:

1 — при —18°; *2* — при +1° в присутствии трипсина (2 *мкг/мл*); *3* — при +1° без фермента; *4* — при —18° без фермента.

замерзающих растворах без присутствия каких-либо катализаторов, таких как, например, имидазол. Такое разрушение субстрата при низких температурах обусловлено, очевидно, тем, что свободные аминогруппы этих соединений реагируют с амидами соседних молекул, образуя полимеры длиной около 8 субъединиц.

В дальнейшем было обнаружено, что льдообразование в клетке может ускорять также такие энзиматические реакции, как гидролиз, аминолиз, дегидрирование и окисление [116, 189, 322, 323, 324а, 653]. Установлено также, что при замораживании биологических структур и образовании льда в клетке ускоряется гидролиз пероксидазы. Эти факты, несомненно, имеют определенное значение при решении прикладных проблем длительного низкотемпературного хранения биологического материала. При исследовании катализируемой трипсином реакции переноса между эфирами некоторых аминокислот и гидроксиламином показано, что такие эфиры, как лизин-этил, лизин-метил и аргинин-метил, реагируют в присутствии трипсина значительно быстрее при температуре —23°, чем в водной среде при +1° (рис. 78). Как видно, наиболее быстро реакция протекает при участии лизин-этила и лезин-метила эфиров. При использовании в качестве субстрата эфира бензоил-L-аргинина формирование гидроксамовой кислоты катализировалось ферментом при температуре —18° интенсивнее, чем при +1° (рис. 79). По истечении 70 ч в связи с полным гидролизом аминокислот эта энзиматическая реакция ослабевала и становилась отрицательной. Подобные изменения в замороженных растворах при отсутствии фермента не наблюдались.

Полученные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на снижение кинетической энергии и ограничение возможности диффузии, ферментативные реакции при замораживании клеток могут ускоряться либо может изменяться их течение. Наблюдаемые выше факты можно объяснить тем, что в диапазоне температур от 0° до —70° компоненты жидкой воды в замороженных системах высокоструктурированы [794]. Возможно, в таких условиях происходит очень тесное пространственное сближение биомакромолекул и их более быстрое взаимодействие. Это происходит потому, что при низких температурах реагирующие компоненты попадают в жидкую концентрированную фазу, где их взаимодействие более благоприятно. Иными словами, молекулы реагирующих компонентов, замороженные в кристаллах льда, расположены в геометрически наиболее выгодных условиях для взаимодействия друг с другом, поскольку поверхность льда может вести себя так же, как своеобразный катализатор. Предполагают, что миграция и перенос протонов во льду осуществляются более активно, чем в обычной воде. Указанные выше предположения о возможной локализации реагентов в жидкой фазе между кристаллами льда, в которых они реагируют в силу высокой каталитической концентрации по такому же принципу, как и в незамерзающих растворах, носят весьма предварительный характер и нуждаются в дальнейшем изучении.

Глава VI

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

В настоящее время четко установлено, что наиболее чувствительны к повреждающему действию замораживания биомембраны [8, 9, 74, 234, 235, 357—362, 491, 499, 535—545]. В то же время наиболее сложные и важные компоненты клетки, в которых, в частности, локализованы механизмы окислительного фосфорилирования, каталитические белки, компоненты ядра, ассоциированы именно с мембранами.

Среди указанных выше структурно-функциональных компонентов клетки, пожалуй, наиболее чувствительными к действию низких температур являются мембраны лизосом и митохондрий, в которых реализуется механизм окислительного фосфорилирования и дыхания [241, 647, 651, 729—735]. Некоторые исследователи криоповреждениям митохондрий отводят основную роль в гибели клеток и органов в результате замораживания [358, 359, 734]. В то же время характер влияния различных режимов замораживания на механизм окислительного фосфорилирования и дыхания изучен недостаточно. В связи с этим в данном разделе книги будут изложены в основном криобиохимические аспекты действия низких температур и криопротекторов на структуру и функцию митохондрий и хлоропластов.

КРИОБИОХИМИЯ МИТОХОНДРИЙ

Влияние замораживания на митохондрии представляет интерес не только в биоэнергетическом аспекте, но и в более широком плане, если рассматривать митохондрию как криобиологическую модель для изучения влияния низких температур и криопротекторов на биологические мембраны, поскольку дыхательная и фосфорилирующая активность митохондрий в значительной степени определяется состоянием их мембран.

Для механизмов аккумуляции и трансформации энергии в клетке характерны высокая степень структурной организации и ее относительная морфологическая автономность по отношению к функции других компонентов клетки [24, 25]. Основным механизмом накопления энергии в клетке является окислительное фосфорилирование, сопряженное с транспортом электронов. Эти две ферментативные системы, обеспечивающие поставку АТФ клетке, локализованы

и прочно ассоциированы с мембранами митохондрий. Ферменты цепи транспорта электронов составляют около $^1/_3$ суммарного белка внутренней мембраны митохондрий [25]. Структура мембран вообще и мембран митохондрий в частности сложна и в настоящее время является предметом интенсивного изучения [11, 25, 460].

Митохондрия — одна из наиболее чувствительных органелл клетки к различного рода альтерирующим воздействиям [45]. Замораживание, включающее в себя большое количество повреждающих факторов, также вызывает значительные нарушения структурной и функциональной интеграции митохондрий, что отражается и на функциональной активности других метаболических систем клетки. Так, например, Хендерсон [368] отмечает, что подверженные замораживанию — оттаиванию клетки снижают способность синтезировать нуклеиновые кислоты, белки и липиды. Одной из причин этого является нарушение механизмов биоэнергетики клетки.

Важность сохранения структуры и функции митохондрий для выживания клеток после замораживания следует также из работ Шерман [729—735]. Автор предположил, что повреждения клеток, связанные с замораживанием — оттаиванием, могут четко проявляться на более позднем этапе после оттаивания. Реальность такого «латентного повреждения» была показана им при изучении дыхания, проницаемости и скорости размножения клеток асцитной опухоли в суспензии. Так, например, скорость потребления кислорода клетками сразу после замораживания — оттаивания составляла 86% контроля, а через 8 *ч* инкубации при 22° падала на 97% по сравнению с таковой сразу после оттаивания. Клетки, которые не замораживались, за это же время теряли лишь 39% дыхательной активности.

С усложнением биологической организации реальность феномена «латентного повреждения» должна возрастать. Такой вывод следует из опытов Шермана [734] по замораживанию срезов почки. Срезы почки, выдерживаемые в течение 15 *мин* в 15%-ном глицерине, медленно замораживали до —79° и быстро оттаивали. Потребление кислорода этими срезами после оттаивания составляло 4,9 ед. против 10,4 ед. в контроле. Через 4 *ч* инкубации при температуре +37° дыхательная активность замороженных срезов составляла 0,8 ед. против 7,6 ед. в контроле. Из этих опытов видно, как быстро развиваются повреждения в тканях по истечении некоторого времени после оттаивания даже в том случае, если эти ткани были сбработаны глицерином до замораживания. Возможно, за 15 *мин* инкубации срезов почки в растворе глицерина он проникал в клетки лишь в небольшом количестве и поэтому не обеспечивал удовлетворительной криозащиты. Поэтому следует считать, что угнетение скорости потребления кислорода срезами ткани отражает повреждение клеток в целом и митохондрий в частности. Быстрое замораживание и медленное оттаивание является более разрушительным для митохондрий, чем медленное замораживание и быстрое оттаивание.

Действительно, было установлено, что потребление кислорода срезами почки после замораживания — оттаивания снижается в 4 раза при медленном и в 10 раз — при быстром замораживании. Дыхательный контроль и цитохромоксидазная активность митохондрий, изолированных из срезов почки, составляли соответственно 52 и 80% при быстром и 43 и 53% при медленном замораживании. Ультраструктурные нарушения митохондрий выражаются в изменении их формы, набухании, просветлении матрикса, нерегулярности и потери крист. Очевидно, угнетение дыхательной активности митохондрий связано с нарушением их структуры.

Поскольку многие клетки после замораживания — оттаивания все же выживают, можно думать, что наблюдаемые под микроскопом явления их набухания, разрывы митохондрий и эндоплазматического ретикулума являются, очевидно, обратимым процессом, т.е. после отогрева в клетке может происходить рекомбинация поврежденных макромолекул и мембранных компонентов (самосборка), результатом чего может служить частичное или полное восстановление ее функции.

Замораживание срезов печени мыши в жидком пропане (—175°), изопентане (—155°) вызывает значительные нарушения структуры митохондрий. Наиболее сильные повреждения митохондрий происходят при замораживании срезов в жидком пропане. При этом митохондрии приобретают нерегулярные контуры и самые причудливые формы. Наблюдаются разрывы мембран, нарушение крист, просветление матрикса. Часто в матриксе обнаруживаются цитоплазматические структуры: гранулы гликогена, рибосомы. Повреждения митохондрий проявляются также в значительном увеличении межмембранного пространства. При замораживании в сухом льду структура митохондрий нарушается меньше. Это, очевидно, объясняется различной скоростью охлаждения этих органелл при —79° (сухой лед) и —155—175° (сжиженные пропана) [810].

При изучении влияния замораживания на дыхание и фосфорилирование митохондрий печени крысы было установлено, что замораживание и последующее оттаивание сильно уменьшает эстерификацию неорганического фосфата и скорость окисления субстратов митохондриями. Если к суспензии митохондрий после оттаивания добавить НАД, цитохром С и АТФ, то их дыхательная активность в значительной степени восстанавливается. Применение глицерина и гликоля до замораживания вызывает инактивацию некоторых митохондриальных энзимов. Было показано [733, 810], что замораживание до —79° суспензии митохондрий, приготовленной на 30%-ной сахарозе, в значительной степени инактивирует их дыхательную цепь, хотя такой концентрированный раствор сахара способен полностью сам по себе подавить процесс фосфорилирования и без замораживания.

Использование в качестве криопротектора более разбавленных растворов сахаров, например 8,5%-ного раствора сахарозы, при замораживании митохондрий позволяет сохранить лишь 15%

способности этих органелл к фосфорилированию на фоне заметного снижения коэффициента Р/О.

Таким образом, как при замораживании срезов органов, так и при замораживании суспензий изолированных митохондрий печени происходит угнетение их дыхательной и фосфорилирующей активности. Интересно, что добавление НАД, цитохрома С и АТФ способствует существенному восстановлению дыхательной активности. Это обстоятельство может свидетельствовать о локализации криочувствительных участков дыхательной цепи и роли АТФ в обратимости повреждений этой цепи [647]. Однако в сравнительном аспекте митохондрии различных клеток по-разному реагируют на низкотемпературное воздействие. Если митохондрии клеток высокоорганизованных животных весьма чувствительны к таким экстремальным воздействиям, то у более низкоорганизованных их реакция на температурные перепады иная.

В литературе имеются данные, например, о высокой резистентности к повреждающему действию замораживания мембран дрожжевых митохондрий [137]. Подтверждением этому служили опыты, в которых суспензию митохондрий очень быстро замораживали в жидком азоте и быстро оттаивали в изотоническом растворе маннита, содержащем 1%-ный раствор БСА. При этом дыхание, окислительное фосфорилирование (Р/О), дыхательный контроль и морфология митохондрий практически не изменялись. Более того, дыхательный контроль этих митохондрий сохранялся и через 53 дня хранения их в жидком азоте. Наоборот, митохондрии печени крысы, суспендированные в 0,25 М сахарозе и подверженные такому же режиму замораживания — оттаивания, полностью теряли дыхательный контроль. Однако митохондрии дрожжей, замороженные при температуре до —5° (по-видимому, медленно) и быстро оттаянные, имели низкую дыхательную активность и утрачивали дыхательный контроль. Считают, что причина наблюдаемого различия в криочувствительности между печеночными и дрожжевыми митохондриями может заключаться в том, что фосфолипидный состав мембран дрожжевых митохондрий значительно отличается от фосфолипидного состава мембран митохондрий печени. Кроме того, дрожжевые митохондрии в 2 раза меньше митохондрий печени и дыхательная активность дрожжевых митохондрий (на 1 *мг* белка) в несколько раз выше, чем печеночных.

Как видно, повреждающее действие замораживания на такие биологические структуры, как митохондрии, в значительной степени зависит от скорости охлаждения и присутствия в среде замораживания криопротекторов [541, 762, 763]. Подтверждением этого могут служить результаты собственных исследований, проведенных при изучении влияния различных режимов замораживания на изолированные митохондрии печени крысы [7, 8, 9, 54, 55]. В экспериментах in vitro изолированные митохондрии печени крысы медленно охлаждали в виде суспензии до —25° и затем хранили в течение 24 ч при этой же температуре. При этом их функциональное

состояние после быстрого оттаивания суспензии свидетельствовало о том, что в характерной точке кривой — фазе 1 (рис. 80) не происходит существенного повреждения митохондрий, хотя в этой фазе основная масса свободной воды суспензии уже закристаллизовалась, о чем свидетельствует резкий излом термограммы [690]. Кинетика окислительно-восстановительных взаимопревращений НАД митохондрий в ответ на добавления субстратов и АТФ после оттаивания из фазы 1 также почти не изменяется (рис. 81). Наиболее значительные изменения в митохондриях наблюдались после от-

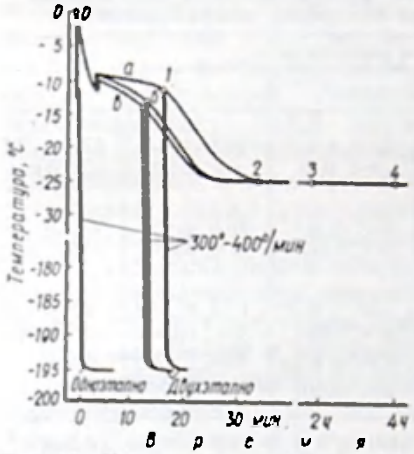


Рис. 80. Кривые скоростей замораживания суспензии митохондрий печени крысы [7, 8]:

а — в среде выделения; *б* — в 10%-ном растворе ПЭО-400, приготовленном на среде выделения; *в* — в 10%-ном растворе глицерина, приготовленном на среде выделения; *0, 1, 2, 3, 4* — фазы замораживания. Объяснение в тексте.

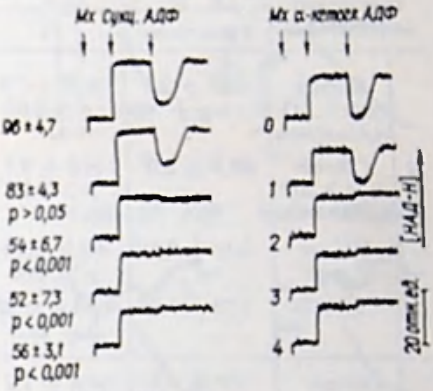


Рис. 81. Кинетика окислительно-восстановительных превращений НАД митохондрий после оттаивания из различных фаз медленного замораживания (см. рис. 80) [9]:

0, 1, 2, 3, 4 — фазы замораживания; Мх — гомогенат митохондрий; Сукц. — добавление сукцината; АДФ — добавление аденозиндифосфата; α-кетогл. — добавление α-кетоглутарата.

таивания их в суспензии из фазы 2 (табл. 22), причем дыхательная активность на α-кетоглутарате в 3-м метаболическом состоянии угнеталась значительно больше, чем на сукцинате.

Как видно из данных табл. 22, отношение скорости потребления кислорода митохондриями на α-кетоглутарате в состоянии 3 к таковой на сукцинате составило: в контроле 0,62 ± 0,05, в фазе 2 — 0,37 ± 0,03 ($p < 0,002$). Уровень восстановленности НАД митохондрий, измеренный до прибавления субстрата, уменьшался в фазе 2 на 44%. Это, по-видимому, свидетельствует о выходе НАД из соответствующих структур митохондрий. Дыхательный контроль по Ларди и Вэлману при этом почти полностью исчезает как за счет угнетения дыхания в состоянии 3, так и в силу стимуляции дыхательной активности митохондрий в состоянии 2. Окисление НАД-Н митохондрий в ответ на добавление АДФ не происходило, что согласуется с исчезновением дыхательного контроля. В последующих

фазах кривой медленного замораживания существенных дополнительных повреждений митохондрий по сравнению с фазой 2 не наблюдалось. Результаты, полученные при медленном замораживании митохондрий, имели качественно такой же характер, как и при замораживании гомогенатов печени крысы.

Согласно представлениям Лавлока [497], повреждения мембран при медленном замораживании сопровождаются выходом из них

Таблица 22

Дыхательная активность и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крысы в различных фазах медленного замораживания

	Измеряемый параметр	Фазы замораживания				
		0 (контроль)	1-я	2-я	3-я	4-я
Сукцинат	Состояние 2, ΔО *нА/мг/мин*	30,0 ± 3,5	30,0 ± 2,3 $p > 0,05$	52,0 ± 4,0 $p < 0,01$	67,0 ± 4,0 $p < 0,001$	67,0 ± 7,1 $p < 0,001$
	Состояние 3, ΔО *нА/мг/мин*	148,0 ± 8,0	144,0 ± 9,1 $p > 0,05$	65,0 ± 4,4 $p < 0,001$	75,0 ± 3,5 $p < 0,001$	67,0 ± 7,1 $p < 0,001$
	ДК по Ларди	5,19 ± 0,49	4,9 ± 0,45 $p > 0,05$	1,26 ± 0,07 $p < 0,001$	1,12 ± 0,04 $p < 0,001$	1,0 ± 0,0 $p < 0,001$
	АДФ/О	1,73 ± 0,06	1,83 ± 0,32 $p > 0,05$	1,01 ± 0,24 $p < 0,001$	—	—
α-Кетоглутарат	Состояние 2, ΔО *нА/мг/мин*	14,0 ± 1,3	16,0 ± 1,2 $p > 0,05$	19,0 ± 1,2 $p < 0,02$	20,0 ± 1,3 $p < 0,01$	18,0 ± 1,8 $p > 0,05$
	Состояние 3, ΔО *нА/мг/мин*	90,0 ± 5,8	81,0 ± 4,3 $p > 0,05$	24,0 ± 1,5 $p < 0,001$	27,0 ± 2,1 $p < 0,001$	18,0 ± 1,8 $p < 0,001$
	ДК по Ларди	6,62 ± 0,76	5,32 ± 0,53 $p > 0,05$	1,23 ± 0,07 $p < 0,001$	1,31 ± 0,11 $p < 0,001$	1,00 ± 0,0 $p < 0,001$
	АДФ/О	2,77 ± 0,08	2,61 ± 0,15 $p > 0,05$	1,23 ± 0,26 $p < 0,001$	—	—

Примечание. Цифровой материал обработан методом парных сравнений с контролем. Количество животных в каждом опыте — 7. АДФ/О — коэффициент фосфорилирования, ДК — дыхательный контроль.

фосфолипидов, однако в приведенных опытах выход их из мембран митохондрий был незначительным. Поэтому основным повреждающим фактором при медленном замораживании суспензии на участке кривой между фазами 1 и 2 является, по-видимому, глубокая дегидратация митохондрий, поскольку при высушивании митохондрий сублимацией в вакууме и последующей регидратации происходят значительные нарушения их дыхательной и фосфорилирующей активности [394]. Не исключено также и механическое воздействие на мембраны митохондрий растущих кристаллов льда. Таким образом, медленное замораживание до температуры —25° вызывает значительные повреждения митохондрий.

Если митохондрии замораживать быстро до — 196°, то повреждения значительно меньшие по сравнению с повреждениями при медленном замораживании, хотя и при таком режиме замораживания функциональное состояние митохондрий значительно нарушается (рис. 82).

Учитывая, что в фазе I при медленном замораживании митохондрии не повреждаются, они могут быть быстро заморожены из этой фазы до —196° (двухэтапное замораживание). Однако такое двухэтапное замораживание оказывает на митохондрии почти такое же действие, как и быстрое одноэтапное замораживание до такой же температуры. Уровень восстановленности НАД митохондрий после быстрых режимов замораживания и последующего оттаивания также существенно снижается. Однако в результате последующей инкубации оттаянных митохондрий при температуре +26° в присутствии субстратов окисления и кислорода они способны повышать уровень восстановленности НАД до величины, характерной интактным митохондриям. Наиболее эффективным в этом отношении оказывается сукцинат (рис. 83). Это связано, по-видимому, с тем, что скорость выработки АТФ на этом субстрате после замораживания до —196° и последующего оттаивания существенно выше, чем, например, на α-кетоглутарате.

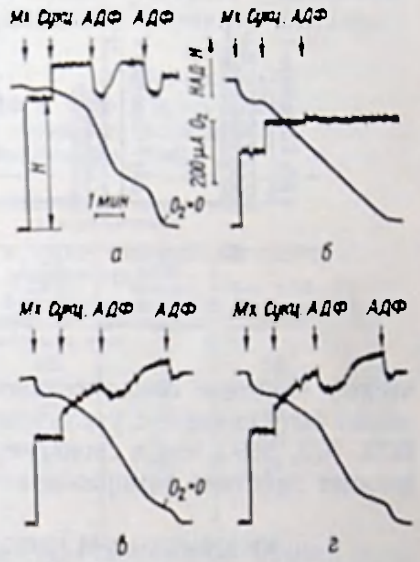


Рис. 82. Характер кривых потребления кислорода и окислительно-восстановительных превращений НАД митохондрий после различных режимов замораживания и последующего оттаивания [54, 55]:

а — контроль; *б* — медленное замораживание до —125°; *в* — быстрое замораживание до —196°; *г* — двухэтапное замораживание до —196°.

Для выяснения характера криоповреждении митохондрии были использованы разобщители дыхания и окислительного фосфорилирования — динитрофенол (ДНФ) и олигомицин. Установлено, что ДНФ стимулирует дыхание митохондрий, подвергнутых замораживанию и оттаиванию, не более чем АДФ. Это, по-видимому, указывает на то, что угнетение дыхания митохондрий не связано с нарушениями в энерготранспортной цепи, а определяется повреждениями самой цепи переноса электронов либо мембраны, на которой эта цепь локализована.

С помощью олигомицина показано, что стимуляция дыхания митохондрий во 2-м метаболическом состоянии, вызываемая замораживанием — оттаиванием, в значительной степени обусловлена увеличением АДФазной активности митохондрий. Согласно хемоосмоти-

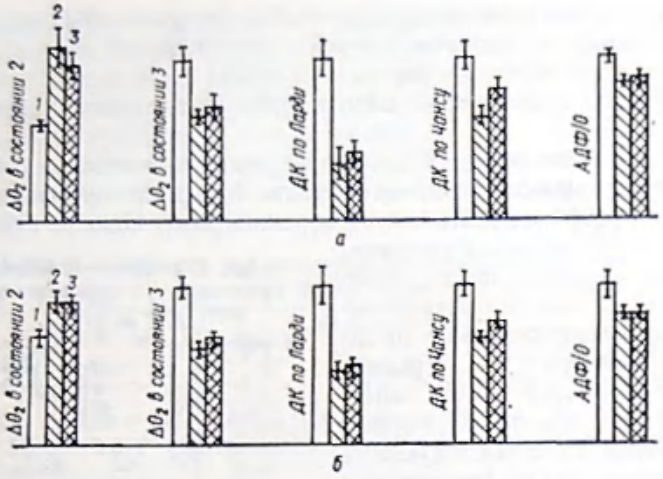


Рис. 83. Влияние одно- и двухэтапного замораживания на митохондрии печени крысы [54]:

а — на α-кетоглутарате; *б* — на сукцинате; *1* — контроль — 100%; *2* — одноэтапное замораживание до —196°; *3* — двухэтапное замораживание до —196°.

ческой гипотезе окислительного фосфорилирования Митчела, это может быть связано с увеличением протонной проводимости мембран [572, 573, 569], что в свою очередь может характеризовать повреждающее действие замораживания на митохондриальные мембраны.

КРИОБИОХИМИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

При замораживании суспензии митохондрий в 0,44 М сахарозе от —5 до —80° обнаружено, что наиболее повреждающим является замораживание и хранение при температуре —15°, в результате чего из этих органелл наблюдается быстрый выход таких ферментов, как β-оксибутиратдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы. Замораживание и хранение при температуре — 40° и ниже практически безвредно для митохондрий.

Электронномикроскопические наблюдения за структурными изменениями митохондрий свидетельствуют о том, что значительный выход β-оксибутиратдегидрогеназы наблюдается лишь тогда, когда повреждаются митохондриальные мембраны. Из фракции набухших, но не поврежденных митохондрий выходит только глутаматдегидрогеназа. Такие повреждения митохондрий объясняются увеличением концентраций сахарозы и солей при вымораживании воды суспензии. Считают, что в таких концентрациях сахароза может в большом количестве диффундировать через внутреннюю мембрану митохондрий и при разбавлении раствора во время оттаивания вызывать набухание и разрывы митохондрий. Поскольку диффузия — функция от температуры, то уже при—40° она сильно подавлена и повреждения мембран митохондрий поэтому не наблюдается [509,510].

Ранее было установлено [506], что замораживание сопровождается изменением ферментативных ассоциатов и коферментов при повреждении клеточных мембран. Если после размораживания клеток к ним добавляли НАД-Н, то наступало восстановление активности некоторых дегидрогеназ, локализованных в мембране клетки, в частности алкогольдегидрогеназы. Определение чувствительности митохондриальных ферментов к низким температурам было проведено Лоомисом [480], который установил, что быстрое охлаждение способствует их стабилизации в присутствии субстрата и сахарозы. Аналогичным стабилизирующим эффектом на ферменты митохондрий обладает НАД-Н.

Таблица 23

Сравнительный эффект АТФ, АДФ и АМФ в присутствии субстратов на окислительную активность ферментов митохондрий после замораживания [480]

Субстрат	Восстановление активности после замораживания			
	Полная система с АТФ	АДФ вместо АТФ	АМФ вместо АТФ	Без АТФ
Цитрат	65	65	16	18
Ацетальдегид	72	74	49	71
L-Пролин	37	37	39	47
L-Глутамат	52	31	31	46
Холинхлорид	137	147	60	58
β-Гидроксибутират	64	89	70	72

Изучение энзиматической активности гомогенатов печени крысы после размораживания показало, что влияние различных предшественников адениловой системы на стабилизацию ферментов митохондрий проявляется по-разному (табл. 23).

Как видно из приведенных данных, эффективностью обладает главным образом АДФ, в то время как АМФ не предохраняет ферменты от повреждающего действия холода. Стабилизирующим действием на ферменты обладают также субстраты и другие коэнзимы (АТФ, НАД-Н и цитохром С). Ниже приведены данные о влиянии 0,25 М растворов субстратов на замораживание гомогенатов печени.

	Без коэнзима и без субстрата	Без коэнзима, но с субстратом	С коэнзимом, но без субстрата	С коэнзимом и с субстратом
Сукцинат	27	44	56	86
Цитрат	5	66	40	99
Ацетальдегид	9	18	60	84
L-Пролин	14	42	51	76
L-Глутамат	0	9	65	78
Холинхлорид	53	68	158	176
L-Малат	16	38	25	36
L-Лактат	5	15	43	52
α-Кетоглутарат	4	24	20	33
Оксалацетат	12	29	4	14
Пируват	0	10	—2	4

Следовательно, восстановление активности ферментов, катализирующих окислительное фосфорилирование, после размораживания происходит более эффективно в результате добавления никотинамидов. Цитохром С восстанавливает окисление сукцината, а АТФ — холина и цитрата. Другие коэнзимы менее эффективны, как и замораживание в присутствии субстратов. Хороший эффект на активность митохондриальных ферментов оказывает сахароза, особенно при медленном замораживании этих органелл.

Фишбейн и Стоувел [287, 288] измеряли активность сукцинат-цитохром-С-редуктазного комплекса дыхательной цепи в качестве теста на повреждение митохондрий. Авторы показали, что при замораживании срезов печени мыши до — 25° со скоростью 1° в минуту и последующем быстром оттаивании происходит почти двукратное уменьшение активности этого фермента дыхательной цепи. Интересно, что существенных различий при замораживании срезов в 0,25 М сахарозе, трис- или фосфатном буферах или даже в дистиллированной воде обнаружено не было. В работе также показано, что повреждение сукцинат-цитохром-С-редуктазного комплекса происходит на стадии завершения кристаллизации воды суспензии.

При замораживании срезов печени при температуре от +4 до — 25° со скоростью 1° в минуту активность сукцинат-цитохром-С-редуктазы не изменяется до начала кристаллизации и была близка к норме сразу же после выделения скрытой теплоты кристаллизации. По истечении этого процесса отмечается падение активности почти вдвое по мере снижения температуры замораживания (табл. 24). Причем снижение активности фермента на 25—50% происходит в основном в течение первых пяти минут, после чего с понижением температуры она практически не изменяется. Из табл. 24 видно, что момент образования льда не является наиболее повреждающим при замораживании, а падение активности фермента связано с другими повреждающими факторами (дегидратацией, концентрацией электролитов либо ростом внутриклеточных кристаллов) и зависит также от состава среды, в которой ресуспендируются клетки (табл. 24).

Как видно из данных табл. 24, замораживание в некоторых средах вызывает значительную потерю активности сукцинат-цитохром-С-редуктазы по сравнению с контрольными образцами. Однако значительных различий в активности фермента не имеется независимо от того, заморожена ли ткань в 0,25 М сахарозе, 0,12 М трис-HCl-буфере при pH 8,4 (— 10°), 0,15 М фосфатном буфере при pH 7,6 (— 10°) или даже в дистиллированной воде. Поскольку сукцинат-цитохром-С-редуктазный комплекс локализован исключительно в митохондриях, изучение его активности может свидетельствовать о состоянии дыхательного контроля митохондрий в связи с проницаемостью их мембран для молекул воды [457].

Заслуживает внимания факт, что если указанные выше среды суспендирования не используются, то происходит значительная потеря энзиматической активности этого комплекса. Причины этого

пока не ясны. Возможно, это связано с резким изменением pH среды, которая изменяет проницаемость митохондрий. Добавление ДМСО или глицерина в среду суспендирования в концентрации 5—30% предохраняет сукцинат-цитохром-С-редуктазный комплекс от повреждения при замораживании.

Повреждение энзиматической активности при замораживании — оттаивании зависит, возможно, от надмолекулярной организации энзиматического комплекса, поскольку большинство мономолекулярных форм энзимов не повреждается при замораживании. Действительно, метод низкотемпературной лиофилизации давно ис-

Таблица 24

Восстановление сукцинат-цитохром-С-редуктазной активности после медленного замораживания срезов печени мыши, суспендированных в различных средах [287]

Суспензионная среда	Восстановление, *мкмоль/мин*	Время, *мин*					
		1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я
Контроль (не замораживался), 0,25 М сахароза	100,0 + 2,45	—	++	++	++	++	++
1° в минуту до —25°, 0,25 М сахароза	55,7 ± 1,90	++	—	—	—	—	++
1° в минуту до —25°, 0,12 М трис-HCl-буфер, pH 8,4	59,2 ± 6,54	++	—	—	—	—	+
1° в минуту до —25°, 0,15 М K_2HPO_4, pH 7,6	61,8 ± 7,31	++	—	—	—	—	++
1° в минуту до —25°, обычная водная среда	63,7 ± 5,04	++	—	—	—	—	++
1° в минуту до —25°, сухое замораживание	52,6 + 2,88	++	++	+	[illegible]	++	—

Примечание. $p > 5\%$ (+); $p > 1\%$ (++).

пользуется для сохранения таких «простых» энзимов. То, что диссоциация и реассоциация белковых субъединиц действительно происходит в процессе такой обработки, показано в работе Маркерта [532], который ассоциировал пять изозимов ЛДГ из одного, замораживая и оттаивая их в 0,1 М хлориде натрия. В этом случае все пять субъединиц оставались каталитически активными, т. е. было получено полное восстановление их энзиматической активности.

Поэтому весьма правдоподобно, что макромолекулярная диссоциация ферментов — это обычный патогенетический механизм при повреждении замораживанием — оттаиванием во всех биологических системах. Если реассоциация таких ферментов неполная или приводит к неправильной или нефункциональной агрегации, то внутриклеточные изменения будут весьма заметны. Однако даже тогда, когда клетка по своей функции кажется нормальной, нет гарантии, что самосборка всех макромолекул произойдет должным образом и будет идентична тем структурам, которые присутствовали в клетке до процесса замораживания — оттаивания.

Более вероятно, что если диссоциация фермента и происходит, то наиболее поврежденные ферментативные комплексы при самосборке реассоциируются в другой последовательности, что нарушает функцию регенерированной системы. Сукцинат-цитохром-С-редуктазная система — это комплекс, который необходим для выполнения основной функции митохондрий — генерации химической энергии для нужд клетки. Выбор сукцинат-цитохром-С-редуктазы как индикатора повреждений при замораживании — оттаивании основывается на том, что эта система очень чувствительна к инактивирующим влияниям разнообразных процедур — таких, например, как быстрое замораживание и др.

Фишбейн [287—289] изучил состояние этого комплекса при различных режимах замораживания срезов печени. Он показал, что при скорости замораживания 1° в минуту и 10° в секунду активность этого участка дыхательной цепи составляет 50% по отношению к контролю и лишь при скорости замораживания 100° в секунду она уменьшается в 9 раз. Последнее обстоятельство, возможно, связано с образованием кристаллов льда внутри митохондрий.

Влияние глубины и скорости замораживания на изолированные митохондрии печени крысы изучалось также в работе Грейффа с сотрудниками [329—332]. Окислительное фосфорилирование в данном случае нарушалось больше при быстром замораживании, чем при медленном, и зависело от глубины замораживания и температуры хранения биологического материала. Хранение митохондрий в течение 5 дней в жидком азоте лишь незначительно угнетало их дыхание и фосфорилирование по сравнению с митохондриями, хранившимися при температуре — 40° в течение такого же времени.

МЕХАНИЗМ КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ ХЛОРОПЛАСТОВ

В настоящее время уже доказано, что криоповреждения в результате внеклеточного замораживания клеток растений происходят в результате их дегидратации. В силу этого из клетки экстрагируется свободная и структурная вода, а также повышается концентрация межклеточных растворенных веществ, в частности солей [465].

Кроме того, было установлено, что фракции белков из растительных экстрактов, полученных при скоростном центрифугировании (от 30000 до 50000 g), очень быстро выпадают в осадок при замораживании. Надосадочные компоненты, содержащие растворимые протеины, не подвергались видимым изменениям после холодового воздействия. Указанные выше фракции, чувствительные к замораживанию, более чем на 50% состоят из мембранных элементов и содержат большой процент липидов [357].

Как известно, ряд функций ферментов внутри клетки тесно связан с мембранными системами. Особенно ярко метаболическая функция ферментов, ассоциированных с мембранами, может быть пока-

зана на примере цепи транспорта электронов в митохондриях и хлоропластах. Установлено, что замораживание митохондрий животных довольно заметно снижает окисление субстратов и они теряют способность к окислительному фосфорилированию. Однако если после замораживания к митохондриям добавить соответствующие кофакторы, то скорость окисления восстанавливается [647]. Это свидетельствует о том, что потеря активности была вызвана инактивацией ферментов, локализованных в цепи транспорта электронов. Действительно, при замораживании чувствительных к холоду растительных белковых фракций можно выявить не только криопреципитацию липопротеинов, но и потерю активности цитохромоксидазы [855, 855а]. Причем оказалось, что потеря активности этого фермента не связана с его денатурацией, а связана с какими-то изменениями в структурном белке — «подложке». Предполагается, что АТФаза митохондриального происхождения, локализованная в мембранах, выделенных из растений, также подвергается изменениям при замораживании. Считают, что инактивация этого каталитического белка в мембранах происходит скорее всего под влиянием высоких концентраций солей, поскольку замораживание мембран митохондрий или хлоропластов в среде с низкой ионной силой не снижает, а, наоборот, даже несколько повышает скорость транспорта электронов. В то же время высокие концентрации солей очень быстро вызывают повреждение в электронотранспортных частицах из митохондрий при замораживании, которое сопровождается инактивацией АТФазы [214, 359—361, 855].

Если обработать изолированные митохондрии ЭДТА, то из мембран можно выделить некий белковый фактор (каталитический белок — фактор сопряжения), который является весьма криочувствительным, поскольку быстро инактивируется даже в водной среде при температуре 0°. При более высоких температурах этот фактор очень устойчив [654, 659]. В обычных условиях мембрана митохондрий растений, очевидно, мало чувствительна к низким температурам, поскольку, как известно, изолированные митохондрии в присутствии этого фактора более устойчивые при 0°, чем при комнатной температуре. Этот чувствительный к холоду белок-фермент выполняет в мембране митохондрий важную двойную функцию — обеспечивает транспорт электронов по электронотранспортным частицам и сопряженное с ним окислительное фосфорилирование. Аналогичный каталитический белок — фактор сопряжения — был выделен с помощью ЭДТА из хлоропластов [134]. Вместе с тем недавно было установлено, что этот фактор, выделенный из хлоропластов, в действительности является крирезистентным. Это было показано в опытах, в которых фактор сопряжения был извлечен из мембран хлоропластов и заморожен при температуре — 25°. После оттаивания он был добавлен в систему с полностью инактивированным окислительным фосфорилированием и при этом способствовал не только восстановлению, но и стимуляции окислительного фосфорилирования до пределов, характерных для нормальных хлоропластов.

С целью выявления того, инактивируется ли фактор сопряжения замораживанием in situ, т. е. непосредственно в мембранах, окислительное фосфорилирование мембран хлоропластов инактивировали замораживанием, а затем выделяли из них фактор сопряжения и добавляли к интактным незамороженным мембранам, предварительно лишенным этого каталитического белка. При этом в такой системе было получено почти полное восстановление процесса окислительного фосфорилирования. Это свидетельствует о том, что низкие температуры почти не влияют на функцию связанного с мембраной белкового фактора сопряжения и что существует какой-то другой механизм, который вызывает нарушение процессов окислительного фосфорилирования. Действительно, мембраны хлоропластов, лишенные фактора сопряжения и замороженные, не восстанавливают своей функциональной активности после добавления к ним активного фактора сопряжения. Это указывает на то, что механизм повреждения окислительного фосфорилирования локализован в мембране, но может быть не обязательно связан с инактивацией такого каталитического белка, как фактор сопряжения. Поэтому в настоящее время на основании исследования процессов фосфорилирования, сопровождающихся обратным транспортом электронов, возникло предположение, что ферментами, чувствительными к замораживанию, являются, очевидно, те, которые в основном связаны с образованием АТФ [359, 360].

Известно, что в нормальных условиях хлоропласты в противоположность митохондриям имеют небольшую АТФазную активность и способны расщеплять АТФ и АДФ и $P_н$ путем частичного гидролиза в присутствии фермента АТФазы и трипсина. Эта реакция является прямой противоположностью окислительного фосфорилирования. Последние работы в этом отношении указывают на тесную связь этих двух механизмов — гидролиза АТФ и функции фактора сопряжения [148, 545, 857].

В случае замораживания белков мышц животных денатурация АТФ наблюдается уже при повышении концентрации солей до 0,6 М. При этом активность АТФазы очищенного миозина А и В, а также Н- и α- меромиозина снижается за счет конформационных изменений полипептидных цепей [343]. Вместе с тем в составе замороженных цельных мышц активность АТФазы почти не претерпевает изменений и после оттаивания остается на уровне нормальных величин [622]. Эти различия в экспериментальных данных объясняются как разными условиями проведения опыта, так и тем, что очищенные ферменты более чувствительны к замораживанию, чем те, которые находятся в составе цельных препаратов либо тканей in situ. Например, замораживание в присутствии солей высоких концентраций инактивирует изолированную систему транспорта электронов хлоропластов in vitro, которая в природных условиях весьма устойчива к подобного рода повреждающим факторам. Дегидратация в присутствии солей приводит к заметному увеличению открытых повреждений SH-групп в электронотранспортных частицах

митохондрий, что может свидетельствовать о серьезных конформационных изменениях в этих полипептидных частицах [705, 706].

В табл. 25 приведены данные по изучению активности ферментов растений, устойчивых к замораживанию. Как видно, в клетках расте-

Таблица 25

Ферменты растений, устойчивые к низким температурам

Фермент	Автор
Митохондриальная АТФаза	[855]
Трипсинактивируемая АТФаза хлоропластов	[359, 360]
ЭДТА-растворимый фактор сопряжения хлоропластов	[360]
Мышечная АТФаза	[622]
Цитохромоксидаза	[855а]
Электронотранспортная система хлоропластов	[359]
Митохондриальная электронотранспортная система растений	[647]

ний и животных ферменты митохондрий, гидролизирующие АТФ, обладают устойчивостью к воздействию низких температур. Аналогичным свойством обладают электронотранспортные белково-липидные цепи хлоропластов и митохондрий растений.

Однако различными модельными опытами установлено, что наиболее криочувствительными к низким температурам являются мембранные структуры хлоропластов листьев растений, на которых ассоциированы системы окислительного фосфорилирования. При их повреждении довольно быстро наступает разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования не только при замораживании и высушивании, но и под действием солей высоких концентраций [706]. Из рис. 84 видно, что уже довольно низкие концентрации солей вызывают разобщение фосфорилирования. Следовательно, устранение воды из мембран является по крайней мере одним из важных факторов повреждения, хотя в экспериментальных условиях весьма трудно решать вопросы зависимости функционального состояния мембран от концентрации ионов, поскольку для поддержания структурной целостности всегда требуется присутствие в системе какого-то их количества.

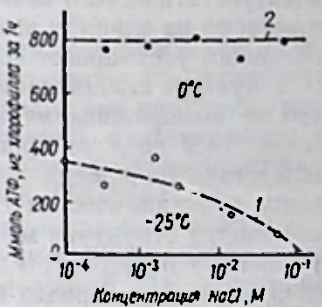


Рис. 84. Фотофосфолирование тщательно отмытых мембран хлоропластов [361]:
1 — при —25°; *2* — при 0° в присутствии различных концентраций NaCl.

Учитывая описанные выше свойства и молекулярную структуру мембран, можно считать, что элиминация воды из мембран под действием низких температур нарушает существующее стабилизированное равновесие между системами белок — липид и белок — вода, в результате чего возникающие структурные перестройки молекулярных слоев мембран изменяют их свойства. Прежде всего это касается таких свойств, как проницаемость и инактивация отдельных молекулярных слоев. Действительно, установлено, что во время замораживания либо высушивания незащищенных мембран хлоропластов наблюдается диссоциация и частичная кристаллизация липидных слоев [441].

Большую роль в повреждении мембран играют также количественные и качественные изменения водных слоев. Известно, что аполярные группы монослоев мембран стабилизированы также и за счет контакта с кристаллической решеткой воды [592—594, 728]. Поскольку существует такая возможность стабилизации гидрофобных слоев липопротеинов мембран, то дегидратация, возникающая в результате действия низких температур, может вызвать необратимые взаимодействия родственных групп.

Необходимо также отметить, что плотность электронов внутреннего слоя белков ниже, чем плотность наружного слоя. В связи с этим предполагают, что внутренняя часть прослойки белков является высокогидратированной и состоит главным образом из воды [441]. Однако пока ничего не известно об изменениях электронных плотностей слоев мембран во время замораживания, поэтому трудно сделать конкретные выводы по этому вопросу. При объяснении повреждающего действия солей на мембраны клетки необходимо учитывать, что молекулы воды связываются с электролитами путем электростатического взаимодействия, порядок и величина которого примерно на единицу выше, чем силы водородных связей, которые, очевидно, удерживают воду в мембране в обычных условиях и способствуют ее стабилизации. При элиминации воды из мембраны путем ее вымораживания и повышения концентрации электролитов оставшаяся вода мембран подвергается деформирующему влиянию вследствие появления в таких насыщенных электрических полях ионов кристаллических структур нового типа. В результате этого изменяется структура мембран [773]. Следует подчеркнуть, что при понижении температуры до 0° для мембранных перестроек достаточно присутствие гораздо более низких концентраций электролитов (от 1 до 2 М), чем это бывает при обычных температурах [705, 706].

Такие особенности в поведении мембран при низких температурах и электролитическом окружении могут быть рассмотрены с точки зрения взаимодействия электропотенциалов. Было отмечено, что мембраны содержат фосфолипиды, которые, как известно, вступают во взаимодействие с белками, например, в случае митохондрий их фосфолипиды контактируют с цитохромом С с помощью электростатических сил, связывающих, таким образом, белки и липиды в мембране в единый комплекс [328]. Следовательно, любое увеличе-

ние ионных сил в окружающей среде приводит к ослаблению сил межмолекулярного связывания этих двух компонентов. Известно, что в результате замораживания в клетке увеличивается концентрация катионов (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+} и других микроэлементов) и анионов (PO_4^{--}, Cl^-). При некоторой ее критической величине взаимодействие типа потенциал — потенциал между протеином и липидом подавляется и это соединение теряет свою устойчивость. В результате этого происходит диссоциация молекулярных слоев белков, и последний может либо диффундировать через мембрану, либо изменять свое расположение внутри ее, нарушая тем самым проницаемость мембран. Все это может явиться достаточным для того, чтобы мембраны подвергались дальнейшей деструкции. Для разобщения окислительного фосфорилирования достаточно весьма ограниченного количества таких диссоциаций на участке мембраны, поскольку этот процесс реализуется только в случае полного сохранения целостности мембраны в митохондриях. Следовательно, наличие нескольких «пробоин» в мембране вполне достаточно для утечки протонов и разобщения фосфорилирования. Поэтому повреждение всей мембранной системы при замораживании не обязательно должно объясняться только денатурацией отдельных белков. Этими причинами могут быть изменения в распределении потенциалов либо нарушение гидрофобных связей, а также повреждения липидов. Тем более, как установлено в последнее время, наиболее чувствительными к замораживанию белками являются липопротеины [361, 362, 497], хотя до последнего времени роль липидов в этом отношении мало исследована.

КРИОПРОТЕКЦИЯ МЕМБРАН

Защита мембран митохондрий животного происхождения. В целях предотвращения повреждений различных биологических структур замораживанием в настоящее время широко применяют различные защитные агенты. Одним из требований, предъявляемых к криопротекторам, является низкая их токсичность в концентрациях, эффективных для криозащиты [493, 496, 498, 566, 568].

Изучая способности глицерина как криозащитного агента для митохондрий печени крысы, Грейф и сотрудники [330—334] показали, что замораживание их суспензии, содержащей 10% глицерина, и хранение в течение 15 дней при температуре — 65° практически не изменяет скорости потребления ими кислорода и неорганического фосфата. Концентрации глицерина 5 и 20%, по данным этих авторов, были либо ниже оптимальной, либо очень токсичны. В последующем эти же исследователи показали, что ДМСО лучше, чем глицерин, защищает митохондрии от повреждающего действия низких температур. Высушивание сублимацией суспензии, замороженной до — 76° в вакууме при различных температурах, приводит к полной инактивации дыхательной цепи и прекращению фосфорилирования,

причем криопротекторы не предотвращают инактивацию высушиванием.

В дальнейшем выяснилось, что сам по себе глицерин вызывает значительные повреждения мембраны митохондрий, а ДМСО оказывается менее токсичным. ДМСО заметно уменьшает выход глутаматдегидрогеназы, вызванный замораживанием, но не предотвращает выхода β-оксибутиратдегидрогеназы, т. е. в отношении сохранения интактности структуры мембраны при замораживании он оказался не более эффективен, чем 0,44 М сахароза. Замораживание суспензии митохондрий до — 50° приводит к полному разобщению дыхания и окислительного фосфорилирования независимо от наличия в среде ДМСО. В то же время этот криопротектор хорошо предохраняет митохондрии печени крысы при замораживании (до — 25°). Наряду с этим отмечается также существенная токсичность ДМСО.

Другие исследователи также указывают на то, что при замораживании срезов печени глицерин и ДМСО в значительной степени предотвращают изменения в структуре митохондрий [287, 288, 368, 506—511, 810]. Фишбейн [289] показал, что ДМСО предохраняет от криоповреждений также и сукцинат-цитохром-С-редуктазный комплекс дыхательной цепи митохондрий.

Полагают, что глицерин и другие криопротекторы сохраняют жизнеспособность клеток лишь потому, что они предохраняют от криолиза митохондрии. Однако Вальтон и соавторы [823] отмечают, что глицерин хотя и защищает митохондрии печени крысы от повреждающего действия замораживания, но сам и ингибирует их дыхательную активность. По мнению этих авторов, ингибирующее действие глицерина обусловлено ионами тяжелых металлов, которые содержатся в нем в виде примесей. ДМСО, как отмечают исследователи, также токсичен для митохондрий, однако обработка его на ионообменнике и включение в среду 1%-ного БСА несколько уменьшает его токсичность. При замораживании митохондрий, суспендированных в изотоническом растворе маннита и сахарозы, содержащем 10% ДМСО и 1% БСА, до температуры жидкого азота и последующем оттаивании, сохранялось 66—90% дыхательного контроля и более 60% после двухмесячного хранения. При хранении митохондрий при температуре — 20° дыхательный контроль быстро падает. При этом митохондрии утрачивают также способность к сокращению в ответ на добавление в среду ионов магния и кальция. Выяснилось, что определенное действие на дыхательную цепь оказывают и субстраты окисления, причем наиболее убедительно это было показано на митохондриях почки кролика [480, 647]. Например, присутствие в суспензии изоцитрата натрия сохраняет 83% дыхательной активности митохондрий.

Таким образом, из данных литературы видно, что глицерин и ДМСО в значительной степени предотвращают повреждения митохондрий, связанные с замораживанием. Большинство исследователей вместе с тем отмечает токсичность обоих криопротекторов, ко-

торая во многом зависит от их концентрации, метаболической активности и способности связываться с биомембранами клеток. Не меньшее значение имеют режимы замораживания при выборе того или иного криопротектора и способ их использования. Подтверждением этого могут служить данные собственных исследований авторов, изучающих влияние такого защитного криопротектора, как глицерин, и сравнительно нового соединения ПЭО-400 на функциональное состояние митохондрий печени крысы. С этой целью после суспендирования митохондрий в среде выделения в суспензию добавляли ПЭО-400 или глицерин до различных конечных концентраций. Измерения дыхательной и фосфорилирующей активности

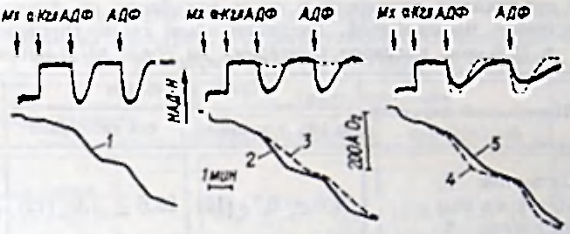


Рис. 85. Влияние криопротекторов на окислительно-восстановительные превращения НАД и дыхание митохондрий (субстрат — α-кетоглутарат) [7, 8, 9]:

1 — контроль; *2* — СВ содержит 10% ПЭО-400, СИ — без ПЭО-400; *3* — СВ и СИ содержат 10%-ный ПЭО-400; *4* — СВ содержит 10% глицерина; СИ — без глицерина; *5* — СВ и СИ содержат 10%-ный глицерин; СВ — среда выделения, СИ — среда инкубации.

митохондрий, а также кинетики окислительно-восстановительных превращений НАД производили в среде инкубации, не содержащей криопротекторов. После обработки митохондрий этими криопротекторами оказалось, что они существенно угнетают активность дыхательной цепи митохондрий в состоянии 3, причем глицерин в значительно большей степени, чем ПЭО-400.

ПЭО-400 при указанной выше схеме опытов не влияет на дыхание митохондрий в метаболическом состоянии 2, в то время как глицерин оказывает стимулирующее действие. Коэффициент фосфорилирования АДФ/О митохондрий под влиянием ПЭО-400 или глицерина в указанных концентрациях существенно не изменяется, но дыхательный контроль по Ларди и Вэлману, а также дыхательный контроль по Чансу претерпевают значительные изменения. Наиболее существенные разрушения дыхательного контроля митохондрий наблюдаются под влиянием глицерина (рис. 85).

Кинетика окислительно-восстановительных превращений НАД митохондрий под влиянием криопротекторов в значительной степени сохраняет свой характер, хотя скорость окисления НАД-Н в ответ на добавление АДФ и восстановление НАД после фосфорилирования несколько замедляется.

Можно предполагать, что в этих опытах наиболее существенной причиной столь сильного влияния глицерина на функциональное

состояние митохондрий печени крысы является значительный перепад осмотических давлений среды выделения с глицерином и среды инкубации. В случае ПЭО-400 перепад осмотических давлений был существенно меньшим, поскольку молекулярный вес глицерина в 4 раза меньше, чем ПЭО-400, а применяемые концентрации этих соединений одинаковы.

Для исключения разности осмотических давлений среды суспендирования и среды инкубации были проведены опыты, в которых среда инкубации содержала такое же количество криопротекторов, как и среда суспендирования (табл. 26).

Таблица 26

Влияние содержания глицерина в среде инкубации на функциональное состояние митохондрий, предварительно суспендированных в 10%-ном растворе глицерина на среде выделения

	Измеряемый параметр	Среда инкубации		p
		с 10% глицерина	без глицерина	
Сукцинат	Состояние 2, ΔO_2/мг/мин	22,6 ± 0,7 (12)	22,6 ± 1,6 (12)	<0,1
	Состояние 3, ΔO_2/мг/мин	77,5 ± 4,0 (12)	46,9 ± 3,7 (12)	<0,001
	ДК по Ларди	3,82 ± 0,27 (12)	2,12 ± 0,14 (12)	<0,001
α-Кетоглутарат	Состояние 2, ΔO_2/мг/мин	14,2 ± 1,2 (7)	11,8 ± 2,1 (6)	<0,1
	Состояние 3, ΔO_2/мг/мин	42,3 ± 2,6 (7)	22,2 ± 2,7 (6)	<0,001
	ДК по Ларди	3,10 ± 0,34 (7)	2,05 ± 0,26 (6)	<0,05

Примечание. Статистическая обработка проведена по Фишеру—Стьюденту. В скобках приведено количество опытов.

Данные табл. 26 свидетельствуют о том, что если митохондрии, суспендированные в 10%-ном растворе глицерина, добавлять в среду инкубации с таким же количеством глицерина, то их функциональная активность оказывается более высокой, чем в том случае, если среда инкубации его не содержит. Очевидно, в последнем случае глицерин в этих концентрациях вызывает у митохондрий осмотический шок. Результаты аналогичных опытов с ПЭО-400 приведены в табл. 27.

Итак, если после суспендирования митохондрий в среде выделения, содержащей 10% ПЭО-400, добавить их в среду инкубации с таким же количеством ПЭО-400, то наступает значительное угнетение их дыхательной активности в состоянии 3 на α-кетоглутарате (табл. 27). На другом субстрате — сукцинате состояние митохондрий не зависит от наличия ПЭО-400 в среде инкубации. Это свидетельствует о том, что действие ПЭО-400 направлено на НАД-звено дыхательной цепи. Подтверждает это заключение и то, что добавление АДФ к митохондриям, находящимся в среде инкубации с 10% ПЭО-400, почти не сопровождается окислением НАД-Н. Возможно, что ПЭО-

400 комплексируется с негемовым железом, входящим в НАД-звено дыхательной цепи. Принципиальная возможность комплексирования ПЭО-400 с ионами двухвалентных металлов была обнаружена нами при измерении спектров ЭПР ионов Cu^{++} и Mn^{++}. Отметим, что угнетение дыхания митохондрий ПЭО-400 носит обратимый характер, поскольку добавление суспензии митохондрий с ПЭО-400 в среду без инкубации сопровождается незначительным угнетением дыхания (табл. 27).

Предметом дальнейших исследований свойств ПЭО-400 и глицерина явилось изучение способности этих веществ защищать ми-

Таблица 27

Влияние содержания ПЭО-400 в среде инкубации на функциональное состояние митохондрий, предварительно суспендированных в 10%-ном растворе ПЭО-400 на среде выделения

Измеряемый параметр		Среда инкубации		P
		с 10%-ным ПЭО-400	без ПЭО-400	
Сукцинат	Состояние 2, ΔO_nA/мг/мин	19,2 ± 2,4 (12)	17,9 ± 1,8 (11)	<0,1
	Состояние 3, ΔO_nA/мг/мин	59,6 ± 3,7 (12)	61,3 ± 2,7 (11)	<0,1
	ДК по Ларди	3,45 ± 0,24 (13)	3,2 ± 0,13 (11)	<0,1
α Кетоглутарат	Состояние 2, ΔO_nA/мг/мин	12,2 ± 1,2 (7)	12,4 ± 2,7 (6)	<0,1
	Состояние 3, ΔO_nA/мг/мин	20,6 ± 1,7 (7)	34,8 ± 4,1 (6)	<0,01
	ДК по Ларди	1,79 ± 0,2 (2)	3,14 ± 0,4 (6)	<0,02

Примечание. Статистическая обработка проведена по Фишеру—Стьюденту. В скобках приведено количество опытов.

тохондрии печени крыс от криоповреждений при различных режимах замораживания. Считают, что режим замораживания, при котором достигается максимальная защита биоструктур тем или иным криопротектором, в значительной степени определяется его проникающей способностью [498, 566, 568]. Так, непроникающие через биологические мембраны криопротекторы оказываются эффективными при быстром замораживании, в то время как проникающие криопротекторы защищают клетки и при медленном замораживании.

В настоящей работе измерение набухания митохондрий печени крысы в 0,3 М растворе ПЭО-400 и в 0,3 М растворе глицерина показало, что ПЭО-400 проникает в митохондрии печени крысы медленнее, чем глицерин (рис. 86). В то же время при медленном замораживании суспензии митохондрий до температуры — 25° с 10%-ным ПЭО-400 он довольно хорошо защищает дыхательную цепь митохондрий от криоповреждений. Особенно четко защитный эффект ПЭО-400 проявляется в отношении окисления митохондриями α-кетоглутарата [54, 55]. Глицерин в противоположность ПЭО-400 не предохраняет митохондрии от криоповреждения при таком замо-

раживании. По-видимому, способность того или иного криопротектора защищать митохондрии и другие мембранные образования от криоповреждений определяется не только его проникающей способностью, но и другими свойствами, например способностью ассоциироваться с мембранами, стабилизируя их структуру [249, 251, 544].

Нами были сделаны попытки сохранить функциональную активность митохондрий на более высоком уровне путем быстрого их замораживания до температуры жидкого азота. При таком режиме замораживания митохондрий защитный эффект ПЭО-400 оказался

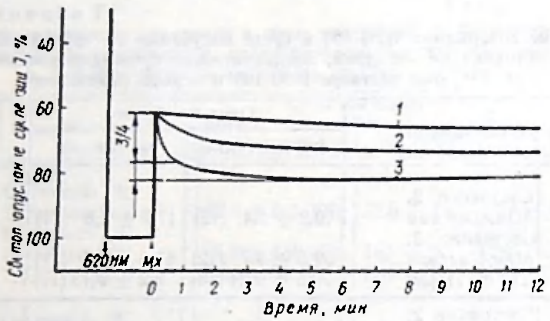


Рис. 86. Набухание митохондрий печени крысы в 0,3 М растворах ПЭО-400 и глицерина [55]:
1 — контроль, 2 — 0,3 М ПЭО-400, 3 — 0,3 М глицерин.

не выше, чем при медленном замораживании до — 25° (рис. 87). Глицерин в отличие от ПЭО-400 при таком замораживании сохраняет функциональное состояние митохондрий на сукцинате на таком же уровне, как и до замораживания. Незначительные, но статистически значимые отклонения от контроля наблюдались лишь при окислении α-кетоглутарата. Подобные результаты были получены при использовании 10%-ного глицерина и при двухэтапном замораживании суспензии митохондрий до — 196°.

Применение 10%-ного ПЭО-400 при двухэтапном режиме замораживания митохондрий до температуры жидкого азота и последующем оттаивании позволило сохранить наиболее высокий уровень их функциональной активности [8, 9]. Лишь при окислении сукцината наблюдалось значительное снижение дыхательного контроля по Ларди и Вэлману, однако этот контроль по Чансу не претерпевал изменений. Кинетика окислительно-восстановительных превращений НАД митохондрий при этом также сохраняла в значительной степени характер кинетики интактных митохондрий.

Абсолютные величины некоторых параметров митохондрий на α-кетоглутарате после двухэтапного замораживания до температуры — 196° (и последующего оттаивания) под защитой 10%-ного ПЭО-400 составляли: дыхательный контроль по Ларди и Вэлма-

ну — 4,39 ± 0,48; по Чансу — 4,73 ± 0,24; АДФ/О — 2,29; дыхание в состоянии 3 — 40,3 ± 3,2 O_2 *нА/мг/мин*. В целом, применение ПЭО-400 при двухэтапном режиме замораживания митохондрий печени крысы до температуры жидкого азота не менее эффективно, чем применение ДМСО при быстром одноэтапном замораживании до такой же температуры [823]. По-видимому, медленное замораживание воды суспензии на первом этапе замораживания способствует постепенному увеличению концентрации ПЭО-400, что способствует более эффективной криозащите митохондрий на следующем быстром этапе замораживания до —196°. Этот метод замораживания и от-

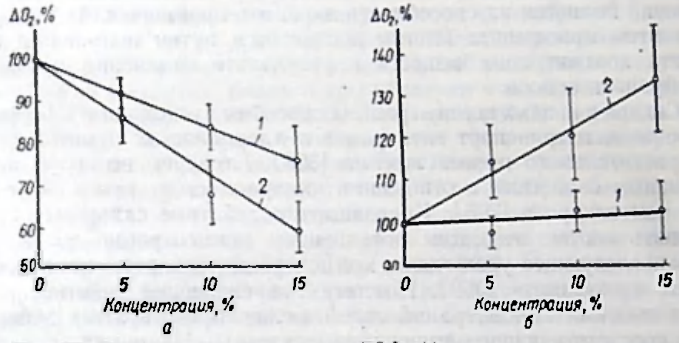


Рис. 67. Влияние криопротекторов ПЭО-400 и глицерина на дыхание митохондрий (среда инкубации криопротекторов не содержала) [55].

Субстрат окисления — сукцинат; *а* — дыхательная активность в состоянии 3; *б* — дыхательная активность в состоянии 2; *1* — влияние ПЭО-400; *2* — влияние глицерина.

таивания суспензии митохондрий может быть применен для продолжительного хранения этих структур при сверхнизких температурах. Возможно, применение ПЭО-400 при двухэтапном замораживании через фазу 1 кривой медленного охлаждения (рис. 80) будет эффективно при низкотемпературном консервировании других биологических объектов.

Таким образом, замораживание вызывает глубокие повреждения механизма трансформации энергии в митохондриях печени крыс. С помощью криопротекторов при оптимальных режимах замораживания — оттаивания удается предотвратить повреждения мембранных структур. Одним из эффективных криопротекторов можно считать ПЭО-400.

Криопротекция мембран растений. Поскольку клетки растений повреждаются главным образом в результате дегидратации, то любые соединения, противодействующие дегидратации, должны обеспечивать криозащиту. Это можно достичь прежде всего путем введения в клетку большого количества какого-либо нейтрального растворимого вещества, которое способствует снижению температуры замерзания внутриклеточной жидкости. В этом случае при любой

температуре будет вымораживаться меньше воды, чем при отсутствии растворенного вещества. Далее резистентность мембран клеток можно непосредственно повысить путем введения стабилизатора не только внутрь структуры, но и на ее поверхность.

Лавлок [493, 494] установил, что защитное действие глицерина является прямым результатом его водосвязывающих свойств в совокупности со способностью проникать в мембраны клеток. Меримен [565] придавал большое значение таким факторам криоповреждения, как перепады осмотического давления, возникающие при повышении концентрации и миграции солей из клетки и в клетку. Поэтому согласно его мнению, основным свойством защитных соединений является их способность изменять проницаемость мембран. При этом криозащита клетки достигается путем понижения градиента концентрации веществ в результате изменения процессов диффузии и осмоса.

Сахара в низких концентрациях способны предохранять фосфорилирование и транспорт электронов в хлоропластах и митохондриях растительного происхождения [358]. Глицерин по своим криозащитным свойствам в отношении хлоропластов менее эффективен, чем сахароза [706]. Криозащитное действие сахарозы можно подавить соответствующим повышением концентрации солей, однако последующее увеличение концентрации сахарозы может обеспечить криозащиту [359]. Поэтому повреждающее действие даже очень высоких концентраций солей можно предотвратить добавлением соответствующего количества сахарозы. Например, для предохранения фосфорилирования хлоропластов при замораживании в среде, содержащей соли, необходима менее чем двойная молярная концентрация сахарозы по сравнению с молярной концентрацией солей. В то же время при глубоком замораживании митохондрий растительного происхождения сахароза не проявляет криозащиты. Так, замораживание суспензии митохондрий зеленых томатов в 0,25 М сахарозе до температуры жидкого азота на 88% инактивирует цепь транспорта электронов, причем низкая скорость дыхания не стимулируется добавлением ни АДФ, ни динитрофенолом [241]. Вместе с тем сахароза является непроникающим внутрь клетки соединением и в то же время весьма эффективна при криозащите мембран хлоропластов — она способствует устранению повреждающего влияния солей. Глицерин хотя и проникает внутрь клетки, его эффективность по сравнению с сахарозой ничтожна в отношении защиты мембранной системы хлоропластов от криоповреждений, тем более что он может в некоторых случаях оказывать токсический эффект [705, 773]. Естественно, возникает вопрос, чем это объясняется, какова природа этого явления. Наблюдения показали, что мембраны хлоропластов под защитой сахарозы можно не только заморозить, но и высушить, после чего хранить при комнатной температуре. При этом способность к синтезу АТФ после дегидратации не теряется [359, 360]. Очевидно, объяснение таких защитных свойств не может быть ограничено только способностью сахарозы связы-

вать воду. Если повреждающим фактором является дегидратация клетки, то сохранение ее активности может быть объяснено также возможностью непосредственного замещения либо стабилизации функциональной воды внутри мембраны этим защитным соединением. Характер такого взаимодействия в системе сахароза — вода — мембрана предусматривает главным образом изменения, происходящие на уровне водородных связей [242, 358, 827, 828, 855].

Если ведущим фактором повреждения является повышение концентрации солей, то необходимо предусмотреть возможность защиты мембраны от воздействия повышенных электростатических полей, возникающих в результате концентрационного градиента. Кроме того, взаимодействие криопротектора с мембраной должно быть обратимым, т. е. должны образовываться временные связи, например, по типу водородных связей. Целый ряд низкомолекулярных веществ (сахароза, белки и др.) образуют с мембранами именно такого рода связи и могут быть легко устранены диализом или их отмывкой. Необходимо отметить и то, что высокие криозащитные свойства низкомолекулярных белков (факторы 1 и 2) растений с молекулярным весом от 10 000 до 20 000 в очень низких концентрациях значительно превышают по своей эффективности другие криоагенты типа сахаров, высокомолекулярных белков, химических криопротекторов и др. [360, 362]. Необходимо отметить, что механизм действия указанных выше криозащитных белков на мембраны клеток очень своеобразен. Считают, что они взаимодействуют не со всей поверхностью мембраны, а лишь с определенными наиболее крючувствительными ее точками [361]. Действительно, расчеты показали, что в концентрации 1 *мг* белковый фактор 1 защищает от денатурации in vitro около 5 *мг* функциональных белков мембран. Если предположить, что фактор 1 действовал в высокоочищенном виде, а белок мембраны имеет молекулярный вес 165 000, то отношение белкового фактора 1 к белку мембраны будет близким к единице [358].

Очень хорошие препараты белкового фактора 1 в 2500 раз эффективнее, чем сахароза (из расчета на 1 *мг* веса агента). Они защищают механизм окислительного фосфорилирования от замораживания, хотя и не предотвращают агрегации мембран. Очень низкая концентрация этих природных соединений, необходимая для криозащиты, является убедительной демонстрацией возможности неколлигативного механизма защиты биоструктур.

Принципиальным для криобиологии является то, что в концентрациях, необходимых для защиты, стехиометрическое отношение белкового фактора 1 к структурному белку мембран близко к единице [358], что наводит на мысль о защите определенных участков мембран. Значительно меньше работ посвящено влиянию других криопротекторов на дыхание и окислительное фосфорилирование (например, ПЭО, ДМСО, ПВП и др.). Судя по некоторым данным, ДМСО предохраняет митохондрии от повреждения замораживанием и при последующем хранении в жидком азоте. Однако хранение при

температуре — 18°, несмотря на наличие ДМСО, приводит к повреждению митохондрий. Причиной этого, по мнению авторов, является усиление некоторых биохимических реакций при такой температуре [324, 361]. Дикинсон [241] предполагает, что вымораживание воды из липопротеинов мембран приводит к взаимодействию их полярных групп, а ДМСО препятствует этому процессу. Таким образом, как видно из указанных работ, механизм трансформации энергии в митохондриях растительного происхождения и хлоропластах также весьма чувствителен к действию низких температур.

Таким образом, анализ литературных и собственных данных по влиянию замораживания на структуру и функциональную активность митохондрий различного происхождения показывает, что указанные органеллы обладают высокой чувствительностью к повреждающему действию этого физического фактора, причем изменения активности дыхательной цепи при изменениях скорости замораживания более выражены, чем изменения ультраструктуры митохондрий. Угнетение активности дыхательной цепи и нарушение механизма окислительного фосфорилирования проявляются при замораживании как клеток или срезов органов, так и суспензий изолированных митохондрий. В литературе почти не встречается работ по изучению влияния различных режимов и скоростей замораживания на эти структуры, а в большинстве случаев скорость замораживания вообще не указывается. Применение криопротекторов, в основном ДМСО и глицерина, позволяет в значительной степени предотвратить повреждения митохондрий, связанные с замораживанием, однако сами по себе эти соединения оказывают существенное влияние на структуру и функции этих органелл. Причины токсичности ДМСО и глицерина в отношении митохондрий в литературе почти не освещены.

Учитывая, что повреждения митохондрий проявляются при замораживании как срезов органов, так и изолированных митохондрий, целесообразно продолжить исследования по изучению влияния замораживания на функциональную активность этих изолированных органелл, чтобы можно было исключить влияние на них лизосомальных ферментов в связи с возможным повреждением лизосом. Состояние митохондрий желательно изучать при различных режимах замораживания и исследовать как сукцинатное, так и НАД-звено дыхательной цепи, дыхательный контроль и окислительное фосфорилирование митохондрий. Влияние ПЭО-400 на функциональную активность митохондрий, насколько нам известно из литературы, не изучено и представляет интерес для характеристики этого сравнительно нового криопротектора. Важно также изучить основные причины токсичности глицерина и ПЭО-400, если таковая проявляется. Не меньший интерес представляет изучение способности ПЭО-400 и глицерина защищать митохондрии от криоповреждений при различных режимах замораживания, чтобы выбрать оптимальный режим для проявления наибольшей эффективности этих криопротекторов.

Глава VII

ПРОБЛЕМЫ ЗАМОРАЖИВАНИЯ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ ХРАНЕНИЕ КРОВИ

Кровь представляет собой сложную систему, состоящую из разнообразных молекулярных компонентов, отличающихся друг от друга своими функциями, составом и стабильностью. Многие компоненты крови, в частности эритроциты, лейкоциты, тромбоциты и свертывающиеся белки, имеют важное терапевтическое значение, они подобны по функции, сложны по природе и неустойчивы при хранении. Исследование структурно-функциональных особенностей крови и ее отдельных компонентов при низких температурах не только имеет общетеоретическое значение, но и позволяет разработать практические методы для их длительного низкотемпературного хранения.

До 1949 г. было проведено сравнительно небольшое число криобиологических исследований в области гематологии. На протяжении 1941—1944 гг. были описаны только первые опыты по замораживанию эритроцитов в жидком воздухе до температуры —190° без защиты и под защитой глюкозы, а также охлаждение их в охлаждающих смесях спирт — твердая углекислота [293, 848]. Уже в этот период было выяснено значение оптимальных скоростей охлаждения для успешного низкотемпературного замораживания эритроцитов, зависимость жизнеспособности клеток от содержания различных растворенных веществ (криопротекторов) и температуры хранения замороженной пробы.

Началом современной эры экспериментальной криобиологии по хранению клеток крови при низких температурах можно считать 1949 г., когда Люйе [515—517] и его сотрудники впервые опубликовали исследования, в которых подчеркивали роль скоростей охлаждения и отогревания для получения максимального количества жизнеспособных эритроцитов при замораживании. Одновременно было выяснено значение динамики кристаллов льда при сверхбыстром охлаждении и отогревании.

Согласно Люйе [512—522], молекулярные деформации структур клетки, обусловленные кристаллизацией жидкости в протоплазме, являются основными факторами, ведущими к разрушению клетки. Он считал, что сверхбыстрое замораживание эритроцитов до стекловидного (аморфного) состояния и последующее хранение их от 0° до —50° безвредно.

После открытия защитного действия глицерина последний был использован в качестве защитного соединения при медленном замораживании и оттаивании эритроцитов [755—758]. В дальнейшем для защиты эритроцитов от повреждающего действия низких температур были использованы различные спирты, сахара, амиды, а также такие низко- и высокополимерные соединения, как ПВП и декстран [181, 492—[499]. В 1959 г. были обнаружены защитные свойства криопротектора нового типа — ДМСО, который хорошо предохранял эритроциты от повреждающего действия низких температур [498]. В результате проведенных исследований в этом отношении для низкотемпературного хранения крови было использовано как относительно медленное замораживание в присутствии глицерина [354, 421] и ДМСО [377—380, 498], так и быстрое — под защитой глюкозы [554—556, 559, 562], лактозы в смеси с глюкозой [783—788], ПВП и других соединений [679—683].

Основное внимание исследователей в этот период было сосредоточено на изучении механизмов разрушения эритроцитов под действием низких температур и выяснении характера действия криопротекторов на эти клетки. В этом отношении было выдвинуто несколько предположений о механизмах, лежащих в основе повреждения эритроцитов при замораживании:

1. Разрушение клеток под влиянием роста кристаллов льда [506—508, 510, 511].

2. Разрушение клеток под влиянием высоких концентраций электролитов по мере кристаллизации воды [492, 493, 499].

3. Повреждение эритроцитов, связанное с действием биологических и физико-химических факторов [681, 682].

4. Влияние скоростей замораживания и криопротекторов на сохранность клеток крови [515, 520, 522].

В этот период было проведено также много исследований по изучению особенностей действия криозащитных соединений на концентрационные перепады солей, торможение роста кристаллов, образование льда и другие физико-химические процессы в клетках в присутствии этих веществ [207, 247—252, 492, 499, 506—511, 556, 559, 562, 586, 587, 626, 689, 690, 755, 759, 856].

Быстрое развитие в последнее время практики переливания крови в большой степени зависит от непрерывно совершенствующихся методов хранения крови или эритроцитов в специальной таре. В связи с этим внимание исследователей было сосредоточено на разработке методов низкотемпературного хранения крови в замороженном состоянии. Основные исследования, проведенные в этом направлении [209, 210, 515, 522], привели к многочисленным лабораторным и клиническим испытаниям условий хранения крови при низких температурах, оценки поведения консервированных холодом и перелитых реципиенту клеток, терапевтической полезности и безопасности подобных трансфузий. Одновременно были предприняты биоинженерные исследования и подготовительные работы для того, чтобы максимально удешевить криогенное оборудование, ис-

пользуемое для замораживания, хранения и отогрева больших объемов крови (500—600 *мл*), необходимой для клинических целей. В настоящее время различают два основных метода низкотемпературного хранения крови; при этом предусматривается использование в каждом отдельном случае криопротекторов различной природы. В случаях медленного замораживания применяются главным образом либо глицерин, либо ДМСО; при быстром — ПВП и сахара. Исследовались также некоторые смешанные методы, в которых использовались смеси различных растворенных защитных веществ в комбинации с быстрым замораживанием.

Особое значение метод глубокого охлаждения имеет для консервирования крови и ее компонентов, поскольку их хранение в жизнеспособном состоянии при низких положительных температурах ограничено одной — тремя неделями, что исключает возможность создания запасов крови и гемопоэтической ткани, потребность в которой может возникнуть в любое время и в значительном количестве. Хранение замороженной крови, по мнению Рув [689, 690], имеет следующие преимущества: 1) наличие постоянных запасов крови разных групп; 2) длительное консервирование крови для идентификации сывороток редких групп в количестве, которое можно хранить в банке крови; 3) возможность немедленно получать из хранилищ кровь редких групп, содержащих антитела против эритроцитов других групп крови, а также эритроциты, свободные от лейкоцитов и плазменных белков для трансфузий сенсибилизированным больным; 4) позволяет вести заготовку крови больного для экстренных аутотрансфузий.

С октября 1965 г. в Японии начали консервировать кровь методом замораживания и применять ее для трансфузий в клинике. До марта 1969 г. было перелито 400 доз замороженной крови 92 хирургическим больным. Клинический опыт применения замороженной крови позволил установить следующие критерии для безопасности применения трансфузий замороженной крови: 1) концентрированные эритроциты должны использоваться для замораживания тотчас после отделения плазмы и не позднее чем через 7 дней после взятия крови; 2) концентрация свободного гемоглобина в надстое ресуспендированных эритроцитов не должна превышать 100 *мг*%; 3) концентрация гемоглобина в надстое не должна увеличиваться после 30-минутной инкубации при температуре +37°.

Для успешного решения проблемы хранения крови необходимо учитывать несколько моментов и прежде всего температуру хранения. Этот важный фактор был широко исследован при замораживании эритроцитов в присутствии глицерина. При концентрации глицерина в среде порядка 30—50% можно получить более 80% жизнеспособных клеток после 2—3-летнего их хранения при температуре —20° [207, 208, 395, 396]. Хранение эритроцитов при температуре —45° в концентрированном глицерине позволяет на протяжении 18 месяцев получать жизнеспособные клетки [396, 710—713], а хранение при —80—120° — от 4 до 5 лет [354, 751—754]. При

быстром замораживании крови, защищенной небольшими концентрациями сахаров, требуется более низкая температура хранения, чем для крови, консервируемой с глицерином. Например, полный гемолиз крови, замороженной с 0,15 М раствором лактозы, наступает уже через неделю с момента хранения при температуре —27°, через 20 дней — при —58° и через год — при —78°; если температура хранения достигает —100°, то кровь хранится довольно стабильно [689, 788]. Вместе с тем имеются данные о том, что хранение крови в лактозо-глюкозной смеси при температуре —70° дает хорошие результаты лишь до трех недель; по истечении этого срока жизнеспособность уменьшается менее чем на 70%. Выдерживание крови при —93° позволяет сохранять более высокую жизнеспособность ее на протяжении 6,5 месяца. Замороженная кровь до —196° изменяет свои свойства после двухгодичного хранения [382, 383]. Быстро замороженная кровь с ПВП способна сохранять свои функции после 1,5-годичного хранения при температуре —170°. Если кровь хранить при —79° на протяжении 147 дней с полиоксиэтиленом, то по истечении этого срока жизнеспособность ее снижается с 83 до 41%.

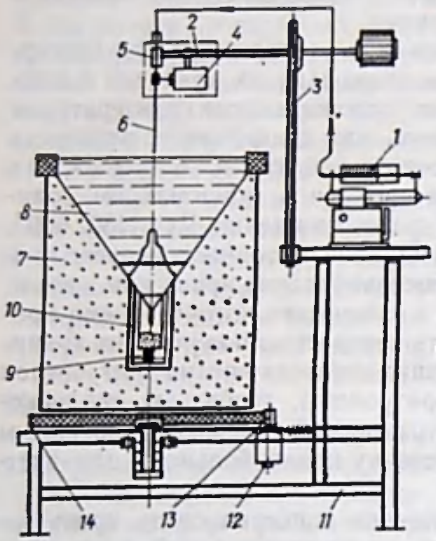


Рис. 88. Схема экспериментальной установки для замораживания эритроцитов:

1 — дозирующий аппарат; *2* — электромагнитный распылитель; *3* — штатив; *4* — соленоид; *5* — упругий элемент; *6* — игла; *7* — контейнер; *8* — воронка; *9* — держатель; *10* — сборник; *11* — рама; *12* — электродвигатель; *13* — фрикционный валик; *14* — текстолитовый диск.

Были также проведены эксперименты по разработке методов хранения крови в жидком состоянии при субнулевых температурах. Для этого были применены высокие давления, которые позволяют сохранять среду в жидком состоянии при субнулевых температурах. Вначале был разработан метод хранения крови в жидком состоянии при —15° и давлении 9000 *кг/см*^{2}. В дальнейшем выяснилось, что кровь, подвергнутая гидравлическому давлению порядка 680—1800 *атм*, быстро гемолизируется как при +4°, так и при +8° соответственно до 50—75%. Заметное разрушение эритроцитов наблюдается при давлении 2600 *атм* и температуре —18°. Однако было отмечено, что гемолиз крови при —8° без давления происходит интенсивнее, чем при давлении. Добавление в консервирующую среду этанола в концентрации 21% без давления позволяет сохранять кровь в течение 4 месяцев при —12° с таким же уровнем гемолиза, как и при + 4° [230, 399, 482]. Эритроциты удается также со-

хранять при температуре —20° в 30%-ном растворе метанола — гемолиз через 72 *ч* был незначительным.

Поскольку красные и белые клетки крови, а также тромбоциты отличаются не только по своему строению, но и по присущим им специфическим функциям и различной устойчивости к замораживанию, то для каждого вида клеток крови приходится подбирать оптимальные условия замораживания и наиболее эффективные защитные среды.

Так, для консервирования эритроцитов крови человека [18, 19] у нас в стране разработано и применяется в основном два метода замораживания:

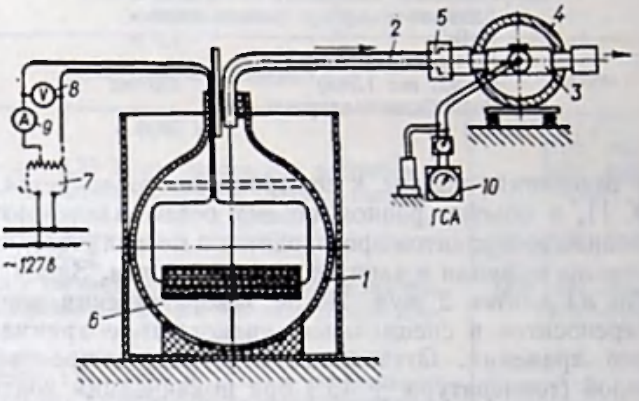


Рис. 89. Принципиальная схема установки для рентгенографического исследования замороженной крови:

1 — сосуд Дьюара; *2* — трубка Дьюара; *3* — камера замораживания; *4* — рентгеновская камера; *5* — соединительная трубка; *6* — электрогрелка; *7* — ЛАТР; *8* — вольтметр; *9* — амперметр; *10* — гальванометр ГСА.

1. Сверхбыстрое охлаждение в течение 1—2 *мин* до —196°. Кровь хранится в жидком азоте, не требует применения высоких концентраций криопротекторных веществ. Для замораживания и хранения крови таким способом применяется специальное криогенное оборудование и контейнеры (рис. 88, 89, см. также рис. 138—146).

2. Медленное охлаждение крови в течение нескольких часов при умеренно низких температурах (от — 60 до — 80°). При этом применяется большая концентрация криопротекторных агентов (30—50%).

Эти методы позволяют сохранить неповрежденными до 85—97% замороженных эритроцитов.

Хранение крови с глицерином. В Центральном институте гематологии и переливания крови группой сотрудников разработаны методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов [15, 17, 19] с применением в качестве криопротекторов

ЦОЛИПК 11_3 и ЦОЛИПК 11_4 (см. прописи 1 и 2).

1. Стабилизирующий раствор ЦОЛИПК 11_4	
Маннит	40,0 *г*
ЭДТА (натриевая соль)	3,0 »
или NaCl	7,0 »
Глицерин (высшего сорта, уд. вес 1,248)	300 *мл*
Вода бидистиллированная	до 1000 »
2. Стабилизирующий раствор ЦОЛИПК 11_3	
Кислый цитрат натрия	158,0 *г*
Лактоза	150,0 »
Глюкоза	100,0 »
NaBr	2,0 »
Глицерин (высшего сорта, уд. вес 1,248)	100 *мл*
Вода бидистиллированная	до 1000 »

После отделения плазмы к эритроцитам добавляется раствор ЦОЛИПК 11_4 в объеме, равном объему оставшихся эритроцитов. Замораживание эритроцитов производится в металлических контейнерах путем погружения в ванну с жидким азотом. Замораживание дозы в 250 *мл* длится 2 *мин*. После замораживания контейнер с кровью переносится в специальное жидкоазотное хранилище для длительного хранения. Оттаивание эритроцитов производится в ванне с водой (температура + 45°) при покачивании контейнера в течение 25 *сек*. Этот метод внедрен в практику консервирования после выяснения того, что небольшие объемы крови, смешанные с таким же количеством 30%-ного глицерина, почти не подвергаются гемолизу в экспериментальных условиях после замораживания при температуре — 70°.

При исследовании включения P^{32} в эритроциты было установлено, что если после размораживания отмыть глицерин путем диализа и повторно поместить клетки в плазменный раствор, то можно сохранить 79—90% эритроцитов. В дальнейшем эти исследования проводились на эритроцитах человека; были подобраны оптимальные концентрации глицерина и солей, методы удаления глицерина из эритроцитов после оттаивания, разработаны температуры хранения, а также тесты жизнеспособности, биохимических свойств и клинического применения обогащенной глицерином крови. В процессе этих исследований возникла трудноразрешимая проблема, связанная с добавлением и особенно отмывкой глицерина. Для того чтобы достичь внутри клетки концентрации глицерина выше 15—30%, его надо добавлять либо очень медленно и равномерно, либо постепенно небольшими порциями во избежание осмотических явлений. После отогрева крови внутриклеточный глицерин необходимо удалить еще до того, как клетки будут погружены в какой-либо изотоничный раствор, например раствор плазмы. В противном случае

наступает осмотический гемолиз. Для удаления внутриклеточного глицерина использовались всевозможные способы (табл. 28).

В первоначальных экспериментах с замораживанием эритроцитов использовали, как правило, 15%-ный глицерин. Охлаждение эритроцитов до температуры — 79° и последующее удаление 15% глицерина методом диализа после отогрева клеток давало возможность полностью сохранить их агглютинирующие свойства после 11-дневного хранения при — 4°. После переливания такой крови через 24 *ч* сохранялось жизнеспособных около 90% клеток при 86%

Таблица 28

Способы отмывки глицерина после отогрева замороженных эритроцитов [252]

Способ удаления глицерина	Автор
Диализ	[750, 751]
Разбавление 0,33 М лимоннокислым раствором	[492, 493]
Разбавление комбинированной смесью, содержащей 50%-ную глюкозу и соли NaCl	[752]
Непрерывная промывка в центрифуге с продольной траверзой	[206, 207]
Различные варианты отмывки с помощью центрифуг. Создание приборов для обогащения крови глицерином и его отмывки	[420, 421, 606, 607, 815—819]
Фракционирование крови, консервированной под защитой глицерина и PDA в специальных криогенных приборах (обогащение глицерином 500—600 *мл* крови в течение 40—45 *сек* и деглицеринизация клеточной взвеси через 90—120 *мин*)	[420, 421]
Отмывание с применением центрифугирования	[14—19]
Отмывание эритроцитов путем их ускоренной седиментации без центрифугирования	[17—19]

в контроле. Однако через 60 дней эти показатели снижались до 40% в опыте и 43% в контроле [576, 577, 856]. В дальнейшем было выяснено, что более высокие концентрации глицерина (30%) способствуют лучшему сохранению жизнеспособности после хранения крови при —79°. Причем глицерино-лимоннокислые смеси оказывают лучшее воздействие на восстановительные свойства эритроцитов, чем глицерино-солевые [206—211]. Однако выяснилось, что смеси, содержащие более чем 50%-ную концентрацию глицерина, вредно влияют на метаболизм эритроцитов и поэтому в дальнейшем не применялись [185, 186, 395, 396, 420, 421, 815—819].

Для оценки жизнеспособности эритроцитов в зависимости от времени и температуры хранения были проведены разнообразные эксперименты, в которых использовались различные исходные условия. Эти сравнительные данные представлены в табл. 29.

Как видно из данных табл. 29, температура хранения порядка — 20° дает сравнительно худшие результаты, чем выдержива-

Жизнеспособность эритроцитов, консервиров

Температура замораживания, °С	Криопротектор	Вре				
		24 ч	5 дней	1 месяц	3 месяца	4 месяца
—79	15%-ный глицерин	90	—	—	—	—
—15	То же	82	—	50	—	—
—20	30%-ный глицерино-лимоннокислый буферный раствор	92	90	92	—	70
—79	30%-ный глицерин	90	—	—	—	—
—45	То же	96	—	—	—	—
—20	» »	92	—	—	—	—
—80 —120	15%-ный глицерин	92	—	—	—	—
—80	50%-ный глицерин	84—95	—	—	—	—
—45	47%-ный глицерин	85	—	—	79	—
—20	52%-ный глицерин	93	—	—	20	—
—196	45%-ный глицерин	—	—	—	—	—
—85	ПВП, мол. вес 12 600 и 25 000	— 80—93	— —	— —	— —	— —
—196	ПВП, глюкоза, альбумин	—	—	—	—	—

ние эритроцитов при —79 и —120° в 30—50%-ной кислой глицерино-лимонно-буферной смеси.

Необходимо отметить, что к 1964 г. лишь в одном штате США (Челси) было законсервировано свыше 3000 *л* крови, которая хранилась в глицерине при температуре — 80—120° от 1 месяца до 5 лет [769]. Широкое использование в клинике такой консервированной крови дало вполне удовлетворительные результаты [606, 607, 792, 856].

Сравнительно недавно были описаны методы быстрого замораживания эритроцитов при добавлении небольшого количества глицерина. Оказалось, что если кровь замораживать в тефлоновой таре в присутствии 14% глицерина со скоростью 145° в минуту, то можно получить через 24 *ч* 86—95% жизнеспособных клеток. Этот метод выгодно отличается от других тем, что небольшие концентрации глицерина позволяют облегчить и сократить процесс деглицеринизации замороженной смеси.

Если кровь с раствором сахарозы поместить в контейнеры диаметром 14 *мм* и в 2,5 раза увеличить коэффициент теплопередачи поверхности (*кал/сек · см*^{2}), то даже без дополнительного встряхивания можно добиться восстановления функции эритроцитов до 47—81%. Встряхивание в момент отогревания может восстановить функцию эритроцитов, находящихся в контейнерах диаметром 17 *мм*, в том случае, если консервируемые клетки будут насыщены растворами криофилактика на 50%. Было также показано, что ус-

Таблица 29

ных в присутствии глицерина

хранения						Автор
6 месяцев	9 месяцев	1 год	1,5 года	2 года	Свыше 3 лет	
—	70	—	—	—	—	[576, 577]
—	—	—	—	—	—	[207]
60	—	40	—	—	10	[752]
—	—	—	—	70—90	—	[209]
—	—	—	85	—	—	[210]
—	—	58	—	45	—	[710—713, 395, 396]
—	—	—	84—90	—	—	[420, 816]
—	—	—	—	—	81	[819, 824a]
—	—	—	—	—	—	[710—713]
—	—	—	—	—	—	[395, 396]
—	—	—	—	—	90	[818, 819]
—	—	—	—	96 98	—	[17—19]
—	—	—	—	—	—	[17—19]
—	—	—	—	—	93	[52, 53]

ловия теплопередачи с поверхности для оптимального восстановления эритроцитов меняются с изменением используемого защитного растворенного вещества. Например, для оптимального восстановления крови с маннитом или глюкозой требовалось более быстрое охлаждение, чем для крови с ПВП. Раствор 5%-ного глицерина обнаруживает эффективное защитное действие при умеренных скоростях охлаждения и замораживании до —50°, однако оказывается малоэффективным при более высоких и низких скоростях охлаждения, например, соответственно при — 130 и — 20°. Раствор 30%-ного глицерина является эффективным только при небольших скоростях охлаждения, при больших — наступает почти 100%-ный гемолиз [222, 223, 247, 251, 377—379].

Изучение восстановления функции эритроцитов при замораживании под защитой ПВП в зависимости от их исходного морфологического состояния, соотношения поверхность/объем и коэффициента теплопередачи с поверхности контейнера, а также встряхивания показало, что максимальная защита достигается при значительно меньших скоростях охлаждения, чем те, которые являются оптимальными для крови, консервируемой в присутствии различных сахаров.

Хранение крови под защитой ДМСО. Согласно концепции Лавлока [495, 497, 499], эффективные криопротекторы, используемые при низкотемпературной консервации эритроцитов или других клеток, должны обладать, по крайней мере, следующими свойствами:

а) сравнительно низким молекулярным весом; б) хорошей растворимостью в водных растворах; в) способностью быстро проникать как внутрь клетки, так и быстро диффундировать из нее; г) не быть токсичными. Такие свойства во многом присущи ДМСО с молекулярным весом 78, который был предложен в качестве защитного агента для замораживания крови [498, 499]. При медленном замораживании 500—600 *мл* крови в полихлорвиниловых мешках до —85 или —75° под защитой 8,6 М ДМСО, растворенного в 8—10%-ном водном растворе сахарозы, может быть получено 82% жизнеспособных клеток, если отогрев производить в водяной бане при + 40° и одновременной отмывкой ДМСО до концентрации в среде 1,5%.

Таблица 30

Различные криопротекторы, используемые при консервации крови

Природа криопротектора	Автор
10—30%-ная глюкоза	[848] [293]
Спиртово-углеводные смеси	[14, 15]
Глицерин в смеси с арабинозой	[206]
Гликоли, сахара, амины	[249, 495]
Различные полимерные соединения	[181]
Полимеры окиси этилена	[106, 107]

Были также разработаны методы консервирования крови с использованием ДМСО, глицерина и пропиленгликоля. Кровь, консервированная под защитой этих криопротекторов, была перелита без всяких осложнений около 200 пациентам [377—379]. ДМСО удаляют из эритроцитов путем его отмывки с помощью центрифуг. Для этого взвесь эритроцитов разбавляют раствором неэлектролита так, чтобы концентрация электролитов в среде была ниже 0,02 М и pH колебался между 5,2 и 6,1. При этом происходит обратимое склеивание эритроцитов, которые быстро выпадают в осадок. Надосадочную жидкость после центрифугирования при этом можно легко декантировать из сосуда. Повышение концентрации электролитов либо увеличение pH приводит к повторному взвешиванию клеток в растворе.

Хранение крови в присутствии различных криопротекторов низкомолекулярного веса. В первоначальных экспериментальных исследованиях для консервирования крови использовались главным образом сахара в сочетании с умеренно быстрым охлаждением в металлических или стеклянных контейнерах с помощью различных охлаждающих смесей (табл. 30).

При использовании этих защитных сред выживаемость клеток после 24 *ч* замораживания обычно составляла около 85%. В дальнейшем было установлено, что можно получить хорошие результаты

замораживания крови с помощью сверхвысоких скоростей охлаждения и отогрева (около 1000° в секунду). Для достижения таких скоростей и обеспечения быстрой теплоотдачи при замораживании использовали небольшие пробы крови, которые разбрызгивали в виде капель в смеси с 6%-ной глюкозой на жидкий азот, а в момент отогрева помещали в плазменно-солевые растворы. Было также показано, что эффективной криозащитой обладают такие сахара, как 5—10%-ные растворы лактозы, сахарозы, мальтозы, а также некоторые полимеры и другие растворенные вещества [15, 312, 313, 382, 383, 681, 682].

Согласно данным по сверхбыстрому охлаждению крови, ее можно замораживать таким способом даже без криозащитных соединений, поскольку этот метод после отогрева дает до 72—85% жизнеспособных клеток [515, 516, 553, 554].

Замороженные таким образом клетки крови оказались вполне эффективными при испытании их в клинических условиях, что было доказано в опытах с мечеными Cr^{51} эритроцитами. Для широкого внедрения этого метода в практику была сделана попытка разработать специальную аппаратуру для асептической одновременной обработки 500—600 *мл* крови путем капельного замораживания. Однако эти вопросы в настоящее время окончательно не решены, поскольку еще мало совершенной криогенной аппаратуры, а также не разработаны способы ее стерилизации. Поэтому использование закрытых металлических контейнеров для низкотемпературного консервирования более практично, чем капельное замораживание в аппаратах. Действительно, взвесь охлаждаемого тонкого слоя эритроцитов хорошо восстанавливалась (до 90—95%) под защитой сахарозы в металлическом контейнере [783—789], если снижение температуры от —3 до —40° происходило менее чем за 10 *сек*, что достигалось постоянным встряхиванием суспензии.

При изучении эффекта защитного действия различных низкомолекулярных соединений было установлено, что оптимальными дозировками являются 0,2 М лактоза и глюкоза. Лучше всего использовать смесь этих веществ, поскольку осмотическая нестабильность обработанных глюкозой эритроцитов уменьшается при добавлении в среду лактозы. При быстром замораживании порций крови объемом до 75 *мл* эти криозащитные вещества могут обеспечить регенерацию эритроцитов до 94%, а после их переливания человеку через сутки жизнеспособными оказывается 88% клеток. Хранение крови, замороженной таким способом при температуре —93°, позволяет на протяжении более полугода получать почти полностью жизнеспособные клетки. Хранить их при —70 или —58° нецелесообразно, поскольку при этих температурах разрушаются эритроциты [788, 789].

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что регенерация эритроцитов в алюминиевой или другой таре и их выживание после переливания в клинических условиях зависит от следующих причин: а) концентрации и типа защитного сахара либо другого

криопротектора; б) скорости охлаждения и отогревания; в) геометрии контейнера; г) интенсивности встряхивания при охлаждении и отогревании. Классические исследования, проведенные в этом направлении, показали, что быстрое замораживание слоев крови от нескольких миллиметров до 40 *мм* в алюминиевых контейнерах под защитой 10—15%-ной лактозо-глюкозной смеси дает максимальное восстановление функции эритроцитов (до 90—95%) и сохраняет эти свойства на протяжении суток после переливания [107, 679—683]. При этом необходимо постоянно встряхивать взвесь как во время замораживания, так и в период быстрого ее отогрева. Такая кровь обычно переливается пациентам без удаления защитных сахаров и образующихся продуктов гемолиза. Однако некоторые исследования действия консервируемой таким образом крови на собаках позволили обнаружить токсические эффекты, обусловленные внутривенным введением концентрированных растворов лактозы и глюкозы. Поэтому практическое использование такой крови сейчас противопоказано [633].

Хранение крови под защитой различных полимерных соединений. Было отмечено, что некоторые высокополимерные соединения, хорошо растворимые в воде, оказывают защитное действие на клетки крови. В этом отношении прежде всего было изучено действие ПВП и декстрана [181, 311]. Затем было описано криозащитное действие других полимеров типа этиленпропиленгликолей, полиоксиэтилена, а также сывороточного альбумина [774]. Установлено, что для осуществления оптимальной криозащиты при замораживании — оттаивании требуются примерно 30%-ные растворы полимерных соединений (процентное соотношение веса и объема). Однако расчеты показали, что на самом деле требуются значительно меньшие концентрации полимерных криопротекторов. Например, при их общей концентрации 7% и быстром замораживании крови можно получить максимальную защиту [248—252, 679—683]. Замораживание крови в стеклянных контейнерах под защитой 40%-ного полиоксиэтилена с молекулярным весом 635, как и быстрое охлаждение в алюминиевых контейнерах до —196° в присутствии 7%-ного ПВП, дает примерно одинаковые результаты по сохранению жизнеспособных клеток крови. При этом можно получать до 83% функционально активных эритроцитов после их суточного хранения [750—754]. С помощью ПВП с молекулярным весом 2500—40 000 при общей концентрации его в плазме 10—14% были получены хорошие результаты при замораживании довольно больших объемов крови (500—600 *мл*). Замораживание обычно проводят в ребристых алюминиевых контейнерах объемом 500—600 *мл*, которые позволяют в условиях постоянного встряхивания получить охлаждение порядка — 10° в секунду или более. Оттаивание в ванне с температурой +37—45° также должно сопровождаться механическим встряхиванием. При этом удается сохранить 97% клеток в жизнеспособном состоянии после их размораживания и 80—92% после переливания.

Благодаря проведению обширных исследований в гематологических центрах, занимающихся разработкой этой проблемы в США и Северной Европе, установлено, что кровь, консервируемую под защитой ПВП, можно непосредственно переливать больным, а если есть необходимость удаления ПВП, то это легко достигается простым фракционированием, поскольку метод элиминации ПВП со среды не сопровождается осмотическими нарушениями. Однако метод ограничен тем, что не позволяет очень длительно хранить кровь, особенно при использовании ПВП высокого молекулярного веса [314, 633, 687, 717, 789, 804, 832, 864].

Использование ПВП для замораживания крови [16—19, 44, 51—53] либо ПЭО [107] по сравнению с глицерином имеет, как видно, то преимущество, что позволяет переливать отогретые эритроциты без их предварительного отмывания и применения для этой цели сложной аппаратуры. Это делает целесообразным хранение в замороженном состоянии не только эритроцитарной массы, но и цельной крови для массовых трансфузий, поскольку переливание можно производить сразу же после оттаивания. Используемые криозащитные растворы с ПВП (мол. вес 12 600 и 25 000) и соответствующие режимы замораживания позволяют получать после оттаивания около 94—96% жизнеспособных клеток в цельной крови и 96—98% — в эритроцитарной массе. Создание низкотемпературного банка крови редких групп [99, 100], консервируемых под защитой полимерных соединений, дает возможность всегда иметь такую кровь, которая необходима для выявления антител и стандартизации сывороток, а также накапливать в большом количестве кровь редко встречающихся групп для переливания сенсибилизированным больным.

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ, ЛИМФОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ

Замораживание лейкоцитов. Перспективность замораживания ядросодержащих клеток крови с помощью глицерина была показана в опытах по оживлению мышей, облученных летальными дозами рентгеновских лучей, которым внутривенно были введены клетки селезенки, консервированные при температуре — 80° и хранящиеся в течение трех месяцев [139]. В дальнейшем методы консервации с использованием глицерина и в последнее время ДМСО при использовании соответствующих скоростей охлаждения (от 1—2 до 25° в минуту и более) находят все большее применение для низкотемпературного хранения ядросодержащих клеток крови. Высокая концентрация глицерина (50%), используемая при некоторых методах хранения эритроцитов, нецелесообразна в случае консервации ядросодержащих клеток. Для этих клеток оптимальными концентрациями являются 5—15%-ные растворы. Интерес к низкотемпературному сохранению таких ядросодержащих клеток, как лейкоциты, возник в результате изучения проблемы терапевтического лечения лучевой болезни на основе использования замороженных клеток

костного мозга. Вначале было предложено консервировать лейкоциты простым замораживанием в 15%-ном растворе глицерина, поскольку такой метод обеспечивал сохранность иммунологических свойств клеток и способность их к размножению после пересадки, что было доказано в опытах с применением Fe^{59}. В дальнейшем для этих целей был использован 10%-ный или 15%-ный раствор ДМСО и замораживание до —196°. После отогрева лейкоциты вводились облученным морским свинкам либо собакам, благодаря чему некоторые из них прожили более длительное время, чем контрольные животные [316, 208—210, 627, 759].

Консервированные путем быстрого замораживания (300—400° в минуту) под защитой 15%-ного ДМСО и глицерина клетки селезенки либо лейкоциты, очевидно, полностью сохраняют свои структурно-функциональные и иммунологические свойства, что было доказано морфологическими (микроскопическими) и биохимическими (биосинтез белков) методами, а также их способностью образовывать антитела и рост колоний в селезенке. Сохранность антигенных свойств этих клеток была также выявлена в опытах с агглютинацией сыворотки крови человека, содержащей лейкоагглютинины [222, 223]. Вместе с тем описаны опыты, в которых лейкоциты замораживали медленно до —80° под защитой 10—15%-ного раствора глицерина либо ДМСО и также получили хорошие результаты, особенно в плане сохранения их иммунологических свойств и способности к фагоцитозу. Консервированные низкими температурами лейкоциты оказались эффективными при лечении, например, лейкемий [300]. Таким образом, разработка методов длительного хранения лейкоцитов является актуальной проблемой, имеющей большое практическое значение.

Лейкоциты, предназначенные для низкотемпературного охлаждения, обычно выделяются из цельной крови с применением коллоидного осадителя [56]. Кровь от донора берется в пластикатный мешок или стеклянный флакон, содержащий раствор следующего состава:

Глюкоза	3,0 *г*
Кислый цитрат натрия	2,0 »
Желатин 10%-ный (для внутривенного введения) или 2,5%-ный поливиниловый спирт	50 *мл*
	40 »
Левомицетин	0,015 *г*
Вода бидистиллированная	150 *мл*
Отношение раствор: кровь равно $\frac{1}{3}$	—

Раствор стерилизуется в автоклаве при 1,2 *атм* в течение 30 *мин* и хранится в завальцованных флаконах до двух месяцев. Обычно применяемая в клинической практике лейкоцитарная масса, представляющая собой, как известно, лейкоцитный слой, собранный из крови, непригодна для замораживания.

Лейкоциты перед замораживанием смешиваются с одним из специальных растворов (криоконсервантом), ограждающим их от повреждающего действия холода. В качестве криопротекторов применяются ДМСО, глицерин или ПВП, которые обладают способностью прочно связывать воду и предохраняют клетки от разрушения в процессе охлаждения. В специальных алюминиевых контейнерах охлаждение ведется в два этапа (до —13, —15, —18° со скоростью 1° в минуту и до — 196° по 10° в минуту). Оттаивание клеток осуществляется на водяной бане при температуре +40°.

Консервирование лимфоцитов. За последние годы проводятся интенсивные исследования по разработке методов низкотемпературного консервирования эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. Наряду с этим очень мало внимания уделяется вопросу консервирования одной из важных в биологическом отношении фракции крови — лимфоцитарной.

Известно, что лимфоциты играют большую роль в становлении иммунологической реактивности организма, сохраняют иммунологическую «память», участвуют в процессах отторжения трансплантата и реакциях гиперчувствительности замедленного типа при аллергиях. В антигенном отношении лимфоциты как клетки, содержащие широкий спектр основных трансплантационных антигенов локуса HL-A, могут использоваться при проведении антигенного типирования пар донор — реципиент.

Таким образом, показания к использованию лимфоцитов в практике расширяются: типирование пар донор — реципиент, лечение иммунодепрессий различного генеза, лечение больных с гипоплазией кроветворения, вызванной воздействием лучевой энергии и т. д. Все это требует создания запаса лимфоидной ткани различного антигенного спектра с высокой биологической активностью.

При разработке метода низкотемпературной консервации лимфоцитов до настоящего времени в качестве криопротектора чаще всего использовался ДМСО. Замораживание производилось с предварительным охлаждением взвеси клеток до —4°, а затем эту взвесь охлаждали в два этапа: на первом этапе — от —4 до —50° со скоростью 1° в минуту и на втором этапе — быстрое погружение в жидкий азот и хранение лимфоконцентрата при температуре — 196°. При этом консервированные лимфоциты сохраняли жизнеспособность и биологическую полноценность в течение 50 дней. Однако такой способ консервации лимфоцитов имеет ряд существенных недостатков: он не обеспечивает высокой жизнеспособности лимфоцитов после замораживания; требует дополнительной операции — удаления ДМСО из взвеси клеток перед ее применением из-за токсичности криопротектора; кроме того, при этом способе возникает необходимость в дополнительном охлаждении лимфоцитов до —4° (для предотвращения экзотермической реакции ДМСО).

В качестве криопротектора также применяются этиленгликоль [34, 73, 81—87, 106—108, 210, 211] и полиэтиленоксид. В отличие от ранее применявшихся криофилактиков полиэтиленоксид — это

Лимфоконцентрат +5%-ный ПЭО-400 (замораживание 5,5 *мин*)				Лимфоконцентрат +7%-ный	
Содержание лимфоцитов, %		Жизнеспособность лимфоцитов, %		Содержание лимфоцитов, %	
до замораживания	после оттаивания	до замораживания	после оттаивания	до замораживания	после оттаивания
95,5±3,4	91,6±2,7	99,0±0,6	95,6±4,1	96,4±4,2	90,5±0,8

биологически инертное вещество, не требующее отмывания. Замораживание лимфоцитов в присутствии этого соединения проводят в два этапа: на первом этапе — от +20 до —9° охлаждают со скоростью 4—5° в минуту, а затем опускают в жидкий азот и со скоростью 300—400° в минуту на втором этапе замораживают до температуры —196°. Такое замораживание позволяет снизить концентрацию криопротектора до 5—7% при сохранении максимального числа клеточных элементов. Оттаивание лимфоцитов производится при температуре +40° на водяной бане.

При сравнении жизнеспособности клеток лимфоконцентрата до замораживания и после оттаивания в присутствии 5%-ной и 7%-ной концентрации ПЭО-400, а также в присутствии 11%-ной концентрации ДМСО (табл. 31) оказалось, что при консервировании лимфоцитов по предложенной программе в 5%-ной и 7%-ной концентрациях ПЭО-400 обеспечивается почти одинаково высокий процент жизнеспособных клеток (не менее 95% исходного). ДМСО в 11%-ной концентрации сохраняет жизнеспособными лишь около 80% лимфоцитов. Таким образом, ПЭО-400 как в 5%-ной, так и в 7%-ной концентрации оказывает хороший защитный эффект при двухэтапном замораживании лимфоцитов. Однако лучшие данные получены при замораживании ПЭО-400 в 7%-ной концентрации (до замораживания — 98,4 ± 0,6% жизнеспособных клеток и после оттаивания — 96,8 ± 1,8%). Кроме того, предложенный нами метод низкотемпературной консервации лимфоцитов позволяет ускорить, а следовательно, и упростить этот процесс — продолжительность замораживания лимфоконцентрата по нашей методике длится 5,8 *мин*, а по методу Олбрайта и соавторов [115] — 47 *мин* (табл. 31,32).

Анализ культивирования клеток in vitro проводился на третьи и пятые сутки. О трансформирующей активности лимфоцитов судили по процентному соотношению следующих клеточных форм: малые и большие лимфоциты, лимфобласты и макрофаги. Трансформирующие свойства реконсервированных лимфоцитов отличались от интактных как по количественному соотношению клеточных форм, так и по скорости течения процессов трансформации.

Таблица 31

раживании до —196° под защитой ПЭО-400 [86, 87]

ПЭО-400 (замораживание 5,8 *мин*)		Лимфоконцентрат +11%-ный ДМСО (замораживание 17 *мин*)			
Жизнеспособность лимфоцитов, %		Содержание лимфоцитов, %		Жизнеспособность лимфоцитов, %	
до замораживания	после оттаивания	до замораживания	после оттаивания	до замораживания	после оттаивания
98,4 ± 0,6	96,8 ± 1,8	98,5 ± 2,0	74,5 ± 0,9	99,0 ± 1,2	80,0 ± 1,3

Натретьи сутки количество малых лимфоцитов в культуре интактных лейкоцитов достоверно возрастало по сравнению с их содержанием в культуре реконсервированных лейкоцитов. Морфологически эти клетки в обоих случаях не отличались. Одновременно появлялись лимфоциты больших размеров, с более рыхлой структурой хро-

Таблица 32

Результаты опытов по изучению трансформирующей способности реконсервированного лимфоконцентрата (в %) [86]

Характер культуры ткани	Лимфоциты	Трансформированные лимфоциты	Лимфобласты	Макрофаги
Культура интактных лейкоцитов	3-и сутки культивирования			
	48,0 ± 4,6	23,2 ± 4,3	24,4 ± 4,6	4,1 ± 0,8
	5-е сутки культивирования			
	41,1 ± 7,5	14,0 ± 3,1	37,0 ± 5,6	7,8 ± 4,7
Культура реконсервированных лейкоцитов	3-и сутки культивирования			
	30,0 ± 2,5	16,6 ± 2,73	50,3 ± 1,68	2,0 ± 0,42
	5-е сутки культивирования			
	47,0 ± 8,61	18,3 ± 2,1	32,6 ± 5,88	2,0 ± 0,0

матина, светлой зоной вокруг ядра, базофильной большой протоплазмой. Такие клетки мы определяли как трансформирующиеся, переходные формы. Количество их в культуре интактных лейкоцитов также увеличивалось по сравнению с содержанием этих форм в культуре реконсервированных лейкоцитов. Большие клетки, в 2—3 раза превышающие средние лимфоциты, с крупным гиперхромным ядром, грубой структурой хроматина, содержащие 2—3 ядрышка, с нежно-голубой цитоплазмой, интенсивно окрашенной

по периферии, мы дифференцировали как «бластные» клетки. На разных этапах трансформации появлялись макрофагальные клетки и клетки в стадии митоза. В культуре интактных лейкоцитов содержание лимфобластов достоверно снижалось, а количество макрофагов достоверно возрастало по сравнению с содержанием этих форм в культуре реконсервированных клеток. Это явление, по всей видимости, можно объяснить тем, что среди реконсервированных клеток увеличивается содержание лабильных лейкоцитов (гранулоцитов), которые являются дополнительным антигенным стимулятором для трансформирующихся лимфоцитов.

На 5-е сутки в культуре реконсервированных лейкоцитов увеличивалось количество малых лимфоцитов и трансформированных клеток, а количество лимфобластов уменьшалось по сравнению с их содержанием в культуре интактных лейкоцитов, что, вероятно, обусловлено формированием новых лимфоцитов в процессе клеточной трансформации. Приведенные результаты свидетельствуют о сохранности трансформирующих свойств лимфоцитов после консервации.

Анализируя приведенные данные по низкотемпературной консервации лимфоцитов, мы отмечаем, что эффективность известных до сих пор методов консервации под защитой ДМСО довольно высокая. Однако токсичность криопротектора, а также необходимость дополнительных операций по обработке материала как до замораживания, так и после оттаивания затрудняет внедрение этого метода в практику. Метод низкотемпературной консервации лимфоцитов под защитой полиэтиленоксида с молекулярным весом 400 оказался более эффективным. Выраженные криофилактические свойства ПЭО-400 позволили увеличить скорость замораживания лимфоцитов на первом этапе охлаждения, а также повысить жизнеспособность клеток после реконсервации.

В экспериментах in vitro, проведенных на культуре линейных клеток лимфобластов (RAH), клетки замораживались под защитой различных криопротекторов со скоростью 1° в минуту. Лучшие результаты были получены при использовании 7%-ного ДМСО в смеси с 1%-ным ПВП в специальной среде (RPMI-1640), которая сама по себе также представляет собой защитную смесь. При таком методе замораживания получено 94 — 98% жизнеспособных клеток, определяемых методом гистохимической окраски трипановым синим и эозин-формалином. Предварительные результаты по определению трансплантационных антигенов после оттаивания таких лимфоцитов свидетельствуют об отсутствии каких-либо различий в титрах антигенов.

Замораживание тромбоцитов. Несмотря на то, что выделение тромбоцитов из крови методом дифференциального центрифугирования было предложено в 1893 г. Мозен (цит. по [187]), осуществить консервирование тромбоцитов долгое время не удавалось. Литературные данные относительно возможного сохранения тромбоцитов в пригодном для трансфузии состоянии весьма разноречивы.

Актуальность разработки методов длительного сохранения тромбоцитов не требует особых доказательств. Эти клетки обеспечивают регуляцию кровотока и кровотечений, что особенно опасно в случае нарушения этой системы при комбинированных поражениях либо острых лейкемиях. Однако низкотемпературное хранение тромбоцитов — более сложная проблема, чем решение подобных вопросов, связанных с консервацией эритроцитов либо лейкоцитов, поскольку тромбоциты крайне неустойчивы к действию низких температур. В отличие от других клеточных элементов, они по существу представляют часть популяции, возникшей из мегакариоцитов, и поэтому имеют тенденцию к быстрому разрушению при удалении их из нормальной среды кровообращения. Оказалось, что при температуре +4° хранить тромбоциты более суток не удается, поскольку уже через 3 *ч* уровень жизнеспособности их снижается примерно на 50%, а к 24 *ч* — резко падает [670].

В последнее время в Центральном институте гематологии и переливания крови разработан рецепт консервирующей среды (10 *мл* исходной плазмы, 15 *мл* физиологического раствора, 1 *г* глюкозы и 1 *мл* 50%-ного раствора трилона Б), позволяющей хранить тромбоциты в пригодном для переливания состоянии при +4° до 20 дней и при —20° до двух месяцев [28].

Все же большинство литературных данных свидетельствует о том, что максимальный период хранения обогащенной тромбоцитами плазмы, выделенной из цельной крови, составляет примерно 10 *ч*, а для концентрата тромбоцитов — 4 *ч*. Разработанные методы сохранения тромбоцитов в желатине при +4° позволяют продлить время существования клеток до 1—3 суток, однако клинический эффект таких тромбоцитов был не очень высоким — остановка кровотечений была временной, тромбопластическая недостаточность корригировалась слабо [815—819]. Аналогичные результаты были получены при переливании больным замороженных тромбоцитов, хранившихся в плазме при температуре —15° на протяжении 6 недель [427]. Эффективность тромбоцитов снижалась при высушивании их из замороженного состояния, в то время как переливание свежих тромбоцитов повышает количество протромбина в 2—3 раза и останавливает кровотечение. Лиофилизированный материал не оказывает влияния как на эти параметры, так и на длительность кровотечения. Поэтому дальнейшие поиски шли в направлении разработки метода хранения тромбоцитов при низких температурах под защитой глицерина, ДМСО и медленных скоростей замораживания. Была установлена возможность сохранения в жизнеспособном состоянии до 4 месяцев тромбоцитов собаки или человека, замороженных в растворе глицерина до —79°, что подтверждалось морфологическими тестами и влиянием на ретракцию сгустка крови [138, 834, 835].

Низкотемпературное замораживание тромбоцитов в глицеринизированной плазме со скоростью 1° в минуту до —25° позволяет сохранить после отогрева 30% активных клеток через сутки после

переливания, что было доказано с помощью меченых Cr^{51} тромбоцитов. После тщательного удаления глицерина из тромбоцитов с помощью декстрозы или раствора сорбита в экспериментальных условиях выживаемость после отогрева увеличилась до 65% на протяжении суток после переливания по сравнению с 70% в контроле. При замораживании таким способом тромбоцитов человека после отогрева восстанавливалось до 30—35% со средним показателем выживания до 19,5% [218—220], т. е. процент выживания тромбоцитов человека был гораздо меньше.

Исследовалось также замораживание тромбоцитов, взвешенных в среде, содержащей 50% плазмы и 15% ДМСО. При этом активность клеток снижалась всего на 10—15% по сравнению с контролем. Такая же потеря активности наблюдалась при хранении тромбоцитов в жидком азоте [445, 446]. Очень высокая активность тромбоцитов крови крысы сохранялась в том случае, если перед замораживанием их подвергали частичной дегидратации гипертоническими растворами сахаров, а затем медленно замораживали до —196° в растворе 5%-ной декстрозы и 5%-ном ДМСО. Это обеспечивало сохранение целостности клеток и выживаемость 70—87% тромбоцитов. Такие тромбоциты были способны довольно заметно влиять на факторы кровотечения после их переливания [244, 245]. Растворы ПВП для консервации тромбоцитов, очевидно, мало подходят, поскольку быстрое замораживание цельной крови в присутствии этого полимера хотя и приводит к хорошему сохранению эритроцитов, но разрушает примерно 75% тромбоцитов и ухудшает морфологические показатели других клеток.

Необходимо отметить также и то, что кроме медленных скоростей замораживания некоторые исследователи успешно консервировали тромбоциты, используя для этого быстрое замораживание до —196° [657]. Тромбоциты крысы помещали в глюкозоцитратный раствор и быстро замораживали до —196° в пластиковой таре. После переливания 64% таких клеток на протяжении 18 ч циркулировали в крови в неизменном состоянии, причем выявилась тенденция к уменьшению кровоточивости в 67% случаев. Таким образом, использование быстрых скоростей при замораживании этих клеток — методически пока еще мало исследованная область, нуждающаяся в дальнейшем изучении.

Для выяснения возможности сохранения жизнеспособных тромбоцитов в замороженном состоянии исследовали биохимические и физиологические свойства тромбоцитов, подвергавшихся программированному замораживанию от —20° до температуры жидкого азота (—196°). Замораживание тромбоцитов осуществляли в плазме и в смеси плазмы с ДМСО. В суспензиях эритроцитов до и после замораживания определяли интенсивность гликолиза, активность ферментов — гексокиназы (ГК), дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида (ФГАД), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата (Г6ФД), содержание адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ) и способность к ретракции.

Показано, что накопление лактата наблюдается также после замораживания и оттаивания. АТФ подвергается частичной деградации. Наибольшей активностью характеризуется ЛДГ и Г6ФД; ГК и ФГАД значительно менее активны [104].

Клинические наблюдения показывают, что тромбоциты человека, замороженные в ДМСО, обладают вдвое меньшей активностью по сравнению со свежеперелитыми клетками при лечении больных с тромбоцитопенией, причем их полупериод жизни in vivo был значительно короче. При изучении влияния ДМСО и замораживания на функцию тромбоцитов in vitro, определяемую по способности к синтезу серотонина и ретракции сгустка, установлено, что внезапное прекращение введения ДМСО вызывает осмотические повреждения, сопровождающиеся снижением их функции. Если концентрацию ДМСО постепенно увеличить и затем снижать для увеличения осмотической толерантности тромбоцитов, то при концентрации ДМСО в пределах 3,0 М не наблюдается осмотических повреждений и снижения их функции. Вместе с тем даже кратковременная экспозиция тромбоцитов в 4,0 М ДМСО при комнатной температуре не дает положительных результатов. Замораживание до —10° не уменьшает восстановления функции этих клеток, однако некоторые повреждения все же наблюдаются при замораживании от —10 до —40°. Если замораживать тромбоциты, суспензированные с 16,0М ДМСО до —40° в течение 30 *мин*, то при таком режиме замораживания не происходит дальнейшего ухудшения функции тромбоцитов. Среднее восстановление жизнеспособности тромбоцитов после замораживания до —40° с 2,5М ДМСО (скорость замораживания от 3 до 120° в минуту) составляет 75%, с 1,6М ДМСО — 72% (при скорости замораживания от 1 до 3° в минуту). В некоторых экспериментах была достигнута выживаемость клеток 100% [505].

КОНСЕРВИРОВАНИЕ ПЛАЗМЫ, ПЛАЗМЕННЫХ БЕЛКОВ И ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Неклеточные компоненты крови представляют собой сложную смесь из нейтральных молекул с небольшим молекулярным весом и макромолекул с молекулярным весом, достигающим нескольких миллионов. В этой фракции крови находятся также различные электролиты и микроэлементы, растворенные в водной фазе.

Плазма крови и ее отдельные белковые компоненты имеют большое терапевтическое значение. Плазма и плазменные белки обусловливают такие важнейшие функции, как поддержание объема циркулирующей крови, артериальное давление, свертывание крови, контролируют время и скорость кровотечения, а также выполняют ряд транспортных и иммунологических функций. Поэтому с целью разработки методов длительного хранения и транспортировки этих фракций крови в последнее время интенсивно разрабатываются различные варианты низкотемпературного замораживания и лиофилизации их из охлажденного состояния. Электронномикроскопические

исследования распределения кристаллов льда и изучение их тонкой структуры в замороженной плазме показали, что очень быстрое охлаждение приводит к образованию кристаллов солей видимого размера, в то время как при медленном охлаждении кристаллы не видны. При лиофилизации замороженных препаратов каверны льда более многочисленны, чем после быстрого замораживания [526—528, 586, 587, 783, 785 —789].

Указанные выше методы консервирования позволяют хранить плазму в стабильном состоянии свыше 5 лет. На протяжении этого времени свойства плазмы не подвергаются изменениям, за исключением некоторой потери активности со стороны протромбина. Многократное замораживание и оттаивание также изменяет только активность белков, входящих в свертывающую систему крови,— фибриногена и протромбина. Таким образом, из всех белковых компонентов плазмы наиболее криоустойчивыми, но терапевтически ценными являются белки свертывающей системы крови (плазменный тромбопластин, глобулиновый фактор V, катализатор превращения протромбина — фактор VIII, фактор IX, фактор Стьюарта — Провера — фактор X и фибриноген). Из них наиболее неустойчивыми, как считают, являются фактор V и VIII, которые при выделении из плазмы и замораживании снижают активность соответственно на 25 и 40% [110]. При хранении крови при +4° активность фактора V снижается в течение 1—2 недель на 10—18% первоначальной величины, фактора VIII — через неделю на 27% и в последующие 3 недели хранения — еще на 20—30% [183, 422]. Поэтому необходимо разработать методы низкотемпературной консервации этих белков. Вначале пытались их сохранить путем замораживания до температуры — 20—40°. При таком методе замораживания активность фактора V в течение 3 месяцев хранения снизилась на 25%, а по данным других авторов, через 2 недели хранения при —40° — даже на 50% [175, 646]. Однако согласно Раппопорту [665—666], при хранении в течение года плазмы крови при —20° теряется лишь 20% активности наиболее чувствительного фактора VIII. Быстрое замораживание этого фактора до —25 и —40 или —70°, по данным Бредлоу [175] и Ноур-Эльджина [598], не вызывает особых изменений в активности этого белка.

Следовательно, по этому вопросу в литературе имеются самые различные, а порой и противоречивые мнения, что, очевидно, связано с широкими индивидуальными различиями в активности этих белков. Очищенный фибриноген как при замораживании, так и при высушивании, очевидно, полностью теряет свои свойства [552]. Необходимо также отметить, что по отношению к белкам свертывающей системы крови разрабатывались главным образом условия низкотемпературного хранения и очень мало исследовались оптимальные скорости охлаждения и отогревания.

В одном из исследований условий хранения свежезамороженной плазмы было показано, что активность фактора V постоянно уменьшается, вплоть до 50% первоначального уровня в течение 28 дней

хранения при температуре —50°. Однако при —30° в течение этого времени активность белка не уменьшалась, а при хранении в течение месяца при —15° снизилась на 75%. Более быстрое снижение активности фактора V через 5 месяцев наблюдалось в плазме, замороженной и хранившейся в стеклянном сосуде, по сравнению с хранением в пластмассовой таре. Плазма, замороженная до —30° в стеклянной таре, теряла активность фактора V на 50%, а хранившаяся в пластмассовых бутылочках — всего лишь на 20% [121, 122]. Фактор VIII, который сохранялся при — 50°, обнаруживал вначале снижение активности, а с течением времени отмечалось заметное повышение этого показателя. Это можно, по-видимому, объяснить активацией при —50° какого-то другого фактора, связанного с функцией фактора VIII, подобно тому, как, например, фактор Хагермана совместно с PDA (стабилизирующая клетки и макромолекулы смесь, разработанная фирмой США Park-Davis-Addative) повышают первоначальную активность протромбина плазмы. Первоначальную потерю активности можно отнести за счет частичной денатурации белка при этих температурах. Следует обратить внимание на то, что в пластмассовых контейнерах факторы VIII и IX на протяжении 2 месяцев были более стабильны при температуре —30°, хотя по истечении этого срока наблюдалась активация обеих систем и их разрушение. Хранение в стеклянных контейнерах при — 30° либо в пластмассовых при —50° приводило к активации этих систем гораздо раньше. Поэтому хранить белки в пластмассовых контейнерах лучше при —30°, чем при более низких температурах. В таких условиях удается сохранить стабильность фактора VIII свыше 126 дней [353]. Возможно, различные уровни активации фактора VIII при хранении свежезамороженной плазмы связаны не только с условиями хранения, но и с донорскими особенностями [626]. Гепарин плазмы, как и фибриноген, очевидно, является довольно резистентным к действию низких температур, поскольку замороженный до —80° он через 5 месяцев хранения не терял своей активности [121, 122, 354]. Необходимо также отметить, что встряхивание этих белков при отогреве нецелесообразно, поскольку при этом снижается их активность.

Замораживание и оттаивание изменяют физико-химические свойства и других белков плазмы — липопротеинов, особенно β-липопротеинов [612]. Считают, что это связано с элиминацией структурно связанной воды с поверхности липопротеинового комплекса. Как установлено, β-липопротеин сыворотки крови содержит около 60% воды (к сухому весу), 85% которых, очевидно, размещается внутри молекул, образующих третичную структуру [497, 498]. При хранении β-липопротеина в интервале температур от —5 до 0° его седиментационные свойства сохраняются на протяжении 4 недель, от 0 до +4° — в течение двух недель, а при —28°—всего несколько дней. Однако липопротеины более высокой плотности оставались относительно стабильными при —30°, хотя концентрация активных макромолекул падала на 30%. Концентрация липопро-

тенна с молекулярным весом 100—400 и 20—100 при температуре от —26 до —30° через год заметно снижается от 274 до 51 *мг* (например, липопротеины с мол. весом 100—400). Эти процессы происходили как при быстром, так и при медленном замораживании — оттаивании, хотя все же большие изменения отмечались при медленном замораживании, которые прогрессировали при хранении начиная от недели до года. Вместе с тем некоторые авторы не смогли обнаружить особых изменений в структуре липопротеинов нормальной сыворотки, хранившейся при — 15° [286, 571]. Такие изменения в седиментационных характеристиках скорее всего, как считают, происходят в патологически измененной плазме крови, которая содержит липопротеины, обладающие особыми свойствами.

О поведении других белков плазмы при низких температурах известно очень мало. Например, после замораживания до —20° и продолжительного хранения (в течение 9 месяцев) иммунологическая активность α_2-глобулинов снижалась до 30%, а через 30 месяцев — до 5% [286]. Очевидно, α_2-глобулин наиболее чувствителен к замораживанию, поскольку охлаждение плазмы крови кролика до —20° вызывало сдвиги именно в этом белке, в то время как α_1- и γ-глобулины почти не изменялись [315]. Вместе с тем другие авторы подобных изменений в этих белках при замораживании обнаружить не смогли.

Таким образом, в настоящее время проводятся фундаментальные и прикладные исследования по консервированию крови и ее компонентов. Разработан метод замораживания для сохранения при сверхнизких температурах цельной крови, эритроцитов, плазмы, компонентов плазмы и ядросодержащих клеток — лейкоцитов и тромбоцитов. Разработка этих методов консервирования позволила осуществить длительное (в течение нескольких лет) низкотемпературное хранение крови для клинических целей. В настоящее время считают, что хранить белки, составляющие систему свертывания крови, целесообразнее всего при температуре порядка —30°. Для эритроцитов и других клеточных элементов требуются более низкие температуры (—80, —100 и —120°).

Эритроциты лучше всего сохраняются в концентрированном глицерине или ДМСО и при относительно медленных скоростях их замораживания (несколько градусов в минуту) либо в растворах сахаров и полимеров в сочетании с быстрым охлаждением (несколько сотен градусов в минуту). Лейкоциты и тромбоциты лучше всего сохранять в глицерине или ДМСО при сравнительно медленном охлаждении (несколько градусов в минуту). Следует считать, что при выборе криопротекторов необходимо руководствоваться их способностью к растворению в воде, поскольку такие соединения способны изменять концентрацию электролитов и образование кристаллов льда. Экспериментальные данные также показали, что основными причинами повреждения клеток и компонентов крови являются: а) повышение концентрации электролитов по мере превращения воды в лед; б) факторы, связанные с образованием и ростом кристаллов

льда. Однако до настоящего времени нет еще полного представления о механизмах молекулярных и субмолекулярных криоповреждений структуры клеток при низких температурах и защиты их различными соединениями в этих экстремальных условиях.

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ ЗАМОРАЖИВАНИЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

Метод глубокого охлаждения имеет большое значение для консервирования костного мозга, поскольку хранение его в жизнеспособном состоянии при плюсовых температурах ограничено 1—3 неделями. Это исключает возможность создания запасов гемопоэтической ткани, потребность в которой может возникнуть в любое время.

Необходимость в длительном консервировании костного мозга объясняется очень часто возникающей необходимостью лечения лучевых поражений. Среди разрабатываемых различных методов лечения лучевой патологии наиболее актуальным является метод трансплантации свежего и консервированного костного мозга.

В настоящее время достигнуты определенные успехи в разработке методов низкотемпературного консервирования костного мозга и его последующего использования в клинике [4, 40—42, 53, 77, 82, 101, 102]. Однако проблема трансплантации консервированной глубоким охлаждением кроветворной ткани остается во многом нерешенной и требует продолжения исследований в этом направлении. Все еще недостаточно разработаны и методы замораживания костного мозга, что обусловлено отсутствием специальной аппаратуры, тары, нетоксичных криопротекторных агентов, а также сравнительно слабыми экспериментально-теоретическими исследованиями в этой области.

Повышенный интерес к проблеме консервирования костного мозга заключается главным образом в том, что этот материал широко используется для лечения повреждений в кроветворной системе, вызванных ионизирующим излучением. О способности замороженных клеток костного мозга мыши обеспечивать защиту животных от радиоизлучений впервые сообщалось Барнесом и соавторами [139]. Они установили, что отогретые клетки костного мозга, замороженные в глицерине, сохраняли свою терапевтическую способность. В дальнейшем для этих целей был использован в качестве криопротектора ДМСО, который давал несколько лучшие результаты, чем глицерин, в связи с его повышенной способностью проникать внутрь клеток [133]. Вместе с тем ряд экспериментов, проведенных в это время, показал, что криопротекторы экстрацеллюлярного действия, такие, как, например, ПВП, дают всего лишь 30% жизнеспособных клеток после их низкотемпературного хранения в такой среде. Поэтому были сделаны выводы, что подобного рода соединения не подходят для консервирования таких ядросодержащих клеток, как клетки костного мозга. Правда, было показано, что ПВП все же медленно проникает в клетки благодаря пиноцитозу в присутствии ионов

фосфата, однако такой медленный механизм не обеспечивает низкотемпературную защиту клеток.

Антителообразующие клетки селезенки мыши сохраняют свои специфические свойства после медленного замораживания до —50° в среде 10%-ного ДМСО или глицерина и последующего выдерживания в жидком азоте в течение 135 дней.

Динамика микроскопических изменений клеток костного мозга. Изучение микроскопических процессов, происходящих при замораживании клеток костного мозга под защитой глицерина, ДМСО, ПВП, ПЭО различного молекулярного веса (от 100 до 4000), свидетельствует о том, что растворы глицерина в 1, 2, 5, 5, 10, 15 и 20%-ной концентрации обладают значительной активностью по отношению к водным растворам.

Повышение концентрации глицерина в растворе снижает точку его замораживания до — 13 —15°, способствует уменьшению величины и изменению формы кристаллов и обусловливает постепенный переход структуры замороженного раствора из кристаллической формы в аморфную.

ДМСО, подобно глицерину, является криофилактическим агентом, способным проникать внутрь клеток. Изучение влияния различных концентраций ДМСО на кристаллообразование в суспензии клеток при замораживании 1, 2, 5, 5 и 10%-ных растворов указывает на то, что наименьшей концентрацией, влияющей на размер кристаллов, является 10%-ная концентрация ДМСО в замороженной суспензии.

Микроскопическое исследование процессов замораживания в 1, 2, 5, 5, 8 и 10%-ных концентрациях ПВП показали, что мелкокристаллические структуры могут быть получены при использовании 8%-ного раствора этого препарата.

При выяснении подобных вопросов, касающихся действия ПЭО-400, методом низкотемпературной кристаллографии получены данные, свидетельствующие о том, что уже 10—15%-ные растворы ПЭО при температуре — 196° характеризуются образованием мелкокристаллической структуры, замедлением процесса кристаллизации, значительным уменьшением размеров образующихся кристаллов. Во время зарождения кристаллов внутри клетки образуются сильно насыщенные солями жидкие растворы, которые окончательно кристаллизуются при значительно более низких температурах. Поскольку ПЭО не кристаллизуется одновременно с водой, то в процессе охлаждения, проникая постепенно в пространства между кристаллами, он разбавляет солевые растворы и не допускает их сильной концентрации.

Изучение кристаллизации, протекающей при охлаждении внутри клеток костного мозга, с помощью метода электронной микроскопии показало, что процессы кристаллизации при начальном медленном охлаждении клеток до температуры — 15° в растворе ЦОЛИПК-3 без криофилактических растворов сопровождаются обширным льдообразованием преимущественно вне клеток. Клетки

значительно уменьшены в размерах и расположены между большими острыми кристаллами. Размеры плоскостей внутри клеток значительно меньше, чем в межклеточном пространстве.

В образцах, содержащих различные криофилактические агенты (15%-ный ПЭО, 10%-ный раствор глицерина, 10%-ный ДМСО и 8%-ный ПВП), при температуре — 15° льдообразование не обнаруживается. Исследование процессов кристаллизации клеток, замороженных в двух этапах до температуры — 80—90° со стабилизирующим раствором ЦОЛИПК-3 без криофилактических агентов, показало, что при этом наблюдается внеклеточное льдообразование за счет образования крупных неправильной формы кристаллов размером от 1—2 до 10 *мк* (рис. 90).

Добавление к раствору клеток с ЦОЛИПК-3 глицерина в 15%-ной концентрации несколько изменяет процессы кристаллизации при охлаждении. При этом образуются большие массы внеклеточного льда с довольно крупными каналами, среди которых располагаются клетки. Отмечается образование монетных столбиков из клеток костного мозга.

При замораживании костного мозга под защитой ПЭО электронномикроскопически выявлено резкое ослабление процессов вне- и внутриклеточной кристаллизации. Образующиеся глыбки льда небольших размеров (1—1,5 *мк*) встречаются сравнительно редко, а основная масса замораживаемой взвеси имеет мелкокристаллическую структуру (рис. 91).

Замораживание клеток костного мозга с 8%-ным ПВП сопровождается внеклеточной кристаллизацией, значительно отличающейся от кристаллизации при действии других криопротекторов. Кристаллы мелкие и не развиваются в большие глыбы (рис. 92).

Образцы, содержащие 10%-ный ДМСО, при электронномикроскопическом исследовании процессов закристаллизации представляли собой мелкокристаллическую внеклеточную структуру (рис. 93). Электронномикроскопическое изучение клеток после замораживания и размораживания показало, что в образцах, в которых при замораживании отсутствует внутриклеточная кристаллизация, микроструктура клеток не повреждается.

Не меньший интерес представляет изучение электронномикроскопических изменений клеток костного мозга после 2-часовой выдержки при + 4° в растворе ЦОЛИПК-3. При этом наблюдается прогрессирующая размытость структур, набухание митохондрий и эндоплазматической сети отдельных клеток, а также появление вакуолей под наружной мембраной (рис. 94). Следовательно, стабилизирующий раствор ЦОЛИПК-3 не способен полностью предотвращать деструктивные изменения в клетках и, кроме того, вызывает дополнительные повреждения.

Добавление защитных агентов увеличивает повреждаемость клеток. Особенно сильное влияние на клетки оказывают криопротекторы проникающего типа (ДМСО, глицерин и др.). Одно-двухчасовая экспозиция клеток костного мозга в средах, содержащих

10%-ный ДМСО или 15%-ный раствор глицерина при + 4°, приводит к практически полному разрушению всех клеток (рис. 95). Сокращение времени экспозиции до 30 *мин* для проб, содержащих глицерин, и 10 *мин* для проб с ДМСО значительно уменьшает повреждение клеток. После этого во многих клетках изменяется тонкое строение ядра и цитоплазмы, отмечается набухание и лизис митохондрий, структур эндоплазматической сети, а также разрушение специфичных гранул клеток белого ряда (рис. 95, 96).

При добавлении к пробам криопротектора экстрацеллюлярного действия (ПЭО-400) повреждения клеток менее значительны. После часовой выдержки клеток костного мозга в растворе ЦОЛИПК-3, содержащем 15%-ный ПЭО-400, отмечаются лишь небольшие отклонения в их нормальной ультраструктуре — образуются лишь полости в цитоплазме вдоль ядерной оболочки отдельных клеток. Образование таких полостей связано, по-видимому, со сжатием ядра, возникающим в результате осмотических явлений, развивающихся в результате частичного проникновения ПЭО-400 в цитоплазму клеток. Среди других повреждений необходимо отметить незначительное набухание митохондрий и структур эндоплазматической сети, а также отдельных клеток. В целом же большинство клеток сохраняет после инкубации в течение часа в среде, содержащей 15%-ный ПЭО-400, строение, близкое к норме (рис. 97).

Таким образом, за время подготовки клеток костного мозга к замораживанию они подвергаются определенным изменениям, которые могут оказывать большое влияние на результаты их низкотемпературного консервирования.

Результаты электронномикроскопических исследований клеток костного мозга, охлажденных по двухэтапной программе с глицерином, ДМСО, ПЭО-400, а также проб, содержащих только стабилизирующий раствор ЦОЛИПК-3, показали, что на первом этапе охлаждения (до — 13 — 15°) кристаллизация растворов наступает только в пробах без добавления криопротекторов.

После охлаждения до — 196° наступает полная кристаллизация исследуемых проб, причем основная часть образцов кристаллизуется с образованием крупных кристаллов льда с расположенными между ними канальцами, образуя типичную для каждого защитного агента структуру замерзшего раствора. Вода кристаллизуется в виде крупных кристаллов льда, а соли, сахара и другие компоненты первоначального раствора концентрируются в промежутках между растущими кристаллами льда, образуя сеть канальцев. При этом клетки обычно располагаются в канальцах, содержащих на последних этапах кристаллизации жидкой фазы сильно концентрированные растворы солей и сахара. Концентрация солей и сахаров в канальцах, по-видимому, очень высокая, о чем свидетельствует высокая электронная плотность вещества канальцев, а также мелкие темные кристаллы солей или сахаров, выкристаллизовавшиеся во время образования канальцев (рис. 98). Создается впечатление, что основные повреждения клеток в пробах, замороженных с за-

щитными агентами, связаны с внутриклеточным льдообразованием. Степень повреждения клеток в таких пробах находится в прямой зависимости от структуры кристаллизованного раствора и характера формирования в них канальцев, причем чем выше концентрация веществ в канальцах, тем меньше клетки повреждены внутриклеточным льдом.

Наиболее выраженные канальцы наблюдаются в пробах, содержащих ПЭО-400, а также в пробах, содержащих только стабилизирующий раствор ЦОЛИПК-3. Соответственно и повреждения клеток внутриклеточным льдом менее выражены в пробах с ПЭО-400, в то время как в пробах, замороженных с глицерином и ДМСО, ядросодержащие клетки насыщены большим количеством внутриклеточного льда (рис. 99). Хотя такой тип кристаллизации в присутствии ПЭО-400 является наиболее щадящим для клеток, в пробах, замороженных без защитного агента, несмотря на формирование канальцеподобных структур, клетки оказываются разрушенными льдообразованием. В последнем случае образуется большое количество внеклеточного льда, образовавшегося в результате дегидратации клетки. Образование внутри- и внеклеточного льда в этих пробах происходит полностью за счет жидкой фазы клетки и приводит к полному ее разрушению. Остатки клетки оказываются заключенными внутри кристалла льда, причем образовавшаяся на месте клетки ледяная масса сохраняет форму клетки.

В случае, когда пробы, содержащие защитные агенты, кристаллизуются из несколько переохлажденного состояния, структура замерзшего раствора отличается некоторой беспорядочностью и канальцы, как правило, недоразвиты. Клетки в этих пробах обычно значительно больше повреждены внутриклеточным льдом (рис. 100).

Таким образом, значительное число повреждений клеток костного мозга во время их замораживания с защитными агентами может происходить и под влиянием внутриклеточного льда. Однако если клетки замораживаются в межледяных канальцах, то они подвергаются минимальным повреждениям. Следовательно, кристаллизация проб с образованием хорошо сформированных канальцев является наиболее щадящим типом кристаллизации растворов, содержащих защитные агенты. Решающее значение в этом процессе принадлежит, по-видимому, криопротекторам, концентрация которых в канальцах, очевидно, очень высока.

Электронномикроскопическое исследование проб костного мозга, быстро отогретых в водяной бане после программного замораживания, показало, что во время отогрева происходит дальнейшее увеличение ранее полученных повреждений. Основными повреждающими факторами при этом являются рекристаллизация и другие процессы, приводящие к увеличению ранее образовавшихся кристаллов льда, в результате чего может произойти разрушение клеток.

Рекристаллизационные повреждения имеют место прежде всего в клетках с интрацеллюлярными кристаллами льда, образо-

вавшегося во время замораживания, и наиболее типичны в пробах с глицерином (рис. 101, 102) и особенно в пробах, замороженных с ДМСО (рис. 103). В пробах, замороженных с ПЭО-400 в случае кристаллизации с образованием канальцев, отогретые клетки не имеют заметных повреждений, вызванных рекристаллизационным ростом кристаллов льда (рис. 104).

Установлено, что в клетках костного мозга после его получения от донора можно наблюдать деструктивные изменения ультраструктур, которые в дальнейшем в процессе низкотемпературного хранения постепенно нарастают. Добавление криопротекторов заметно увеличивает повреждения клеток во время их экспозиции при + 4°. Возникающие повреждения в клетках в процессе подготовки к замораживанию в дальнейшем обычно являются теми местами, в которых локализуются внутриклеточные кристаллы льда, вызывающие во время замораживания и последующего отогрева значительные повреждения. ПЭО-400 меньше, чем другие криопротекторы, повреждает клетки перед замораживанием, обладает лучшими защитными свойствами во время охлаждения и отогрева биологического материала.

Оценивая различные режимы одноэтапного охлаждения миелокариоцитов, мы установили, что самые лучшие результаты после оттаивания могут быть получены при замораживании костного мозга со скоростью 10° в минуту под защитным действием ПЭО-400 в 15%-ной конечной концентрации. Дальнейшее ускорение охлаждения сопровождается падением процента сохранности живых клеток.

Двухэтапное замораживание дает наилучшие результаты по сохранности клеток (до 85—90%) при следующей программе замораживания: I этап—от 0 до —15°со скоростью 1° в минуту, II этап — от —15 до —196° со скоростью 400° в минуту (табл. 33). Определение оптимальной температуры между этапами программного замораживания показало, что наилучшие результаты получены при температуре — 15°. Анализируя результаты экспериментальных исследований по определению оптимальной концентрации нового криопротекторного вещества ПЭО-400, можно отметить, что наилучшие данные по сохранности жизнеспособных клеток получены в результате применения 15%-ной концентрации вещества во взвеси при оптимальной программе замораживания.

Рентгеноструктурные исследования замораживания клеток костного мозга. Информация о характере кристаллизации растворов суспензии клеток в зависимости от процентного содержания в них различных ограждающих сред может быть получена с помощью рентгеноструктурного анализа.

Исследование особенностей затвердевания биологических взвесей, консервированных методом быстрого замораживания в жидком азоте методом рентгеноструктурного анализа под защитой растворов различных концентраций глицерина, ПВП, ДМСО и ПЭО различного молекулярного веса, показало, что повышение концентрации исследуемых веществ в растворах способствует уменьшению размеров

кристаллов, однако даже при содержании 15—20%-ного глицерина в суспендирующей среде замороженная структура имеет мелкие кристаллы. Рентгеновская картина 100%-ного замороженного глицерина указывает на то, что структура представляет собой очень мелкие кристаллы, которые на рентгенограмме имеют вид концентрических окружностей и широких гало в области малых углов.

Анализ результатов рентгеноструктурных исследований растворов ДМСО и ПВП различной концентрации показал, что повышенные концентрации этих веществ в растворах сильно снижают размер кристаллов. Например, 10—15%-ная концентрация этих крио-

Таблица 33

Сравнительная оценка различных скоростей двухэтапного охлаждения костного мозга с ПЭО-400 (по данным сохраняемости ядросодержащих клеток) [33]

Скорость охлаждения, °С в минуту		Статистические показатели сохранности клеток		
I этап	II этап	$M \pm m$	n	$p <$
0,5	10	36,1 ± 2,2	18	0,005
1	10	54 ± 3,1	24	0,1
1	50	52 ± 6,6	18	0,1
1	400	67 ± 3,5	18	—
5	10	53 ± 6,4	18	0,1
5	50	54 ± 3,3	24	0,1
5	400	53 ± 2,3	18	0,1
10	10	64 ± 5,17	18	0,1
20	10	40 ± 6,2	18	0,05

протекторов дает кристаллическую структуру с размерами зерен 10^{-4} *см*. При повышении концентрации до 20—30% размер кристаллов уменьшается, рентгеновская картина представляет собой, как правило, четкие диффракционные кольца, свидетельствующие о мелкокристаллической структуре с величиной зерен 10^{-5} *см* (рис. 105).

Рентгеноструктурные исследования растворов ПЭО с молекулярным весом 100, 400, 1000, 1500, 2000 и 4000 концентрации 1, 2, 5, 5, 7,5, 10, 15, 100% показали, что увеличение концентрации препаратов в суспензиях, независимо от молекулярного веса, значительно снижает размер кристаллов. Все образцы, содержащие 10—15% вещества, дают мелкокристаллическую структуру с размером зерен 10^{-3} или 10^{-4} *см*. Исследование 100%-ного раствора ПЭО различного молекулярного веса свидетельствует о том, что он обладает аморфной структурой, о чем свидетельствует отсутствие дебаевских цилиндрических окружностей и наличие широкого однородного гало в области малых углов (рис. 106).

Сравнительная оценка до и после замораживания, произведенная путем изучения миелограмм и подсчета ядросодержащих клеток, показала прямую зависимость выживаемости клеточных

Влияние концентрации ПЭО-400, глицерина, ПВП, ДМСО на их защитное действие

Вещество, добавляемое к раствору ЦОЛИПК-3	Концентрация добавляемого вещества, %	Число ядросодержащих клеток		По
		до замораживания	после замораживания	до замораживания
Раствор ЦОЛИПК-3	—	10700±375	3500±570	98±1,7
ПЭО-400	2,5	8200±142	6700±322	94±1,4
ПЭО-400	5,0	7450±171	5000±123	94±2,1
ПЭО-400	10,0	7200±203	4600±191	93±1,5
ПЭО-400	15,0	7000±227	5100±282	86±1,8
ПЭО-400	20,0	6900±93	5600±163	77±2,3
Глицерин	15,0	7200±158	5700±310	84±1,3
ПВП	8,0	7100±111	5200±203	80±2,1
ДМСО	10,0	7300±210	5100±177	81±2,4

элементов костного мозга от концентрации ПЭО-400, глицерина, ПВП и ДМСО (табл. 34). В соответствии с данными рентгеноструктурного анализа результаты эксперимента свидетельствуют о том, что 15%-ный раствор ПЭО-400 обеспечивает наилучшую защиту клеток костного мозга. Он не уступает по своему действию стандартным криопротекторным агентам — 15%-ному раствору глицерина, 10%-ному раствору ДМСО и 8%-ному раствору ПВП.

Защита клеток костного мозга при глубоком замораживании. В настоящее время методы замораживания клеток костного мозга в силу различных причин остаются еще недостаточно разработанными, а данные литературы в этом отношении весьма разноречивы. Особенно это относится к оценке влияния различных факторов на сохранность клеток костного мозга при глубоком охлаждении. В качестве предварительных экспериментов была исследована гемопоэтическая ткань человеческих эмбрионов и плодов. Защитной средой в данном случае служил 15%-ный раствор глицерина и 15%-ный раствор ПЭО-400.

Результаты проведенных исследований показали, что при хранении взвеси клеток в 15%-ном растворе глицерина при температуре — 196° на протяжении года и больше сохраняется 70 ± 2,6% жизнеспособных клеток, а при хранении взвеси клеток в растворах ПЭО при тех же условиях — 60—80% (табл. 35).

Изучение миелограмм и цитограмм печени свидетельствует о том, что процентное соотношение клеточных форм костного мозга до замораживания и в процессе хранения в течение года существенно не изменяется. При длительном хранении ядерные клетки миелоидного, эритроидного и лимфоидного рядов хорошо сохраняются и четко дифференцируются.

Таблица 34

в процессе поэтапного замораживания костного мозга до температуры —196°

Жизнеспособность клеток, %				
Шреку	Гранулообразование		Люминесцентная микроскопия	
после замораживания	до замораживания	после замораживания	до замораживания	после замораживания
30±5,2	96±1,2	23±7,8	98±1,6	29±8,2
51±3,4	93±1,8	52±3,2	95±0,9	56±3,6
49±3,7	94±1,5	95±4,2	95±1,1	59±2,8
55±2,8	92±2,3	60±3,8	93±2,1	68±4,5
62±6,3	85±2,7	59±5,2	87±1,3	62±9,1
52±2,4	76±1,9	52±3,4	80±2,1	60±8,3
60±3,8	85±3,1	66±2,3	85±1,8	65±3,8
58±4,5	82±4,3	63±3,8	81±2,3	60±7,1
62±4,2	83±3,7	64±2,8	82±2,1	62±5,2

При низкотемпературном консервировании костного мозга (от взрослых доноров человека) с использованием в качестве защитных агентов 15%-ного раствора глицерина и раствора ПЭО различного молекулярного веса (от 100 до 6000) и концентрации (от 1 до 25%) было показано, что метод сверхбыстрого охлаждения (до 600° в минуту) обеспечивает сохранность клеток эритробластического ряда,

Таблица 35

Выживаемость клеток гемопоэтической ткани при хранении их в 15%-ном растворе ПЭО-400 при —196° [85]

Срок хранения, месяцы	Жизнеспособность клеток, %		
	По методу Шрека	Люминесцентная микроскопия	ДНК, *м*%
3	85	95	Снижение на 19—20%
6	68	70	То же
12	52	60	» »

Примечание. После всех сроков хранения клеток в ПЭО-400 они давали рост в культуре ткани.

в то время как элементы лейкобластического ряда в значительной степени разрушаются. Метод двухэтапного охлаждения (от 0 до —15° со скоростью 1° в минуту и далее до —196° со скоростью 200—300° в минуту) обеспечивает лучшую выживаемость клеток белого ростка крови, но при этом оказывает выраженное разрушающее действие на зрелые элементы эритробластического ряда. Сводные данные о жизнеспособности клеток костного мозга,

Таблица 36

Жизнеспособность клеток костного мозга, консервированного глубоким охлаждением с использованием в качестве криопротектора ПЭО различного молекулярного веса в 15%-ной концентрации и 15%-ного раствора глицерина [83, 84, 85]

Материал	До замораживания			После замораживания и хранения в течение 6—15 месяцев при —196°			
	Суправитальная окраска 1%-ным эозином, %	Люминесцентная микроскопия, %	Количество клеток в 1 мм³	Срок хранения, месяцы	Суправитальная окраска 1%-ным эозином, %	Люминесцентная микроскопия, %	Количество клеток в 1 мм³
Костный мозг + + ЦОЛИПК-5 + + 10%-ная сыворотка АВ + 15%-ный ПЭО-100	89,0 ± 4,28	91,5 ± 3,62	32 500 ± 9397,0	2	30,5 ± 5,8	34,3 ± 7,31	2500 ± 6011,56
Костный мозг + + ЦОЛИПК-5 + + 10%-ная сыворотка АВ + 15%-ный ПЭО-400	91,2 ± 0,76	93,1 ± 0,62	17 800 ± 1621,9	12	81,5 ± 1,89	85,2 ± 1,55	13200 ± 1208,4
Костный мозг + + ЦОЛИПК-5 + + 10%-ная сыворотка АВ + 15%-ный ПЭО-1000	90,5 ± 0,99	94,5 ± 0,89	16 000 ± 7551,8	15	89,5 ± 0,96	90,0 ± 2,04	21000 ± 6852,6
Костный мозг + + ЦОЛИПК-76 + + 10%-ная сыворотка АВ + 15%-ный ПЭО-2000	94,5 ± 1,02	96,0 ± 0,75	19 500 ± 4218	6	90,5 ± 1,02	91 ± 0,92	19000 ± 4210

Продолжение табл. 36

Материал	До замораживания			После замораживания и хранения в течение 6—15 месяцев при —196°			
	Суправитальная окраска 1%-ным эозином, %	Люминесцентная микроскопия, %	Количество клеток в 1 мм³	Срок хранения, месяцы	Суправитальная окраска 1%-ным эозином, %	Люминесцентная микроскопия, %	Количество клеток в 1 мм³
Костный мозг + + ЦОЛИПК-5 + + 10%-ная сыворотка АВ + 10%-ный ПЭО-4000	91,2 ± 1,65	93,5 ± 1,33	30 000 ± 4722,4	12	87,0 ± 1,45	89,0 ± 1,48	29000 ± 4118,5
Костный мозг + + ЦОЛИПК-5 + + 10%-ная сыворотка АВ + 10%-ный ПЭО-6000	94,0 ± 0,88	94,7 ± 0,56	10 000 ± 1948,2	3	90,0 ± 0,81	90,0 ± 0,88	9500 ± 1936,5
Костный мозг + + ЦОЛИПК-76 + + 10%-ная сыворотка АВ + 15%-ный глицерин	94,9 ± 0,63	95,7 ± 0,64	19 170 ± 2519,7	12	83,5 ± 1,7	85,8 ± 1,4	14890 ± 2212,5

замороженного по программе с ПЭО различной концентрации и молекулярного веса при хранении их в течение 6—12 месяцев, представлены в табл. 36.

В результате проведенной сравнительной оценки различных стабилизирующих сред (растворы ЦОЛИПК-3, ЦОЛИПК-5, ЦОЛИПК-7б, жидкость Хенкса с добавлением гепарина) не было выявлено существенных преимуществ какого-либо из указанных растворов для консервирования костного мозга программным замораживанием. Указанные растворы способствуют сохранности клеток в условиях низких температур лишь после добавления к ним ограждающей среды. На практике преимущество было отдано раствору ЦОЛИПК-3, поскольку он содержит желатин, что позволяет фракционировать полученную взвесь костного мозга и получать в «прозрачном слое» ядросодержащие клетки. Сохранность этих клеток при замораживании может быть обеспечена программным охлаждением, в то время как осажденная эритроцитарная масса требует одноэтапного быстрого режима замораживания. При изучении влияния времени экспозиции ткани с защитной средой на выживаемость клеток костного мозга удалось установить, что взвесь клеток можно выдерживать в холодильнике минимально 30 *мин* и максимально — 24 *ч*. Наилучший эквилибрационный период находится в пределах от 30 *мин* до 3 *ч* при температуре +4°.

При сравнительной оценке различных режимов замораживания выявлено, что метод двухэтапного охлаждения костного мозга (от 0 до —15° со скоростью 1° в минуту и далее до —196° со скоростью 300—400° в минуту) с добавлением в качестве защитной среды ПЭО обеспечивает выживаемость 80 ± 5,8% клеточных элементов, причем на миелограммах удается дифференцировать все виды клеток, в том числе и молодые формы. Понижение температуры до —269° не снижает жизнеспособности клеток костного мозга.

Определять биологическую полноценность клеток костного мозга на различных этапах подготовки к охлаждению, а также после замораживания — оттаивания костного мозга удобно с помощью цитохимических показателей (табл. 37).

Из данных табл. 37 видно, что добавление к взвеси клеток 15%-ного раствора ПЭО приводит к весьма незначительным изменениям цитохимических коэффициентов. При охлаждении до —196° и оттаивании количество гликогена в клетках снижается до 20%, что согласуется с результатами исследований жизнеспособности клеток с применением эозиновой пробы, гранулярного красителя и люминесцентного анализа.

Содержание сульфгидрильных групп после размораживания изменяется мало (1,99 в исходном, 1,39 после оттаивания), что говорит о хорошей сохранности окислительно-восстановительных реакций клетки и возможности роста и деления. Вместе с тем количество нуклеиновых кислот в костномозговых клетках в процессе глубокого охлаждения и хранения до года постепенно уменьшается.

ДНК обнаруживается в ядрах более зрелых клеток (лимфоцитах, плазматических клетках, эритробластах 2-го и 3-го порядка, нейтрофилах). Слабо воспринимают окраску ядра менее дифференцированных клеток — эритробластов, миелобластов и миелоцитов.

В консервированном при —196° костном мозге РНК содержится в большом количестве в проэритробластах, миелобластах, базофильных эритробластах, лимфоцитах, плазматических клетках, в меньшей степени — в миелоцитах и совершенно отсутствует в нейтрофилах. Тот факт, что в процессе хранения (92 дня) содержание нуклеиновых кислот в костномозговых клетках не изменяется

Таблица 37

Средние цитохимические коэффициенты содержания некоторых веществ в костном мозге при действии ПЭО-400 [85]

Вещество	Нативный костный мозг	Костный мозг +15%-ный ПЭО-400 при экспозиции 30 *мин* в течение 3 ч при +4°	Костный мозг +15%-ный ПЭО-400 после охлаждения до —196° и оттаивания
Гликоген	1,68	1,64	1,19
SH-группы	1,99	1,78	1,39
ДНК	2,07	1,81	1,44
РНК	1,74	1,58	1,32
Липиды	1,60	1,38	0,89
Пероксидаза	1,19	0,65	0,65

по сравнению с нативным трансплантатом, свидетельствует о сохранении жизнеспособности клеток костного мозга.

Количество липидов пероксидазы уменьшается, очевидно, за счет разрушения клеток. Пероксидаза располагается в цитоплазме гранулоцитов в виде нерезко выраженной зернистости, которая хорошо видна и в размороженных клетках.

Приведенные выше данные цитохимических исследований свидетельствуют о том, что при глубоком охлаждении и длительном хранении костного мозга с использованием в качестве криопротектора 15%-ного раствора ПЭО-400 удается сохранить на протяжении года 70—80% клеток в физиологически полноценном состоянии.

Сопоставление этих данных с результатами соответствующих исследований с использованием глицерина показало, что по своему защитному действию ПЭО-400 не уступает глицерину. Вместе с тем значительным преимуществом ПЭО является его низкая токсичность, что позволяет в значительной степени упростить методику обработки консервированного костного мозга перед трансфузией его больным с угнетением гемопоэза. Выраженные криофилактические свойства ПЭО в сочетании с низкой токсичностью могут служить основанием для применения его в качестве защитной среды при консервировании костного мозга в клинике.

Морфология клеток костного мозга при действии низких температур. Изучение влияния экспозиции миелокариоцитов с криопротектором ПЭО-400 (в отличие от ПЭО-100, ПЭО-1000, ПЭО-2000, ПЭО-4000, ПЭО-6000, глицерина и ДМСО) на их сохранность до и после консервирования показало, что увеличение времени экспозиции миелокариоцитов с криопротектором до 24 *ч* ведет к достоверному уменьшению числа жизнеспособных клеток во всех пробах. Замораживание — оттаивание также снижает число живых миелокариоцитов по сравнению с их количеством до консервирования при —196°. Лучшие результаты могут быть получены после 15—30-минутной экспозиции клеток гемопоэтической ткани с исследуемыми криопротекторами, несмотря на различные химические характеристики этих веществ. Лучшим криопротекторным действием обладал ПЭО-400; ПЭО-1000 и ПЭО-2000 оказались неэффективными, а ПЭО-100, ПЭО-4000, ПЭО-6000, глицерин и ДМСО существенно уменьшали количество жизнеспособных клеток (табл. 38). Реконсервирование клеток кроветворной ткани показало, что лучший эффект оказывали криопротекторы в 15%-ной концентрации.

Результаты сравнения защитного действия вышеуказанных криопротекторов на миелокариоциты в процессе консервирования (—196°) свидетельствуют о том, что ПЭО-400 в 15%-ной концентрации обеспечивает наибольшую выживаемость клеток костного мозга (81% живых клеток по эозиновой пробе, 83% — по данным люминесцентной микроскопии и 81% — по способности к гранулообразованию).

С целью снижения повреждающего действия ПЭО-400 на гемопоэтическую ткань его следует перед трансплантацией предварительно разводить, что способствует получению более высокого числа жизнеспособных реконсервированных миелокариоцитов (до 95%) по сравнению с применением 100%-ного раствора ПЭО (до 90%). Раствор ЦОЛИПК-3 в качестве разбавителя непригоден, поскольку при разведении им раствора криопротектора иногда выпадает белый хлопьевидный осадок. Поэтому лучше в качестве разбавителя ПЭО использовать раствор Рингера.

Изучение морфологической сохранности костного мозга после выдержки его в растворе ЦОЛИПК-3, а также в среде, содержащей ПЭО-400, показало, что в течение 6-часовой экспозиции изменений в морфологии клеток не отмечается (рис. 107). После добавления ПЭО-400 в 15%-ной концентрации и экспозиции с ним в течение 15—30 *мин* клетки хорошо дифференцируются и сохраняют обычный вид. Одночасовая выдержка с криопротектором вызывает помутнение клеточного содержимого и вакуолизацию протоплазмы. При подсчете миелограмм наблюдается сморщивание 16% клеток, а также повреждение их целостности (8%) (табл. 38).

После замораживания — оттаивания изменения наблюдаются в основном в сегментоядерных гранулоцитах и выражаются в пикнозе ядра, а иногда и в кариорексисе, а также в вакуолизации цито-

плазмы. Отмечается относительное повышение количества нормобластов. Процентное содержание гемоцитобластов и миелоцитов практически не изменяется. Число разрушенных клеток остается прежним, в то время как процент сморщенных клеток существенно возрастает (табл. 38). Поэтому если размороженные клетки миелоидной ткани перенести в сыворотку АВ0, они принимают свой

Таблица 38

Средние показатели миелограмм до и после консервирования (—196°) костного мозга под защитой 15%-ного ПЭО-400 [73]

Клеточные элементы	Содержание клеточных элементов в костном мозге, %		
	Костный мозг + + ЦОЛИПК-3	Костный мозг + ЦОЛИПК-3 + 15%-ный ПЭО-400	Костный мозг после замораживания—оттаивания
Ретикулярные клетки	0,88	0,11	0,25
Гемоцитобласты	0,82	0,3	0,86
Промиелоциты	1,85	0,23	0,60
Миелоциты	7,17	6,78	6,47
Метамиелоциты	8,23	3,15	1,05
Палочкоядерные нейтрофилы	16,19	12,71	4,94
Сегментоядерные нейтрофилы	28,88	23,05	14,50
Базофилы	0,43	0,4	0,06
Эозинофилы	2,47	1,35	0,50
Лимфоциты	14,00	9,6	0,59
Моноциты	1,42	1,25	0,11
Мегакариоциты	0,59	0,23	0,11
Проэритробласты	0,5	0,11	0,06
Нормобласты	9,7	14,58	17,23
Плазматические клетки	—	1,34	2,05
Разрушенные клетки	—	8,52	8,12
Сморщенные клетки	—	15,52	44,30

обычный вид и количество сморщенных клеток уменьшается. Очевидно, при попадании в кровяное русло реципиента клетки также могут восстанавливать свою структуру.

Электронномикроскопические исследования миелокариоцитов (рис. 108) после одночасовой и 15-минутной выдержки с ПЭО-400 по сравнению с ПЭО другого молекулярного веса (рис. 109), глицерином и ДМСО свидетельствуют о том, что одночасовая экспозиция клеток кроветворной ткани с криопротектором слишком длительна и ведет к серьезным повреждениям клеточной структуры. Тем не менее даже при такой длительной выдержке исследуемые

криопротекторы по-разному и в неодинаковой степени повреждают ультраструктуру клеток гемопоэтической ткани. Наименьшее повреждающее действие оказывают ПЭО-400, ПЭО-2000 и глицерин.

После 15-минутной (оптимальной) экспозиции с ПЭО-400 и глицерином подавляющее большинство клеток сохраняет свою нормальную ультраструктуру. Однако и в этом случае наиболее ранимыми являются зрелые гранулоциты, наиболее стойкие лимфоциты и элементы эритроидного ряда. Из субмикроскопических структур чувствительными к воздействию криопротектора оказались мембранные структуры (эндоплазматическая сеть, клеточная и ядерная оболочки, мембраны митохондрий), которые частично или полностью лизировались.

Изучение электронограмм клеток костного мозга после консервирования (—196°) под защитой ПЭО-400 и после года хранения при этой температуре показало, что изменения ультрастуктуры миелокариоцитов в основном такие же, как при добавлении криопротекторов до воздействия холода. Однако количество клеток с поврежденной ультраструктурой было несколько выше после консервирования, чем после 15-минутного контакта их с криопротектором. Следовательно, изменения в структуре клеток, регистрируемые после замораживания — оттаивания, обусловлены, с одной стороны, действием криопротектора, с другой — самим процессом охлаждения и отогрева.

В результате исследования фагоцитарной активности миелокариоцитов в зависимости от экспозиции с ПЭО-400 установлено, что наличие криопротектора в клеточной суспензии тормозит эту функцию клеток: после 15-минутной экспозиции — на 64%, а после 1—2-часовой экспозиции наблюдается достоверное повышение этих показателей—фагоцитарная активность достигает 67% (рис. 110). Замораживание — оттаивание еще в большей степени угнетает способность клеток кроветворной ткани к фагоцитозу. Помещение реконсервированных клеток костного мозга в сыворотку АВ0 восстанавливает их фагоцитарную активность до 60%.

Исследования функциональной активности миелокариоцитов в зависимости от предварительной экспозиции с криопротектором свидетельствуют о важности времени экспозиции с криопротектором перед замораживанием в подготовке клеток костного мозга к консервированию. Хранение консервированного донорского и трупного костного моза в течение 12 месяцев в жидком азоте не оказывает влияния на их функциональную активность. Способность к фагоцитозу донорского материала после 12 месяцев хранения достоверно не отличается от таковой после моментального замораживания — оттаивания, а также по сравнению с более кратковременным хранением его в течение 1, 3 и 6 месяцев.

Сохранение функциональной полноценности миелокариоцитов при длительном консервировании свидетельствует о том, что процесс замораживания — оттаивания в меньшей степени угнетает фагоцитарную активность, чем сам криопротектор. Действительно,

эксперименты по изучению влияния 15%-ной концентрации ПЭО-400 на способность лейкоцитов к фагоцитозу показали, что удаление консервирующей среды с криопротектором из взвеси клеток без предварительного замораживания — оттаивания повышает фагоцитарную активность с 20 до 62% (при контроле 81%). При этом в показателях жизнеспособности по эозиновой пробе и числу ядросодержащих клеток не удается выявить существенных отличий от исходных (рис. 111).

Авторадиографические исследования костного мозга с H^3-тимидином показали, что низкотемпературное консервирование под защитой ПЭО-400 не снижает синтез ДНК в миелокариоцитах,

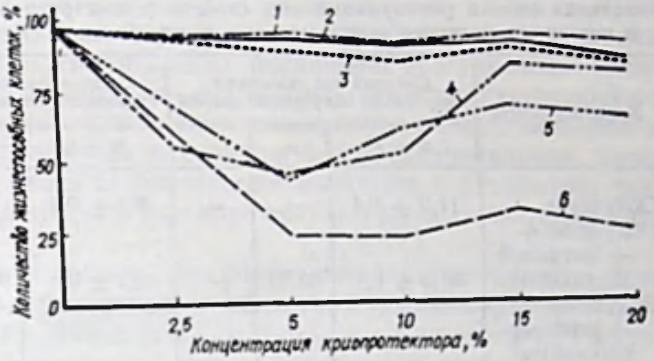


Рис. 111. Уровень жизнеспособности миелокариоцитов до и после консервации (—196°) в растворе ЦОЛИПК-3 в зависимости от концентрации ПЭО (эозиновая проба):

1, 3, 4 — экспозиция клеток костного мозга до консервации с ПЭО-400, 2000 и 1000; *2, 5, 6* — после консервации с ПЭО-400, 2000 и 1000.

о чем свидетельствует интенсивность включения H^3-тимидина клетками после замораживания — оттаивания, что позволяет считать их способными к пролиферации (рис. 112).

Несмотря на то что все вышеуказанные методы позволяют судить о жизнеспособности клеток по их функциональной активности, прямых тестов, которые бы давали возможность (in vitro) судить о репопуляционной способности миелокариоцитов, пока нет. Это связано с отсутствием до настоящего времени морфологических тестов идентификации стволовых клеток. В последнее время показана пригодность метода клонирования для оценки жизнеспособности стволовых клеток консервированного костного мозга при облучении мышей летальными дозами. Изучение с помощью клонирования сохранности стволовых клеток миелоидной ткани, консервированных под защитой ПЭО-400, показало, что количество вновь образованных колоний клеток миелоидного характера в селезенке смертельно облученных мышей после введения реконсервированного костного мозга на 13—15-е сутки (6 колоний) существенно не отличается от такового после трансплантации свежего материала на 8—9-е сутки (9 колоний) (табл. 39).

Разность во времени появления колоний после трансплантации размороженных клеток гемопоэтической ткани объясняется, по всей видимости, стрессорным воздействием низких температур, после которого требуется определенный срок для восстановления всех функций клетки [516].

Исследование гистологических срезов селезенки, окрашенных гематоксилин-эозином, показало, что при трансплантации размороженных миелокариоцитов клеточный состав колоний приближается к структуре колоний после трансплантации нативного костного мозга.

Таблица 39

Сравнительная оценка репопуляционных свойств реконструированного и нативного костного мозга методом колонирования [73]

Дни опыта	Характер опыта	Средний вес селезенки смертельно облученных мышей			Среднее число колоний в селезенке облученных мышей		
		$M \pm m$	p_1	p_2	$M \pm m$	p_1	p_2
8—9-й	Облучение	11,2 ± 0,4	—	—	0,6 ± 0,4	—	—
13—15-й	Облучение + + нативный костный мозг	31,8 ± 0,4	0,001	—	9,5 ± 0,5	0,001	—
	Облучение + + реконсервированный костный мозг	33,7 ± 0,5	—	0,05	6,4 ± 0,2	0,1	0,05

Примечание. p_1 — вероятность случайности различий с показателями облученных животных; p_2 — вероятность случайности различий с показателями после трансплантации нативного костного мозга. Средние показатели ($M \pm m$) получены из 10 определений.

Однако суправитальное окрашивание эозином и метод колонирования кроветворной ткани свидетельствуют о некотором уменьшении количества жизнеспособных клеток по данным эозиновой пробы и процента сохранения родоначальных клеток, судя по интенсивности образования колоний в селезенке на 8—9-е сутки. В дальнейшем количество колоний возрастает, что можно объяснить тем, что дифференцированные клетки оказались более чувствительными к таким повреждающим факторам, как действие криопротектора и процесса замораживания — оттаивания.

Таким образом, установлено, что криопротектор ПЭО-400 в 15%-ной концентрации, применяемый при низкотемпературном (—196°) консервировании клеток костного мозга, дает возможность сохранить структуру и функциональную активность миелокариоцитов в течение одного года. Оптимальная экспозиция клеток костного мозга с ПЭО-400 перед замораживанием должна составлять 15—30 *мин*, а срок хранения размороженных миелокариоцитов при +4° не должен превышать 6 *ч*.

Глава VIII

ЗАМОРАЖИВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

ЗАМОРАЖИВАНИЕ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

Замораживание сперматозоидов. Проблеме замораживания сперматозоидов млекопитающих посвящено значительное число работ, поскольку длительное сохранение их структурно-функционального состояния при низких температурах имеет большое экономическое значение. В настоящее время значительное число голов молочного скота выращивается ежегодно в результате искусственного оплодотворения замороженным до низких температур семенем [74].

Первые попытки замораживания сперматозоидов относятся к 1776 г., однако успех в области низкотемпературного хранения спермиев в жизнеспособном состоянии был достигнут после использования в качестве защитного соединения глицерина. В результате такого консервирования бычьих сперматозоидов был получен хороший процент жизнеспособных подвижных клеток [642, 644]. Однако в дальнейшем анализ методов, обеспечивающих наиболее высокую плодовитость после замораживания и оттаивания, показал, что восприимчивость бычьего семени к замораживанию различна у разных животных и даже у одного и того же животного в различные периоды его жизнедеятельности.

В последнее время появились работы, в которых сообщается об успешном низкотемпературном замораживании семени в глицерине других млекопитающих — козлов и баранов [762]. При этом были получены вполне подвижные клетки, хотя плодовитость животных после искусственного оплодотворения таким материалом была довольно низкая [276]. Проводились также исследования на сперматозоидах лошадей, свиней, кроликов и рыб [642, 644, 757, 762]. О сохранении сперматозоидов человека в глицерине и их клиническом применении впервые было сообщено в 1953 г. Шерманом с соавторами [см. 567]. Отсутствие эффекта при искусственном осеменении некоторых животных (козлы, хряки, бараны) объясняется прежде всего недостаточными исследованиями по изучению механизмов биохимических повреждений и криозащиты спермиев при их низкотемпературной консервации. Чаще всего исследователи ограничиваются лишь морфологическим контролем эффекта замораживания спермиев и их способностью к движению. Тем не менее по своей биохимической структуре эта клетка — довольно сложное и вместе

с тем лабильное образование. Мембрана сперматозоидов большинства животных даже в присутствии криопротекторов может легко нарушаться, особенно ее липидные компоненты и поверхность, в которой локализованы важнейшие ферменты — АТФаза, фосфатаза, гиалуронидаза, обеспечивающие оплодотворяющую способность спермия. Большую роль в аспекте правильных подходов к разработке режимов замораживания и подбора криозащитных соединений помимо особенностей структуры и функции мембран играет состояние компонентов клеточного ядра — степень упаковки ДНП, его гидратация, количество воды и т. д. Другим возможным механизмом низкотемпературного повреждения может быть необратимая денатурация ключевых ферментов гликолиза и окислительно-восстановительных реакций на уровне электронотранспортной цепи и окислительного фосфорилирования в митохондриях. Например, было показано, что если хранить сперматозоиды человека либо животных в семенной жидкости или фруктозо-рингер-фосфатном растворе при температуре +5 или +37°, то при этих температурах уже через 24 ч хранения в среду медленно начинает диффундировать такой фермент, как цитохром С. Хранение спермиев в гипотонических растворах увеличивает выход из клеток в окружающую среду таких белков и ферментов, как дегидрогеназы, оксидазы, липопротеины. Позже было обнаружено, что замораживание суспензии спермиев при —10° способствует выходу гиалуронидазы в раствор. Как известно, гиалуронидаза спермия ассоциирована частично с экстрацеллюлярной мембраной, а также сосредоточена внутри спермия в лизосомах. Появление этого фермента в окружающей среде под влиянием замораживания может свидетельствовать о деструктивных изменениях как на поверхности мембраны, так и во внутриклеточных структурах и, в частности, в лизосомах [393]. Низкие температуры способствуют также элиминации АТФ из спермиев и его быстрому гидролизу [395, 396]. То, что низкие температуры повреждают мембраны спермиев, доказано также в опытах по изучению уровня липидов в окружающей среде. Показано, что после замораживания бычьей спермы в семенной жидкости (без криопротекторов) повышается содержание липидов с одновременным значительным уменьшением их количества в сперматозоидах. Однако липидные слои мембран спермиев различных животных, очевидно, отличаются как составом, так и прочностью связей. Это подтверждается исследованиями последствий низкотемпературного замораживания спермиев хряка и некоторых других животных. Разнообразные опыты с низкотемпературной консервацией сперматозоидов убеждают и в том, что ферменты спермы отличаются различной устойчивостью к замораживанию [639]. Например, при низкотемпературной консервации семени барана даже в присутствии глицерина сперматозоиды очень быстро подвергаются биохимическим изменениям, связанным с выходом из клеток в семенную жидкость таких ферментов, как кислая фосфатаза и ЛДГ (табл. 40).

Таблица 40

Активность некоторых форм кислой фосфатазы (КФ) и ЛДГ в семенной жидкости и сперматозоидах барана при замораживании — оттаивании [587]

Фермент	Условия опыта			
	Контроль 1	Контроль 2	Опыт 1	Опыт 2
КФ-1 (СЖ)	165 ± 10,3	161 ± 9,2	153 ± 16,9	147 ± 32,1
КФ-1 (СП)	35 ± 14,4	52 ± 24,4	32 ± 17,0	30 ± 11,7
КФ-2 (СЖ)	24 ± 16,1	19,9 ± 9,3	52 ± 11,9*	49 ± 18,2*
КФ-2 (СП)	71 ± 28,1	70 ± 22,6	37 ± 14,0*	31 ± 11,2*
ЛДГ 1 (СЖ)	84 ± 15,0	86 ± 13,8	81 ± 21,6	104 ± 52,6
ЛДГ-1 (СП)	61 ± 23,5	71 ± 25,6	65 ± 27,4	61 ± 19,6
ЛДГ-4 (СЖ)	58 ± 26,0	80 ± 21,9	76 ± 34,5	92 ± 43,4
ЛДГ-4 (СП)	15 ± 3,7	12 ± 5,6	12 ± 4,2	12 ± 6,5
ЛДГ-5 (СЖ)	77 ± 35,1	95 ± 13,2	109 ± 63,0	87 ± 44,1
ЛДГ-5 (СП)	89 ± 32,6	82 ± 23,5	87 ± 10,7	101 ± 20,1

* Различия между контролем и опытом $p < 0,05$.

Примечание. Контроль 1 — без замораживания и инкубации; контроль 2 — без замораживания, инкубация 1 ч при +38°. Опыт 1 — замораживание свежего материала по многоэтапной программе со следующими скоростями охлаждения: 1°/*мин* с +5 до —10°; 2°/*мин* с —10 до —18°; 4°/*мин* с —18 до —35° и 5°/*мин* с —35 до —70° без предварительной инкубации. Опыт 2 — такой же режим замораживания, как и в опыте 1, но с предварительной инкубацией (см. контроль 2). В качестве криопротектора использован глицерин в разведении 1 : 10 и яичный желток — цитратный раствор; СЖ — семенная жидкость, СП — спермин. Каждая средняя для величин кислой фосфатазы получена из 6 определений, для фракции ЛДГ — из 4.

При электрофорезе семенной жидкости либо спермиев в полиакриламидном геле, специально подготовленном для этой цели (см. схему на стр. 220), можно получить четыре фракции кислой фосфатазы, две из которых обладают высокой анодной подвижностью (КФ-I и КФ-II), причем КФ-II семенной жидкости имеет более выражен-

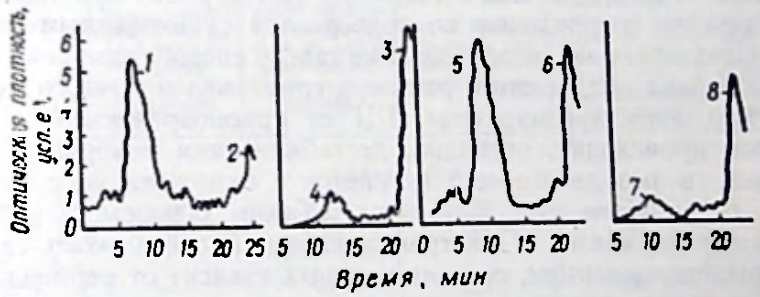


Рис. 113. Электрофоретические денситограммы фракций кислых фосфатаз I и II семенной жидкости барана в полиакриламидном геле [587]:

1 — кислая фосфатаза I семенной жидкости; *2* — кислая фосфатаза II семенной жидкости; *3* — кислая фосфатаза I спермиев; *4* — кислая фосфатаза II спермиев (до замораживания); *5* — кислая фосфатаза I семенной жидкости; *6* — кислая фосфатаза II семенной жидкости; *7* — кислая фосфатаза I спермиев; *8* — кислая фосфатаза II спермиев (после замораживания).

ную эстеразную активность (рис. 113). Две остальные (КФ-III и КФ-IV) фракции выявляются нечетко и непостоянно.

Выделение компонентов спермы для электрофоретического разделения ферментов в полиакриламидном геле

Разведение спермы

↓ Центрифугирование при 1100*g* — в течение 15 *мин* при +5°

Осадок ↓ — Супернатант: семенная жидкость и растворитель, анализ на фосфатазу, ЛДГ и ГОТ

↓ Ресуспендирование в растворе, содержащем 0,25 М сахарозы и 1 *мкмоль* ЭДТА

↓ Центрифугирование при 1100*g* — в течение 15 *мин* при +5°

Осадок ↓ — Супернатант отбрасывают

Ресуспендирование в растворе, содержащем 0,25 М сахарозы и 1 *мкмоль* ЭДТА

↓ Отстаивание 2 *мин*

↓ Центрифугирование при 1110*g* — в течение 15 *мин* при +5°

Осадок отбрасывается — Супернатант: выделение ферментов из сперматозоидов для определения в них фосфатаз, ЛДГ и ГОТ

При исследовании ЛДГ таким методом можно получить семь форм изоэнзимов, из которых наибольшую активность проявляют $ЛДГ_1$, потом $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$.

Как видно из табл. 40, при замораживании — оттаивании семенной жидкости барана резко увеличивается активность кислой фосфатазы в семенной жидкости за счет выхода фермента из спермиев, о чем свидетельствует достоверное снижение уровня фермента в клетках ($p < 0{,}05$).

Со стороны изоэнзимов ЛДГ можно также наблюдать тенденцию повышения активности $ЛДГ_1$, $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$ в семенной жидкости, в то время как в спермиях этот фермент при указанном выше режиме охлаждения не подвергался существенным изменениям. Следовательно, использование такого способа замораживания спермы барана под защитой раствора глицерина и яичного желтка более или менее предохраняет ЛДГ от криоповреждения. Однако при этом происходит, очевидно, дестабилизация мембран лизосом спермиев, в результате чего из клеток в окружающую среду выходят гидролитические ферменты. Таким образом, нарастание активности ферментов в экстрацеллюлярной среде тесно связано с их криоповреждением, степень которых зависит от периода эквилибрации, типа криопротектора и режима скорости замораживания. В качестве примера в этом отношении можно привести данные по исследованию активности ГОТ, ЛДГ, щелочной и кислой фосфатазы, а также ГПТ в семенной жидкости быков, баранов, индюков и других животных [321] в зависимости от типа криопротекторов (7%-ный 1,3-пропандиол, глицерин, этиленгликоль, ДМСО) и некоторых стабилизирующих веществ (табл. 41, 42).

Таблица 41

Уровень ферментативной активности в экстрацеллюлярной среде как показатель внутриклеточных повреждений бычьих сперматозоидов в зависимости от различного эквилибрационного периода и скорости замораживания [321]

Фермент	Определение непосредственно после взятия материала		Определение после 13 ч эквилибрации при +5°		
	перед замораживанием (минимальные повреждения)	после замораживания от +37° до —196° (максимальные повреждения)	эквилибрация при +5° без замораживания	замораживание со скоростью 80° в минуту (максимальные повреждения)	замораживание со скоростью 18° в минуту (минимальные повреждения)
ГОТ	146	198	178	337	193
ЛДГ	352	508	476	508	464
Кислая фосфатаза	387	414	387	349	380
Щелочная фосфатаза	152	158	135	116	123

Примечание. Разведение проб 1 : 1 в трис-буфере, содержащем 12,5% яичного желтка и 7% глицерина. Активность ГОТ и ЛДГ выражена в *м. е.* (1 *м. е.* — величина, катализирующая превращение 1 *ммоль* субстрата в 1 *мин* на 10⁸ сперматозоидов). Активность фосфатаз выражена в единицах Кинг — Армстронга. Одна единица соответствует величине, которая гидролизует двунатриевый фенилфосфат с образованием 1 *мг* фенола.

Таблица 42

Влияние замораживания на интенсивность выхода ферментов в экстрацеллюлярную среду из спермиев быка и барана как показатель степени их повреждения

Фермент	Без глицерина и яичного желтка		Добавление 7% глицерина и 12,5% яичного желтка после 4-часовой эквилибрации при +5°		
	перед замораживанием после фильтрации (минимальные повреждения)	после замораживания от +37 до —196° (максимальные повреждения)	перед замораживанием (минимальные повреждения)	замораживание от +3 до —196° со скоростью 680° в минуту (максимальные повреждения)	замораживание от +5 до —196° со скоростью 18° в минуту (медленное замораживание)
Сперма быка					
ГОТ	141	343	126	170	148
ЛДГ	360	570	348	494	390
Кислая фосфатаза	—	—	357	352	363
Щелочная фосфатаза	300	370	248	284	274
Сперма барана					
ГОТ	14	95	25	92	37
ЛДГ	71	258	128	403	229

Как видно из табл. 42, различные условия замораживания в присутствии одного и того же защитного раствора по-разному влияют на выход ферментов из клеток в среду инкубации. Погружение проб в жидкий азот вызывает заметное элиминирование ГОТ, ЛДГ и кислой фосфатазы в окружающую среду. Этот процесс особенно для ГОТ еще более усиливается после 13- часового выдерживания спермы при 5° и сверхбыстрого замораживания.

Медленное замораживание действует более мягко, повышая лишь несколько уровень активности ЛДГ в среде, в то время как

Таблица 43

Активность ЛДГ и ГОТ в экстрацеллюлярной среде спермы индюков при различных скоростях замораживания и защитных веществ [321]

Криопротектор	Перед замораживанием после фильтрации (минимальные повреждения)		После замораживания от +5 до —196° со скоростью 680° в минуту (максимальные повреждения)				После замораживания от +5 до —196° со скоростью 15° в минуту (медленное замораживание)			
	ГОТ,	ЛДГ,	ГОТ,	ЛДГ,	разница между ГОТ, и ГОТ,	разница между ЛДГ, и ЛДГ,	ГОТ,	ЛДГ,	разница между ГОТ, и ГОТ,	разница между ЛДГ, и ЛДГ,
7%-ный 1,3-пропандиол	635	750	1140	1280	505	530	965	1000	330	250
7%-ный этиленгликоль	466	1090	1030	1320	564	230	790	1200	324	110
7%-ный ДМСО	255	1010	975	1200	720	190	735	1160	480	150

остальные энзимологические параметры значительно не изменяются. Необходимо отметить, что время эквилибрации клеток с криопротекторами играет существенную роль в сохранении ферментов внутри спермиев быка и барана. Из табл. 42 видно, что сокращение времени эквилибрации с комбинированным криопротектором дает хорошую сохранность ферментов, особенно при более медленном замораживании. Полученные данные указывают также на то, что спермии барана менее резистентны к замораживанию, чем такие же клетки быка.

При сравнительном анализе эффективности различных криопротекторов и других защитных веществ оказалось, что лучший эффект на сохранность молекулярных форм ГОТ ($ГОТ_1$ и $ГОТ_2$) в спермиях индюка оказывают некоторые буферные системы в смеси с пропандиолом. Среди криопротекторов лучшим действием обладали 7%-ный 1,3-пропандиол и 7%-ный этиленгликоль (табл. 43). Аналогичные данные были получены и при исследовании активности изоэнзимов ЛДГ. Однако при использовании других крио-

протекторов выяснилось, что добавление в среду 1,3-пропандиола, ДМСО и особенно этиленгликоля обеспечивает надежную защиту такого фермента, как ЛДГ, от криоповреждений.

Изучение активации кислой фосфатазы в сперме индюков показало, что при быстром замораживании (680° в минуту) лучший эффект дает добавление трис-буфера и раффинозы с криопротектором

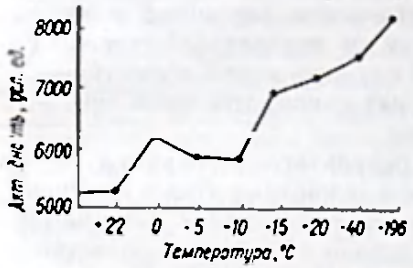


Рис. 114. Активность кислой фосфатазы в сперме индюка после охлаждения различными температурами [321].

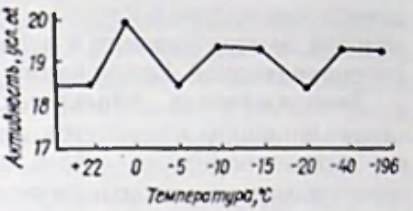


Рис. 115. Активность щелочной фосфатазы в сперме индюка после охлаждения до различных температур в присутствии раффинозы, взвешенной в 7%-ном растворе пропандиола [321].

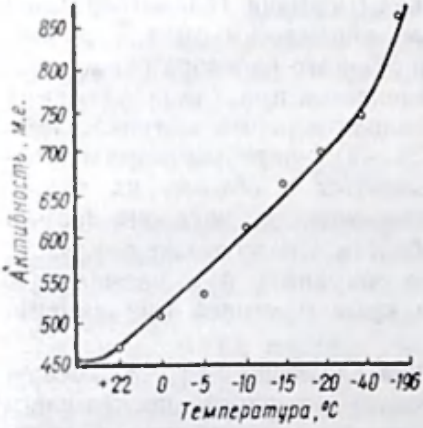


Рис. 116. Активность ГОТ в сперме индюка после охлаждения до различных температур [321].

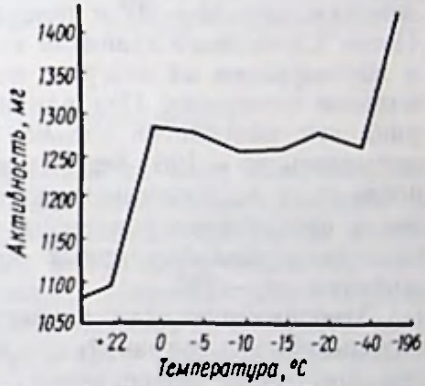


Рис. 117. Активность ЛДГ в сперме индюка после охлаждения до различных температур [321].

ДМСО. При медленном замораживании хороший эффект оказывают буферные растворы в смеси с пропандиолом, а из криопротекторов — 7%-ный этиленгликоль. В случае щелочной фосфатазы быстрое замораживание оказалось эффективным при добавлении в среду пропандиола, а при медленном — эффективными оказались все три криопротектора. Вместе с тем из всех изученных ферментов наиболее устойчива к низким температурам щелочная фосфатаза спермы индюка, активность которой при понижении температуры изменяется незначительно по сравнению с ЛДГ, ГОТ и кислой фосфатазой (рис. 114—117). Эти данные довольно четко демонстрируют,

насколько важным при низкотемпературном консервировании спермы различных животных являются скорость замораживания, индивидуальный подбор криопротекторов в зависимости от режимов охлаждения, время эквилибрации для обеспечения максимальной сохранности таких важнейших ферментов и их субъединиц, как ЛДГ, фосфатазы, ГОТ и др. [рис. 117].

Таким образом, исследование активности ферментов в экстрацеллюлярной среде может быть одним из показателей степени повреждения половых клеток, а также служить мерой эффективности методов замораживания и используемых криопротекторов при низкотемпературном консервации спермы.

Замораживание яйцеклеток. В результате экспериментов по замораживанию яйцеклеток различных животных было выяснено, что оплодотворенные яйцеклетки более устойчивы к низким температурам, чем неоплодотворенные. Однако яйцеклетки большинства видов животных ни в интактном, ни в оплодотворенном состоянии не переносят замораживания даже до —76° при отсутствии защитных агентов. Более того, некоторые виды яйцеклеток (например, кроликов и мышей) погибают при замораживании даже в присутствии глицерина, поскольку они непроницаемы для него [759, 762]. В более глубоких исследованиях Шермана [733—735] было установлено, что неоплодотворенные яйцеклетки мышей можно замораживать до —20° в присутствии 5%-ного раствора глицерина. После 3,5-часового хранения этих яйцеклеток при таких условиях и последующем их отогреве после оплодотворения получали нормальное потомство. Под влиянием 20—30%-ного раствора глицерина эти яйцеклетки сильно уменьшаются в объеме, их можно охлаждать до —196° без видимых повреждений, хотя они теряют после этого репродукционную способность. Было также показано, что в присутствии глицерина можно сохранять функциональную активность фолликулярных ооцитов крыс и мышей при замораживании до —79°.

Замораживание ткани яичника и яичка. Согласно современным данным, способность сохранять специфическую активность после низкотемпературной консервации зависит во многом от величины консервируемой ткани и степени проникновения в нее криопротектора. При консервировании в 15%-ном растворе глицерина 1/3 яичника крысы обнаружена очень низкая жизнеспособность ткани [94, 95]. Когда же яичник измельчали, что повышало его проницаемость для глицерина, то последующее медленное замораживание таких кусочков давало высокий процент жизнеспособности при недельном сроке хранения. Однако такой материал, замороженный до —79° в глицерине и сохраняющийся в течение 10 дней при таких температурах, очень быстро терял активность и жизнеспособность. Хранение ткани яичников при —190° под защитой глицерина в течение года не снижает их биологических свойств [95, 615]. Если кусочки яичника замораживали до —79° без глицерина, но в среде сыворотки крови, то через 9 дней с момента хра-

нения они полностью оказывались жизнеспособными. При снижении температуры проб до —196° они погибали уже через час. Паркес и Смит [614, 755] всесторонне исследовали влияние различных меняющихся концентраций глицерина, разнообразных сроков эквилибрации ткани с криопротектором до и после замораживания, а также скоростей охлаждения. Наилучшие результаты были получены при использовании 15—25%-ного раствора глицерина в сыворотке крови крысы при pH 6,8 и при предварительной эквилибрации ткани яичника в течение 5—15 *мин* при комнатной температуре и последующем медленном охлаждении со скоростью 1—2° *мин*. В качестве защитных агентов исследовались также пропилен, этилен, диэтилен, гликоли. Однако они оказались менее эффективными, чем глицерин. Такие глицеринизированные замороженные трансплантаты после их пересадки мышам образовывали ткань яичника, которая оплодотворялась и давала нормальное потомство [94, 95].

Ткань яичка, очевидно, может быть с успехом заморожена под защитой 15%-ного глицерина, поскольку после этого они проявляют андрогенную активность. В пересаженной кастрированным крысам ткани через 12 недель образуется промежуточная ткань и семявыводящие канальцы, содержащие сперматогонии и первичные сперматоциты. Однако такая ткань не способна продуцировать живые сперматозоиды, которые могли бы оплодотворить яйцеклетку, поскольку трансплантаты были лишены семявыводящих протоков [74, 95, 642, 644].

ЗАМОРАЖИВАНИЕ ЭНДОКРИННЫХ ЖЕЛЕЗ

Надпочечник. В предварительных опытах было показано, что клетки коркового слоя надпочечников после замораживания до —79° под защитой глицерина не обнаруживают признаков жизнеспособности и не дают роста клеток в культуре ткани [94, 95]. Однако в других работах [615] описаны успешные результаты по замораживанию коркового слоя надпочечников в присутствии 15%-ного раствора глицерина. О трех успешных автотрансплантациях надпочечников после их замораживания в жидком азоте без каких-либо защитных сред сообщал Франксон с соавторами [цит. по 567]. Опыты проводились таким образом, что у животного удаляли один из надпочечников, замораживали его до —79° и хранили в жидком воздухе несколько дней, а затем размораживали при комнатной температуре в течение 1—2 *ч* и имплантировали его в портняжную мышцу бедра, предварительно удалив второй надпочечник. Функционирование трансплантата определяли путем изучения экскреции мочой суммарных 17-кетостероидов, а в некоторых случаях 17-кортикостероидов и катехоламинов в крови. Подобные исследования в дальнейшем, очевидно, не проводились, поэтому трудно сделать окончательные выводы по данному вопросу. Несколько позже Лоше [цит. по 567] отмечал успешное замораживание цельных надпочечников крысы в присутствии 30%-ного раствора глицерина,

которые хранились при —10, —80° и при —196° в течение 24 ч. Такие трансплантаты по сравнению с контрольными даже лучше приживлялись, реакция тканевого ложа и реципиента на них была гораздо меньше, а процессы регенерации протекали быстрее. Результаты, полученные на тканях, хранившихся при —10°, были несколько хуже, чем на тканях, выдержанных при более низких температурах.

Щитовидная железа. Имеются сообщения об успешной пересадке щитовидной железы после замораживания до —79° в присутствии 15%-ного глицерина [94, 95]. Материалы по данному вопросу представлены в книге Смита [95].

КОНСЕРВИРОВАНИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ И ОПОРНЫХ ТКАНЕЙ

Консервирование кожи. Кожа является наиболее подходящей тканью, которая сравнительно легко может быть подвергнута низкотемпературному замораживанию с сохранением ее свойств. О сохранении жизнеспособности свежей кожи, замороженной без каких-либо защитных веществ, сообщалось уже в 1939 г. [цит. по 567]. Эпителий кожи хорошо сохранялся как при быстром, так и при медленном замораживании до —76°и последующем быстром оттаивании. Однако суспензии изолированных эпителиальных клеток кожи переносят низкие температуры значительно хуже и никогда не удается сохранить их выживаемость без использования криопротекторов. Трансплантаты цельной кожи, как и клеточные суспензии, хорошо переносят быстрое и медленное замораживание после предварительной их обработки 15%-ным глицерином. В этом отношении известны работы Тейлора [803] и его сотрудников, которые показали, что наиболее высокой чувствительностью к действию низких температур в эпителиальных клетках обладают меланофоры, которые могут служить довольно специфичным тестом повреждения эпителиальных клеток при замораживании. Для получения более детальной информации получали культуру эпителиальных клеток, после чего подвергали их частичной дегидратации до 60% первоначального веса. В таких случаях отмечался некоторый защитный эффект, даже без применения криопротекторов. Более устойчивый и высокий эффект был достигнут при низкотемпературном хранении кожи, когда использовался сочетанный метод частичной дегидратации и предварительной обработки 30%-ным этиленгликолем или глицерином.

В других опытах было показано, что местное замораживание кожи до —20° сохраняет ее трансплантационные свойства, поскольку пересаженная в другое место кожной поверхности одного и того же животного она, как правило, приживается. В экспериментальных условиях пересаживали гомотрансплантаты кожи, консервированные при —196 и —269° в различных буферных средах без криопротекторов. При этом сроки и характер отторжения не зависят от состава среды, однако по сравнению с контролем замо-

роженные таким образом гомотрансплантаты дольше удерживаются на поверхности раны, что способствует лучшей регенерации раневой поверхности. Принципиальной разницы в поведении кожных трансплантатов, консервированных при —196 и —269°, не обнаружено [66].

С целью изучения длительности приживления полнослойных кожных гомотрансплантатов и определения их качественной характеристики последние замораживали до температуры —79, —196 или —269° под защитой 10%-ного раствора ДМСО с экви-

Таблица 44

Содержание пировиноградной и молочной кислот в консервированной коже человека в процессе ее замораживания [38]

Срок хранения, месяцы	Пировиноградная кислота			Молочная кислота		
	без защитных средств	с 15%-ным глицерином	с предварительным обезвоживанием	без защитных средств	с 15%-ным глицерином	с предварительным частичным обезвоживанием
0,5	3,5±0,2	3,1±0,2	3,3±0,1	87,7±5,5	98,5±7,6	106,7±5,3
1	5,2±0,1	6,1±0,2	5,5±0,2	88,6±3,8	104,9±11,2	78,5±4,6
1,5	7,9±0,2	5,3±0,2	6,0±0,6	95,0±3,0	109,1±6,3	90,2±4,6
2	7,6±0,6	6,9±0,2	6,7±0,2	124,0±6,3	131,4±12,3	106,8±3,5
3	6,9±0,2	12,4±0,8	7,3±0,3	118,8±3,7	122,3±7,9	122,3±7,9
4	6,6±0,4	11,6±0,6	6,9±0,6	112,9±3,7	121,7±5,7	149,4±7,1
5	6,2±0,2	13,2±0,3	8,6±0,7	114,6±13,0	118,4±9,6	132,9±11,0
6—7	6,6±0,4	15,6±1,6	16,8±1,2	111,6±3.5	127,9±4,8	120,9±7,0

Примечание. Содержание пировиноградной и молочной кислот в неконсервированной коже (контроль) составляло соответственно 4,6±0,2 и 91,2±2,9 (в *мг*/100 *мг* сухой ткани).

либрацией в течение 30 *мин*. После пересадки таких трансплантатов животному существенной разницы в их приживлении по сравнению с контролем не было обнаружено [3].

Изучение динамики некоторых показателей углеводного обмена в коже человека, консервируемой при —20 —25°, показало, что в процессе хранения кожных лоскутов при этой температуре, независимо от характера предварительной обработки ткани, количество гликогена и глюкозы уменьшается, а пировиноградной и молочной кислот увеличивается, что свидетельствует о достаточной выраженности гликолитических процессов в изолированных образцах замороженной кожи (табл. 44).

Количество АТФ в кожных лоскутах при различных методах консервирования в процессе хранения уменьшается, а содержание неорганического фосфора увеличивается, хотя параллелизм между этими показателями энергетического обмена удается выявить не на всех этапах хранения.

При месячном сроке хранения определяется достоверное повышение количественного содержания АТФ во всех группах образцов

кожи, связанное, по-видимому, с превалированием на ранних этапах консервирования синтеза АТФ (табл. 45).

Следовательно, предварительное частичное обезвоживание кожи оказывает определенное криофилактическое действие [803], о чем свидетельствуют данные вышеуказанных биохимических исследований [38]. Этот метод является, очевидно, также и фактором, тормозящим процессы метаболизма, а также расходование изолированной тканью энергоресурсов, что позволяет удлинить сроки эффективного консервирования кожи при относительно небольшом понижении температуры (—20 — 25°).

Таблица 45

Содержание АТФ и неорганического фосфора в консервированной коже человека в процессе ее замораживания [38]

Срок хранения, месяцы	АТФ			Неорганический фосфор		
	без защитных средств	с 15%-ным глицерином	с предварительным частичным обезвоживанием	без защитных средств	с 15%-ным глицерином	с предварительным частичным обезвоживанием
0,5	2,20±0,62	2,57±0,25	2,99±0,25	0,87±0,18	0,97±0,20	1,10±0,16
1	2,93±0,24	3,02±0,19	3,55±0,19	1,28±0,18	1,07±0,22	1,32±0,16
1	1,76±0,33	2,46±0,14	3,18±0,29	1,86±0,21	1,54±0,12	1,45±0,08
2	1,87±0,09	2,29±0,22	2,97±0,25	1,80±0,20	1,26±0,20	1,47±0,24
3	1,96±0,19	2,02±0,28	2,42±0,24	1,48±0,24	1,73±0,18	1,76±0,23
4	2,19±0,12	1,93±0,19	1,79±0,22	1,50±0,09	1,54±0,26	2,36±0,22
5	2,02±0,15	1,97±0,49	1,74±0,26	1,67±0,18	1,68±0,24	2,61±0,36
6—7	2,11±0,17	1,80±0,16	1,26±0,29	1,61±0,18	1,49±0,16	2,80±0,22

Примечание. Содержание АТФ и неорганического фосфора в неконсервированной коже (контроль) составляло соответственно 3,98±0,26 (в мг Р/100 мг сухой ткани).

Если кожу замораживать до —25, —30, —40, —50 и —70° в растворах Хенкса или дипразин-глицериновом растворе, то лучшие результаты можно получить при хранении ее в течение 150 дней при —40 —50°. При таком способе консервирования хорошо сохраняется активность сукцинатдегидрогеназы [65], что свидетельствует о сохранности свойств клеток кожи после деконсервации. Таким образом, исследование биохимических показателей консервируемой кожи позволяет получить наиболее объективную информацию о состоянии тканей и эффективности используемых методов консервирования.

Замораживание роговицы. В настоящее время трансплантация роговицы широко используется в клинике. Для низкотемпературной консервации используют в качестве трансплантатов слои роговицы либо цельный материал. Для этого используются различные способы консервации. Получены хорошие результаты консервирования отдельных слоев роговицы путем обычного высушивания в низкотемпературном вакууме, а также в средах, содержащих

15%-ный раствор глицерина с последующим обезвоживанием в условиях вакуума. Со временем отказались от обезвоживания и замораживания и было предложено хранить слоистые трансплантаты, помещая их в концентрированный глицерин в дезэксикатор с низким давлением паров при комнатной температуре [367, 833].

При замораживании цельного трансплантата роговицы возникает ряд дополнительных моментов, которые предстоит решать при выборе метода охлаждения. Дело в том, что в таких трансплантатах имеется эндотелиальный слой, который весьма чувствителен к низким температурам, но он должен сохранять жизнеспособность после реконсервации, ибо в противном случае роговица не будет приживляться. С этой целью было предложено пропитывать все ткани глаза 15%-ным глицерином в течение часа перед замораживанием. Однако такой способ консервирования не всегда давал хорошие результаты, поэтому в дальнейшем было обращено внимание на скорость замораживания и способ хранения роговицы [776]. Лучшие результаты были получены при консервировании цельных трансплантатов роговицы кролика, когда соблюдали следующие условия: до замораживания передняя камера глаза орошалась 7,5%-ным ДМСО, водные среды глаза заменяли этим же криопротектором, а затем консервируемые целые глаза помещали в ампулы с 10%-ным раствором глицерина и подвергали медленному двухэтапному замораживанию. Такой метод позволил получить жизнеспособный прозрачный трансплантат, который с успехом применялся в клинике [759, 762].

Криоконсервирование кости. Применение криобиологических методов для консервации кости [1, 10, 20, 32, 48, 49] основано на особом морфологическом строении костной ткани.

В отличие от многих тканей и систем органов, имеющих большое количество клеток, кость состоит из сравнительно небольшого числа живых клеток, сосредоточенных в основном в периосте, и содержит большое количество межклеточного вещества, которое можно рассматривать как более инертную субстанцию [338, 355, 356]. Значительное место в литературе на протяжении последнего полувека занимала дискуссия относительно способности или неспособности клеток выживать в трансплантатах кости при действии низких температур. Еще в 1893 г. Барс [цит. по 338] высказал мнение, что все элементы костных ауто- и гомотрансплантатов при их пересадке отмирают и впоследствии замещаются новой костной тканью реципиента [676, 841, 842]. Другая группа ученых на протяжении нескольких последних десятилетий была убеждена в возможности выживания клеток пересаженной кости и всесторонне исследовала ту роль, которую играют эти выжившие клетки в приживлении имплантата кости [338].

В настоящее время многие исследователи придерживаются в основном несколько измененной гипотезы Аксгаузена. Они признают, что большинство клеток всех пересаженных костных трансплантатов отмирает, хотя при определенных условиях некоторые

специфические элементы свежих аутотрансплантатов (поверхностные клетки, клетки эндоста, периоста и костного мозга) остаются жизнеспособными вплоть до реваскуляризации пересаженного трансплантата. Эти клетки могут сыграть определенную роль в установлении связей между ложем реципиента и донорским трансплантатом [111, 135, 136, 196, 197, 425, 426].

По своей природе межклеточное вещество кости ограничивает клеточное питание таких клеток, как, например, остеоциты, которые обеспечивают свою жизнедеятельность путем диффузии. Поэтому считаю, что если вскоре после пересадки кости не будет восстановлено достаточное ее кровоснабжение, то большинство или все клетки ауто- или гомотрансплантата погибнут [141, 142].

Согласно мнению большинства авторов, остеоциты свежих гомотрансплантатов подвергаются некрозу спустя некоторое время после трансплантации [203, 386]. Клетки замороженных и лиофилизированных низкими температурами гомотрансплантатов также считают нежизнеспособными после их имплантации [203].

Имеются лишь некоторые разногласия по вопросу влияния кратко- и долговременного хранения в условиях холодильника на жизнеспособность костных клеток [199, 625, 814, 842, 843]. Считается, что трансплантат не обязательно должен содержать клетки в жизнеспособном состоянии, для того чтобы стимулировать восстановительные процессы в ложе реципиента [386, 843].

Некоторые авторы полагают, что как гомо-,так и аутотрансплантаты при определенных условиях сохраняют способность стимулировать остеогенез в зоне пересаженного ложа [843]. Гомотрансплантаты, фиксированные в спирте, якобы также обладают такой способностью [386]. Однако в других работах не было установлено никакой связи между стимулированием остеогенеза и выживанием остеоцитов [202, 203]. Предполагают, что сохранение жизнеспособности остеоцитов в гомотрансплантате может способствовать сохранению высокого уровня в нем антигенов, которые обусловливают тканевую несовместимость. В результате пересадки такого гомотрансплантата значительно усиливается пролиферативная реакция, что способствует подавлению восстановительной остеогенной активности материнского ложа. Иммунологические особенности консервированных гомотрансплантатов до настоящего времени представляют большой интерес. В некоторых работах показано, что свежие костные гомотрансплантаты способны иммунизировать организм реципиента, в результате чего повышается процент отторжения пересаженных имплантатов [203]. Эти данные также согласуются с предыдущими сообщениями, касающимися механизмов отторжения кожных гомотрансплантатов [161, 162, 312]. Считают, что такая способность к иммунизации связана именно с жизнеспособностью клеток, сохранивших активность после деконсервации трансплантата. Было установлено, например, что если из подвздошной кости удалить костный мозг, то она теряет свои антигенные свойства [194]. Не исключено, что некоторые субклеточные

частицы, низкомолекулярные белки, гликопротеины, РНП обладают способностью вызывать иммунную реакцию [548]. Замораживание и низкотемпературная лиофилизация разрушают, по-видимому, эти субклеточные частицы и макромолекулы, а также подавляют жизнеспособность клеток в образцах пересаживаемой кости, уменьшая, таким образом, способность консервированной кости иммунизировать окружающие ее ткани. Этим самым сохраняется их жизнеспособность, что играет большую роль при трансплантации [202, 388, 389]. Эти взгляды в настоящее время поддерживает большинство исследователей. Согласно Хаят [389], ценность трансплантата при гомопересадках можно повысить именно путем разрушения жизнеспособных клеток трансплантата низкотемпературной консервацией. Так что подобного рода методы хранения и консервации при низких температурах в действительности имеют также иммунологическое значение.

Таким образом, большие усилия в применении криобиологических методов для консервации кости в настоящее время направлены не столько на сохранение клеток, сколько на сохранение клеток костного мозга в иммунологически инертной для организма форме.

Некоторые английские и американские специалисты считают, что не всякие формы пересаженных гомотрансплантатов обладают способностью активно вызывать образование кости со стороны материнского ложа реципиента. Эти исследователи полагают, что любой костный трансплантат служит главным образом пассивным материалом, вдоль которого может расти вновь образованная кость [745]. Для определения этого свойства в зарубежной литературе применяют термин «анатомический шаблон», понимая под этим то, что пересаженный трансплантат представляет образец, которым «руководствуются» врастающие ткани при реваскуляризации и последующем образовании новой ткани. В конце концов в идеальных случаях происходит полное замещение гомотрансплантата тканями организма в соответствии с анатомической формой исходного имплантата [388, 389].

При изучении результатов пересадки свежих гомо- и аутотрансплантатов, замороженных, автоклавированных, декальцинированных, облученных, лиофилизированных либо депротеинизированных гомотрансплантатов, было обнаружено, что все эти виды пересаженного материала, судя по данным гистологического исследования, приживлялись одинаково. Подобные данные были опубликованы ранее и подтверждены на клиническом материале [140—142, 202, 203, 525].

В результате дискуссии о значении жизнеспособности трансплантата было установлено, что некоторые из эндостальных, периостеальных и периваскулярных клеток могут выживать, размножаться и действительно принимать участие в гистологическом приживлении трансплантата [549].

Функция консервированного костного трансплантата несколько иная. Она заключается в том, что при этом не происходит разраста-

ния его собственного клеточного вещества, как у настоящего трансплантата, а скорее он оказывает пассивную помощь материнскому ложу реципиента в образовании кости, выступая в качестве естественной «решетки» или так называемой внутренней шины. Следовательно, в соответствии с этим здесь можно применить, по-видимому, термин «имплантат». Одним из важных свойств консервированных костных имплантатов является их способность активно либо пассивно активировать остеогенные процессы при заживлении дефекта кости, а также оказывать механическую поддержку заживающему участку кости. Такие эксплантаты должны обладать также способностью рассасываться с определенной скоростью и быстро замещаться вновь образованной костной тканью реципиента [141, 142, 388, 389].

Ценность любого костного трансплантата, как известно, окончательно определяется по клиническому приживлению. Оно основано на гистологической реакции организма, которая в свою очередь может во многом зависеть от иммунологических способностей трансплантата [743, 744].

ЗАМОРАЖИВАНИЕ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ РЫБ

Мышечная ткань рыб в противоположность этой же ткани других животных очень быстро денатурируется при повышении скорости замораживания и длительности хранения. На рис. 118 показана

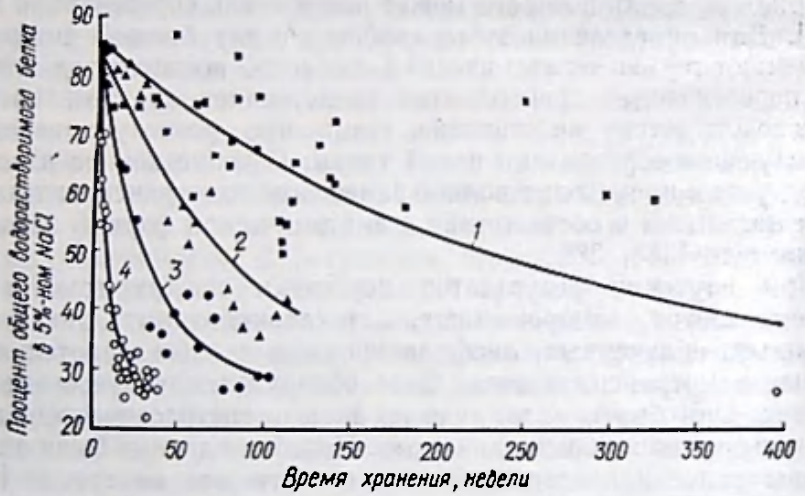


Рис. 118. Кривые денатурации белков мышцы трески при замораживании и различном времени хранения [487]:
1 — при —29°; *2* — при —24°; *3* — при —20°, *4* — при — 14°.

скорость денатурации мышцы трески при различных температурах замораживания и хранения. Эти кривые получены путем построения зависимости логарифмов скоростей реакции от температур хранения с помощью так называемого метода измерения «хрупкости»

клетки и метода определения растворимости белка. Показателем скорости реакции при этом является время, необходимое для того, чтобы оптическая плотность либо растворимость белка в 5%-ном NaCl уменьшилась вдвое (рис. 119). Измерение степени «хрупкости» клетки и растворимости актомиозина в принципе дает очень близко совпадающие кривые, однако на самом деле эти два метода отображают совершенно разные механизмы криоповреждений, и они отличаются при изучении тех же показателей у других рыб [488]. Считают, что хранение при —40° может обеспечить 50% денатурации мышечной ткани трески только после 45-летнего хранения.

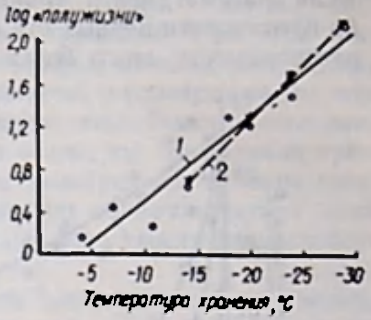


Рис. 19. Логарифмы скорости денатурации мышцы трески в зависимости от температуры [487]:
1 — вычисленной по методу хрупкости клеток; *2* — по солюбилизации белка.

Ниже приведены данные денатурации актомиозина в зависимости от различных температур у разных видов рыб. Видно, что актомиозин таких рыб, как треска и камбала, очень чувствителен к низким температурам. Палтус, морская собака и пикша занимают в этом отношении промежуточное положение. Свойства филе этих рыб сохраняются при —14 —18°. Значительной устойчивостью к низкотемпературному хранению обладают актомиозины некоторых сортов балтийской сельди и морского окуня, выдерживающие более глубокое охлаждение до температуры —20 —29°.

	Температура, °С
Балтийская сельдь	—20
Треска	—4, —6, —12
Палтус	—12, —14, —18
Морская собака	—14
Пикша	—14
Белая рыба	—14
Морской окунь	—12, —29
Камбала	—1, —3, —12, —14, —15, —17, —18

Изучение биологических изменений, наблюдаемых в мышце трески при замораживании, показало, что стандартное отклонение показателя растворимости белка при охлаждении и оттаивании увеличивается до ±6,0 против ±0,68 в контроле [486].

На рис. 120 показаны кривые денатурации белка трески с наибольшим количеством экспериментальных точек. Видно, что денатурационные процессы могут происходить в довольно широкой зоне произвольных изменений. Кроме того, отмечено несколько точек на кривых денатурации, когда замораживание проводилось при —24 и —29°. Исключением является кривая денатурации, полученная при —29°, т. е. при более низких температурах

хранения. Видно, что она плавно понижается от начала хранения и подчиняется такому же соотношению, которое показано на рис. 118. Эта плавность объясняется тем, что определение растворимости актомиозина проводилось после хранения на протяжении 8 лет. Если рассматривать точки измерения денатурации актомиозина на протяжении первых ста недель, то никаких признаков снижения растворимости этого белка наблюдаться не будет.

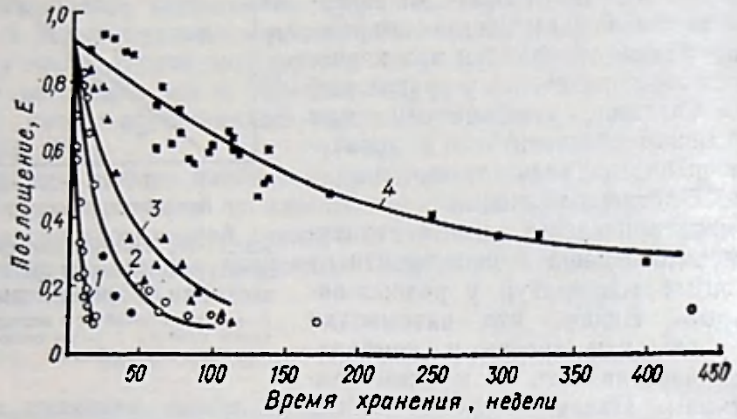


Рис. 120. Характер денатурации мышцы трески при замораживании и различном времени хранения [491]:
1 — при —14°; *2* — при —20°; *3* — при —24°; *4* — при —29°.

Следует отметить, что скорость денатурации белков мышц различных видов рыб неодинакова. При исследовании очищенных экстрактов миозина из разных рыб выше точки их замерзания методом ультрацентрифугирования была обнаружена различная степень стабильности миозина по степени их седиментации.

Ниже приведена скорость седиментации различных растворов миозина рыб [491].

Вид рыб, из которых получен миозин	$K \cdot 10^5$ в 1 *сек*	Вид рыб, из которых получен миозин	$K \cdot 10^5$ в 1 *сек*
Пикша	0,23	Камбала	0,11
Треска	0,20	Палтус	0,07
Акула	0,19	Сельдь	0,03

Из приведенных данных видно, что пикша очень стабильна к действию низких температур, и денатурация ее белка идет более медленно, чем, например, камбалы или трески. В то же время изолированный миозин пикши наименее стабилен из всех исследуемых белков подобной природы [488, 489].

Для решения целого ряда технологических вопросов низкотемпературного замораживания и особенно хранения рыбы изменения в показателях растворимости актомиозина мышц играют решающую роль, поскольку от этого зависит качество филе, т. е. имеется определенное графическое соотношение между денатурацией и вре-

менем хранения, что оценивается с помощью так называемой вкусовой распределительной панели [265, 267, 268]. Установлено, что при —10° между оценкой (классом) на распределительной панели и растворимостью белка существует указанная выше корреляция определенных показателей, однако хранение при —20 и —30° не дает подобных коррелятивных взаимоотношений. При этих температурах вязкость, определяемая с помощью панели, возрастает, хотя растворимость белка не уменьшается, несмотря на то что треска или морской окунь хранилась свыше года. Более точные данные в этом отношении свидетельствуют о том, что актомиозин трески при температуре —23 или —29° не изменяется в течение года; признаки ухудшения его качества начинают обнаруживаться лишь через 1,5 года, а к двум годам наступают уже заметные изменения [484, 486].

Таким образом, изучение процессов денатурации актомиозина в мышце трески свидетельствует о том, что в этом отношении имеется значительный разброс данных, зависящий в основном от двух факторов: а) времени хранения рыбы и б) исходного ее состояния. В настоящее время имеются доказательства того, что на скорость денатурации белка влияет упитанность рыбы. Этим, очевидно, и объясняются необычайные данные денатурации мышцы рыбы, полученные при температуре —23°.

Влияние повышения концентрации электролитов на денатурацию актомиозина. Изменения, происходящие в белке мышцы при ее низкотемпературном хранении,—это результат действия солевых растворов тканей, концентрация которых сильно возрастает при вымораживании воды из тканей [600]. Одним из доказательств справедливости этих предположений были опыты с изолированным актомиозином, денатурация которого наступала при достижении критической концентрации хлористого натрия в растворе (8—10% при 1,4—1,7 М). При этом терялась характерная студенистая структура белка и выделялось большое количество жидкости. Белок мышцы скумбрии подвергается денатурации уже через неделю после хранения при 0°, будучи погруженной в 7—9%-ный солевой раствор. При выдерживании мышцы при температуре —1, —3° происходит еще большая денатурация, чем при 0°, т. е. при хранении в незамороженном состоянии.

Актомиозин различных видов рыб, очевидно, по-разному реагирует на повышение концентрации солей. Если, например, белок мышцы трески денатурирует в присутствии 8—10%-ного раствора, то для денатурации актомиозина филе балтийской сельди уже достаточно 3%-ного либо даже 1,7%-ного солевого раствора [473, 474, 602, 603]. Более того, филе этой рыбы, опущенное в 10%-ный раствор NaCl на 1 *мин*, вызывает очень быструю денатурацию актомиозина, если в последующем его заморозить и хранить при —20°. Наоборот, актомиозин значительно лучше сохраняется, если его после погружения в солевой раствор не подвергать замораживанию.

Все эти эксперименты свидетельствуют о том, что скорость денатурации связана с изменением концентрации солей в замороженной ткани. При температурах, близких к точке плавления ткани, соотношение вымораживаемой в ней воды резко уменьшается. При —2° из мышцы трески вымораживается 52,4% воды, а при —1° — всего лишь 8%. Соответственно этому уменьшается концентрация солей в ткани, поэтому при увеличении скорости реакции и повышении температуры скорость денатурации начинает снова падать. Отмечается такая точка температуры, выше которой скорость денатурации уже повышается, поскольку в тканях снижается концентрация соли.

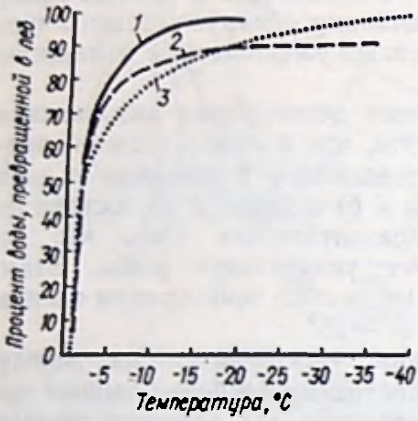


Рис. 121. Кривые динамики формирования льда в мышце трески при различных температурах по данным различных авторов [580]:

1 — для трески [491]; *2* — для говядины [640]; *3* — для говядины, свинины и баранины [580].

О существовании максимальной температуры денатурации было известно еще в 1933 г. [668]. В диапазоне температур от 0 до —20° денатурация белка мышцы пикши протекает с максимальной скоростью — от —2 до —4°. Область этих температур является, очевидно, универсальный для проявления процессов денатурации, поскольку актомиозин различных животных, в том числе большинства рыб, максимально быстро теряет свои свойства в интервале температур от —2 до —3° либо от —2 до —5° [287, 580]. Белок мышцы трески, замороженной вначале до —30°, значительно скорее денатурируется в интервале температур —1 и —2° [489]. Следовательно, как фактор повреждения в данном случае является не только вымораживание воды, но и непосредственно низкая температура, которая также вызывает денатурацию. Вместе с тем белок переохлажденной мышцы трески при —1,5° либо мясо при —2° не повреждается. Наблюдаемое визуально повреждение структуры и функции мышечных волокон лягушки при замораживании сопровождается вместе с тем сохранением своих свойств, если мышцу сохранить переохлажденной даже до —15°. Подобного рода наблюдения были проведены на микроорганизмах. Переохлаждение, например, *E. coli*, более опасно, чем их замораживание. Установлено также, что включение J^{131} в ткань щитовидной железы морской свинки при ее замораживании от —3 до —5° происходит очень медленно и значительно активируется, если ткань железы переохладить до —8°.

Таким образом, переохлаждение мышцы рыбы позволяет сохранить ее структурно-функциональную целостность даже при субнулевых температурах, которые в обычных условиях вызывают резкие

денатурационные изменения, ведущие к потере пищевой ценности рыбы.

Влияние структуры льда на скорость денатурации мышцы. Поскольку различные скорости замораживания приводят к возникновению разных типов кристаллов льда, они могут определенным образом влиять и на денатурацию мышцы (рис. 121, 122). Проведенные в этом направлении исследования весьма противоречивы и еще трудно сделать окончательный вывод о влиянии скорости замораживания на денатурационные процессы, происходящие в белке мышцы. Первоначальное мнение исследователей сводилось главным образом к тому, что рыбу следует замораживать по возможности быстрее, поскольку при этом якобы значительно уменьшается денатурация белка мышц таких рыб, как треска, балтийская сельдь, поскольку при быстром замораживании мышца проходит через критическую температуру, вызывающую максимальную денатурацию [601, 640]. Однако со временем начали накапливаться другие факты. Морфологически было установлено, что количество выделяемых из клетки белков и ядерных фрагментов возрастает с увеличением скорости замораживания мяса (рис. 123). Белки мышечных клеток трески, быстро замороженные в пропане при температуре —183°, всегда были хуже растворимы в 5%-ном растворе NaCl после оттаивания, чем белки контрольных проб, замороженных медленно до такой же температуры (рис. 124) [491]. Аналогичные данные были получены при изучении повреждений митохондрий печени мыши. С увеличением скорости замораживания число разрушенных митохондрий срезов печени толщиной 1 *мм* все больше возрастает и достигает максимума при —175°, о чем свидетельствовали электронномикроскопические исследования и изменения активности дегидрогеназы глутаминовой кислоты [см. 491].

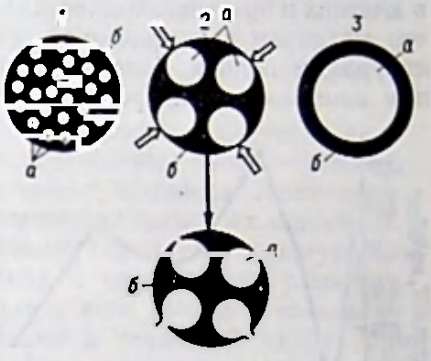


Рис. 122. Поперечные срезы мышцы трески и характер повреждений при замораживании [491]:

а — белки; *б* — лед; *1* — охлаждение в течение 15 *мин* при 0° и —5°; маленькие кристаллы льда распределены довольно равномерно в клетке; *2* — охлаждение ткани в течение 25 *мин* при 0° и —5°; лед лежит около поверхности клеток. Стрелками отмечены ослабленные области клеточной мембраны. Во время замораживания в этих областях происходит разрыв (нижний рисунок); *3* — замораживание ткани в течение 60 *мин* при 0° и —5°. Образуется единственный кристалл льда, который окружен толстым слоем клеточной оболочки, препятствующей растягиванию клетки.

Кривая *4* на рис. 120 свидетельствует о том, что хранение филе трески, замороженной с различной первоначальной скоростью при —29°, приводит к различной степени денатурации. Однако этот процесс очень медленно прогрессирует и через год его не удается обнаружить методом определения растворимости белка.

В ряде других экспериментов показано, что существенных различий в денатурации белков мышцы трески, замороженных с любой скоростью и сохраняемых при температуре —29° в течение 1,5 года, не имеется. Они начинают выявляться лишь после двух лет хранения. Структура льда при такой температуре обычно представлена одним большим кристаллом льда, расположенным до середины каждой клетки, причем ее стенки при этом не повреждаются. Данные по денатурации белков подтверждаются также рядом коррелятивных наблюдений (рис. 123) при сравнении концентрации ДНК в клетках и при гистохимических исследованиях. Следует отметить, что механизм специфической денатурации белков мышц рыбы при замораживании разработан

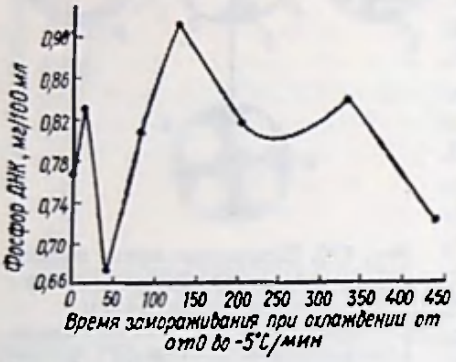


Рис. 123. Динамика изменения ДНК мышцы трески, замороженной с различной скоростью [486].

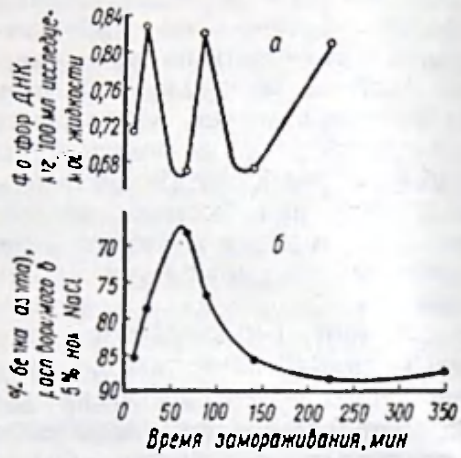


Рис. 124. Изменение концентрации ДНК в мышце трески при —29° (*а*) и динамика растворимости белка мышцы трески при —29° (*б*) [491].

Скорость охлаждения от —0 до —5° в минуту

еще недостаточно, и в этом отношении существует несколько предварительных гипотез, объясняющих динамику денатурации [149—151, 489—491].

Одна из гипотез замораживания допускает быстрое развитие в центре клетки (рис. 125) одного кристалла льда, который прогрессивно увеличивается по мере продвижения по направлению к периферии. При этом чистая вода вымораживается, а растворенное вещество клетки, постепенно концентрируясь, образует активную жидкость, которая двигается впереди фронта льда к периферическому концу волокна. Эта жидкость включает в свой состав органические вещества низкого молекулярного веса, такие как сахара, нуклеотиды, различные соли и гелеобразные белковые соединения, образуя смесь с низкой эвтектической температурой, так что часть жидкости остается незамороженной даже при —29°. Вместе с тем эта активная жидкость обладает агрессивным действием по отношению к актомиозину, вызывает его денатурацию, происходящую при определенных температурах. Вполне вероятно, что денату-

рация на «периферическом конце» клетки довольно быстро завершается, поскольку усиление денатурации при критической скорости замораживания не сохраняется в дальнейшем в течение последующего периода хранения при такой температуре.

Согласно другой гипотезе, в процессе замораживания в разбавленных солевых растворах денатурируются отдельно актин и миозин, которые затем, рекомбинируясь, образуют «новый» актомиозин в клетке. Согласно третьему допущению, денатурация белков мышц происходит в результате разрушения лизосом, которые, высвобождая гидролитические ферменты, способствуют усилению денатурационных процессов в клетке за счет активизации специфических ферментов, способных разрушить те или иные компоненты биомембран.

Сейчас трудно высказать окончательное мнение о значении каждого из этих факторов повреждения в приведенных выше гипотезах, однако многие считают, что все три имеют право на существование, хотя и требуют дальнейших экспериментальных исследований.

Роль липидов в денатурации белков. Скорость денатурации белков различных рыб, замороженных в одинаковых условиях, неодинакова. Например, замороженная пикша лучше и дольше сохраняется, чем треска. При хранении в течение 7 недель при —12° в мышце трески количество экстрагируемого актомиозина уменьшается до 20%, в то время как для осуществления таких же процессов в мышце белокорого палтуса требуется 60 недель. Значительно медленнее, чем белки мышцы трески, денатурируются белки камбалы, ерша, окуня и некоторых других видов рыб [265, 746—748, 807].

С чем связаны различия в скорости денатурации белков рыб? Одна из первых теорий в этом отношении предполагала наличие связи между содержанием липида в рыбе и относительной стабильностью актомиозина. Было отмечено, например, что белки трески, которые содержат более низкое количество липида в мышце, денатурируются быстрее, чем, скажем, белки камбалы или окуня. Поэтому предположили, что липид либо определенная его часть, либо продукт его разрушения оказывает стабилизирующее действие на актомиозин. Аналогичные наблюдения были проведены не только над белками трески, камбалы и окуня, но и над другими видами рыб. Например, белок мышцы такой нежирной рыбы, как *Saurida tumbil*, денатурирует значительно быстрее при низкотемпературном хранении, чем белок *Seriola qunqueradiata*, которая содержит до 10% липида [265, 269, 746, 748]. В дальнейшем выяснилось, что хотя общее содержание липида играет определенную роль в стабилизации белка мышцы, он является не единственным фактором стабилизации, тем более, как было установлено, пикша и треска, которые отмечаются устойчивостью белка, содержат почти одинаковое количество липида.

На следующем этапе исследований было обращено внимание на механизм образования и роль свободных жирных кислот в денату-

рационных изменениях, претерпеваемых мышцами рыб в процессе низкотемпературной консервации. Как известно, длинноцепочечные жирные кислоты присутствуют в мышце рыбы большей частью в комплексе с другими веществами, образовывая эфиры глицерина (так называемые глицериды) либо сложные молекулы, содержащие фосфатные или другие группы (фосфолипиды). Мышца нежирной рыбы, такой как пикша, содержит примерно 0,5% липидного материала, главным образом фосфолипида, в то время как мышца жирной рыбы, такой, как сельдь, акула и другие, содержат до 20% либо более жирных кислот в основном в форме глицеридов.

Несмотря на то что в организме животного почти все жирные кислоты находятся в связанном состоянии, некоторая часть их обнаруживается в виде свободных жирных кислот. Например, липиды мышцы только что убитой трески содержат 1—2% свободных жирных кислот и их количество повышается с увеличением срока после забоя благодаря ферментативному и, возможно, неферментативному гидролизу липидов. Низкая температура также способствует повышению уровня свободных жирных кислот в замороженных мышцах рыбы, очевидно, в результате ферментативного расщепления фосфолипидов.



Рис. 126. Образование свободных жирных кислот из липидов мышцы трески [611]: *1* — при —140°; *2* — при —22°; *3* — при —29°.

На рис. 126 показана динамика накопления свободных жирных кислот в замороженной мышце трески при трех различных температурах. Обращает на себя внимание значительное сходство этих кривых с кривыми денатурации белка, что может свидетельствовать о связи темпов гидролиза липидов с денатурационными изменениями в белках. Подобного рода изменения в количестве свободных жирных кислот были обнаружены в ряде рыб (камбале, белокором палтусе), однако их нельзя было выявить при исследовании некоторых видов красной рыбы. В дальнейшем было показано, что окисленные липиды действительно играют большую роль в денатурации белков рыбы, однако эти показатели характеризуются значительным разнообразием по отношению к различным видам рыб [266, 267, 604].

В частности, было показано, что, несмотря на отсутствие прогрессирующей денатурации белков мышцы трески, сохраняемой при температуре — 23° на протяжении 70 недель, количество свободных жирных кислот в такой мышце продолжало нарастать. Скорость образования этих кислот в мышце, выраженная в виде процентного количества экстрагируемого липида при —12°, возрастает у следующих видов рыб в таком порядке: красная рыба,

белокорый палтус, камбала, треска. Однако подобная последовательность при изучении денатурации белка в теле этих рыб при низкотемпературном хранении сохраняется не всегда. Исследуя высвобождение свободных жирных кислот и денатурацию белка при различных температурах в мышце рыб с разным содержанием липидов, удалось показать, что скорость денатурации возрастает в таком порядке: красная рыба (*Pleuronectes microcephalus*), белокорый палтус, акула и треска. Однако эти наблюдения не согласуются с уровнем свободных жирных кислот и содержанием липидов в теле этих рыб. Таким образом, на первоначальном этапе исследований возникли противоречия, которые требовали дальнейших более глубоких исследований. В связи с этим был проведен ряд опытов in vitro, в которых было показано, что растворы актомиозина трески быстро денатурируются при постоянном pH после добавления к ним эмульсии чистых жирных кислот в концентрациях, которые обычно возникают в полностью денатурированной мышце трески. Добавление жирных кислот к белкам мышцы вызывает их денатурацию как до, так и после гомогенизации материала. В связи с этим был сделан вывод, что в мышечной ткани рыбы денатурация белков происходит не в процессе хранения, а в момент их экстрагирования [119, 428—430]. В то же время результаты, полученные методом определения «хрупкости» клеток и других методик, показали, что денатурация белков происходит также и при их низкотемпературном хранении. Поэтому процесс денатурации белков мышечной ткани рыбы может происходить как при длительном низкотемпературном хранении, так и в процессе низкотемпературного их экстрагирования. Чувствительность белков мышц различных видов рыб при добавлении к ним жирных кислот характеризуется значительным отличием. При добавлении свободных жирных кислот к белкам рыб с различным содержанием жиров в их теле растворимость белков не изменяется до тех пор, пока не будет достигнут некий критический уровень свободных жирных кислот. По достижении этого уровня денатурация очень быстро прогрессирует уже при незначительном увеличении концентрации этих кислот. Очевидно, это и является причиной развития периода задержки денатурации, наблюдаемой на кривых в опытах с замороженными мышцами рыб.

Было выяснено, что первоначальное «плато» будет более коротким в случае денатурации белков мышцы трески или других видов тощих рыб, т. е. для деструкции белков у этих рыб требуется более низкая концентрация свободных жирных кислот. Следовательно, имеется определенная зависимость между денатурацией белков, содержанием липидов в теле рыб и уровнем свободных жирных кислот, появляющаяся в процессе низкотемпературного хранения рыбы [119]. Важным является то, что чем выше первоначальное содержание нейтральных липидов в теле рыбы, тем большее количество жирной кислоты необходимо добавить, чтобы вызвать денатурацию белков. Следовательно, нейтральные липиды защищают

белки от денатурации, поглощая часть свободных жирных кислот, высвободившуюся при низкотемпературном хранении мышечной ткани. Растворимость белка в треске, выдерживаемой на льду в незамороженном состоянии, с течением времени устойчиво уменьшается. Считают, что выдерживание филе рыбы на льду способствует медленной бактериальной и ферментативной денатурации белков. Поэтому выдержанная на льду лежалая рыба при замораживании подвергается незначительным изменениям, поскольку предварительная денатурация вызывает такие изменения в белке, после которых белок оказывается совершенно нечувствительным к действию различных модифицирующих агентов, в том числе и низких температур.

Таким образом, нами рассмотрено два фактора, которые независимо друг от друга ответственны за процессы денатурации белков мышц рыбы. Это прежде всего солевые растворы тканей, сконцентрированные в результате образования льда, а также ферментативное либо неферментативное высвобождение свободных жирных кислот. Рассмотрим, какой вклад вносит в процесс денатурации каждый из этих факторов.

Актомиозин в мышцах очень легко денатурирует при погружении их в раствор поваренной соли. Вместе с тем изолированный актомиозин, выделенный из ткани, весьма устойчив к действию даже очень сильных растворов NaCl. Это свидетельствует о том, что в обычных условиях в тканях сам по себе этот фактор (концентрированные растворы солей) не способен самостоятельно вызвать денатурацию и, очевидно, для этого требуются какие-то дополнительные причины, такие как, например, появление в ткани свободных жирных кислот. Последние могут высвобождаться из фосфолипидов под действием фермента фосфолипазы, локализованного, очевидно, в мышце рыбы [397, 611]. Если это происходит действительно так, то скорее всего концентрированные растворы солей влияют дестабилизирующим образом на лизосомы, способствуя высвобождению соответствующего фермента при замораживании. Действительно, установлено, что активность деглицеринизаткиназы мембран эритроцитов возрастает в три раза после их замораживания и оттаивания [374]. Это приводит к тому, что мембраны клетки становятся более проницаемы, в результате чего фермент имеет лучший доступ к мембранным образованиям, таким, как, например, лизосомы. Считают также, что замораживание само по себе способствует «концентрации» липолитических и других ферментов либо обеспечивает благоприятную среду для их активности.

Согласно современным представлениям, механизмы повреждения как по принципу «концентрации», так и «освобождения» каких-либо активных ферментов вполне реальны. Следовательно, денатурация актомиозина мышечной ткани на холоде обусловлена в основном действием свободных жирных кислот, освобождаемых из тканей концентрированными солевыми растворами. Однако пока очень мало известно, является ли эта система денатурации единст-

венной либо существуют и другие факторы (например, изменения ионного состава консервирующей смеси). Предполагают, что роль свободных жирных кислот в денатурации белка весьма преувеличена, поскольку в некоторых опытах удаление липидов и соответствующих ферментов из мышечной ткани креветок не изменяет процесс низкотемпературной деградации белков. Поэтому в этом отношении необходимы более глубокие исследования.

Изменения энергетических соединений, ферментов и pH. В замороженной мышечной ткани происходит ряд биохимических изменений. Например, уже при температуре от —5° до —8° в мышце сазана снижается количество миозинмонофосфата, образованного из АТФ, который гидролизуется до инозина, а затем гипоксантина. При температурах —14, —20 и —30° количество АТФ в тканях на протяжении двух недель увеличивается в результате активизации гликолитического цикла. По истечении этого срока хранение при —14° приводит к снижению уровня АТФ. Падение содержания макроэргов в мышце при более низких температурах (—20, —30°) происходит несколько позже — через 14—15 недель. Концентрация ДПН при температуре —14° снижается на протяжении первых 15 недель, а уровень инозинмонофосфата возрастает. При более низких температурах содержание инозина постепенно продолжает увеличиваться на протяжении 62 недель. Содержание гипоксантина и гуанина значительно возрастает при —14°, однако при —20° и —30° этого не наблюдается [397, 704]. Хотя при низких температурах скорость биохимических реакций постепенно снижается, некоторые ферменты могут сохранять свою активность. Определенной устойчивостью к действию низких температур обладает гликолитический цикл клеток, поскольку при температуре —5° можно наблюдать отчетливо выраженное накопление молочной кислоты в мышце лягушки, которое затем снижается при —10°. Очевидно, различные животные по-разному реагируют на понижение температуры. В мышечной ткани терпуга образование молочной кислоты продолжается вплоть до —20°, а в некоторых случаях до —30°.

При низких температурах происходит также ферментативное разрушение белков. При исследовании свободного тирозина в замороженной печени овцы, поросенка, крупного рогатого скота и лошадей было обнаружено, что наиболее интенсивное разрушение белка печени наблюдается при температуре —4 —5°. Через 8 недель при этой температуре в 1 *г* печени лошади образовывалось 100 *мг* свободного тирозина, в печени овцы — 380 *мг*. Такие же процессы через 8 недель происходят частично при —20° [454]. Описано также разрушение при низких температурах белков мышцы цыпленка [404]. Такие ферменты, как липаза, трипсин и инвертаза, активизируются именно при низких температурах, причем скорость гидролиза субстрата экспоненциально увеличивается согласно уравнению Аррениуса. В точке плавления с низкой энергией активации обычно наблюдается характерное нарушение этого

соотношения при температуре выше точки плавления. При высоких энергиях активации это соотношение нарушается ниже точки плавления. В противоположность этому активность АТФазы мышцы в процессе ее замораживания и низкотемпературного хранения постепенно снижается. Поскольку ферментом, разрушающим АТФ в неработающей мышце, является миозин, то одним из обстоятельств, обусловливающих появление нерастворимого структурного белка мышцы рыбы при хранении на холоде, является снижение активности АТФазы.

Таким образом, криоденатурация актомиозина происходит с различной скоростью. В период, когда актомиозин становится почти полностью нерастворимым, сохраняется примерно половина активности АТФазы, т. е. молекула белка денатурирует дозированно [226]. Изменение свойств миозина как фермента считается в настоящее время достоверным признаком денатурации белков мышцы при низкотемпературном хранении, поскольку оно свидетельствует о необратимом нарушении конфигурации полипептидной цепи. При низких температурах данный фермент проявляет стабильность. Например, в течение трех месяцев при —18° в мышце лина активность этого фермента не изменяется, а при —3,5° в течение такого же периода функциональная активность его исчезает.

Другим представителем ферментов мышц рыбы, устойчивых при низких температурах, является сукцинатоксидаза. При температуре —29° активность этого фермента не изменяется, в то время как при —7° он является крайне лабильным. Активность сукцинатоксидазы и сукцинатдегидрогеназы печени мыши после замораживания и оттаивания также значительно снижается [320, 824]. Однако большинство других ферментов относительно стабильны при низких температурах. К ним относится глюкозо-6-фосфатаза и другие ферменты, катализирующие гликолитические реакции в клетках мышцы, которые сохраняют при низких температурах 22—70% активности [205].

При низких температурах в мышечной ткани повышается активность одного из ферментов, гидролизирующих липиды до свободных жирных кислот — фосфолипазы. Ее активность быстро повышается в замороженной ткани вблизи точки плавления, в то время как в пределах 0° действие фермента почти не проявляется. Считают, что причиной такого парадоксального изменения является, очевидно, концентрация субстрата либо возникновение благоприятной среды для активности ферментов под влиянием повышенной концентрации солей. Необходимо также отметить, что если даже фермент сам по себе устойчив при низких температурах, то может разрушаться его «подложка» либо нарушаться его синтез. Значительную роль в этих процессах играют также лизосомы. В процессе замораживания освобождается ряд гидролитических ферментов, содержащихся в субклеточных образованиях, которые повышают свою активность после оттаивания. Подобным образом увеличивается активность такого внутримитохондриального фермента, как глутаматдегидро-

геназа, за счет криогенного повреждения митохондрий. Известно также, что активность гомогената надпочечной железы крысы в осуществлении синтеза кортикостерона из его предшественников усиливается в лабораторных условиях в результате замораживания [337].

Денатурационные изменения белков мышц рыбы во много зависят также от изменения pH среды. В результате успешного модифицирования pH-метра [1] для низкотемпературных изменений стала возможной регистрация pH вплоть до —30° в растворах и до —20° в замороженных гомогенатах. Установлено, что в мышце pH уменьшается от 5,9 при 0° до 5,6 при —3°. Если температуру среды повысить, то pH тканей увеличивается примерно до 6,0. В мышцах различных животных, сохраняемых при —10 и —18° (треска, пикша), pH уменьшается с 6,5 до 6,2, а затем после 160 дней хранения плавно повышается до 6,7. Считают, что изменения pH, происходящие непосредственно при замораживании, являются частично результатом повышения концентрации белка в жидкой фазе. Изменения pH мышц при длительном хранении могут быть следствием изменения буферных свойств белка в результате его денатурации [149, 151, 860, 861].

ЗАМОРАЖИВАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ДРУГИХ ТКАНЕЙ

Эмбриональная ткань. Впервые замораживание эмбриональных тканей проводилось Гонзалесом и соавторами [см. 567], которые сообщили о восстановлении функции сердца эмбриона цыпленка, которое замораживали с высокой скоростью в жидком азоте после частичной предварительной дегидратации с помощью 30%-ного этиленгликоля. В других опытах после аналогичного замораживания кусочков сердца эмбрионов и последующего отогрева они сохраняли жизнеспособность, о чем свидетельствовал их рост в культуре ткани. Проводились эксперименты по замораживанию эмбрионов цыпленка под защитой различных концентраций глицерина, причем были получены более положительные результаты при медленном замораживании по сравнению со сверхбыстрым замораживанием в сочетании с быстрым оттаиванием. Однако при медленном оттаивании успех не был достигнут [673, 674].

Исследовалось влияние низких температур также и на других эмбриональных тканях — мышцах, коже, костях, нервных стволах, хорионе и др. Установлено, что кусочек мышцы можно быстро заморозить до —18° без каких-либо криопротекторов и получить затем рост в культуре ткани. Однако дальнейшее снижение температуры вызывало летальные изменения в волокнах. Использование 5%-ного или 10%-ного раствора глицерина обеспечивало восстановление

[1] В 1960 г. Ван ден Берг [149] использовал полиспирты в качестве буфера, добавляя их к насыщенному раствору KCl. Стеклянные электроды были заменены каломельными.

функции волокон мышцы лишь тогда, когда они промораживались до —50° и хранились всего несколько дней при таких температурах. Сохраняют свою жизнеспособность и указанные выше ткани при замораживании их под защитой 10—15%-ного глицерина. Например, замораживание хрящевых зачатков костей 6-дневного цыпленка до —79° в 15%-ном растворе глицерина позволяет получить их полноценный рост в культуре ткани. Однако оказалось, что костная ткань более взрослых эмбрионов восприимчивей к действию холода, что, очевидно, связано с плохим проникновением криопротектора в клетки матрицы кости, которые, будучи не защищенными, погибают при низких температурах. Действительно, если клетки отделить от матрицы и обработать глицерином, то после реконсервации рост их в культуре ткани продолжается [516, 517, 759, 762].

Нервная ткань. Среди сообщений о замораживании тканей нервной системы имеются данные, что охлаждение шейного ганглия с преганглионарным нервом при отсутствии защитных веществ может быть успешным при понижении температуры не более чем до —10° в течение 5 *мин*. Если температуру этой ткани понизить до —15°, то наступают необратимые изменения с последующей потерей всех специфических функций (рис. 127). Однако если ганглии и нерв предварительно декапсулировать и медленно замораживать до —79° в присутствии 15%-ного раствора глицерина и сбалансированного солевого раствора Кребса, то благодаря хорошему проникновению глицерина в декапсулированные ткани они после размораживания восстанавливают свою функцию [см. 567].

Гладкие мышцы. Исследована возможность низкотемпературного хранения гладких мышц, выделенных из матки, тонкого и толстого кишечника морских свинок под защитой ДМСО, глицерина, диметилацетамида и диметилформамида. Установлено, что замораживание и оттаивание с применением указанных выше криопротекторов не повреждает внутриклеточные сократительные механизмы, однако оказывает воздействие на проницаемость мембраны клеток, о чем свидетельствует повышенное проникновение Ca^{2+} внутрь клетки, сопровождающееся усилением беспрерывных сократительных актов [762, 763].

Мышца сердца. Замораживание мышцы сердца кролика в присутствии 10%-ного ДМСО или 15%-ного раствора глицерина способствует значительной элиминации K^+ и повышению содержания Na^+ в реконсервированной мышце. Причем глицерин сам по себе вызывает большие потери K^+ из ткани желудочков, чем процесс замораживания [см. 567].

Замораживание клеток в культуре тканей. Сохранение структурно-функциональной целостности клеток в культуре тканей при низких температурах широко известно [627].

Успешное замораживание клеток млекопитающих в культуре тканей в присутствии глицерина впервые было осуществлено Шерером

в 1954 г. [цит. по 567]. Для длительного хранения культуральных клеток были использованы медленное замораживание (1—2° в минуту) и 5%-ный либо 20%-ный раствор глицерина с последующим хранением при температуре —196°. Лучшие результаты можно получить, если после реконсервации культуральные клетки погружать в растворы глицерина с постепенным понижением концентрации. Весьма эффективным для замораживания клеток культур тканей оказался также ДСМО, который обеспечивает защиту многих линий клеток. В результате всесторонней морфологической (включение красителей, скорость роста, цитология, способность к образованию опухолей), биохимической (изменение функции и структуры генетического аппарата клеток, способность синтезировать ферменты) и иммунологической (антигенный состав, восприимчивость к вирусам) оценки удалось наиболее результативно разработать эффективные способы замораживания клеток культуры тканей, что позволило создать к 1964 г. в США запасы замороженных клеточных культур, содержащие коллекции наиболее ценных клеточных линий. В результате проведенных исследований было установлено, что при длительном хранении клеток в жидком азоте происходят некоторые изменения на уровне генетического аппарата клеток [634], что выражается, в частности, в изменении активности пяти изоэнзимов ЛДГ в клеточной линии Н почки обезьяны уже через 6 недель хранения в жидком азоте. При хранении других клеток в жидком азоте также наблюдаются изменения в активности изоферментов ЛДГ через несколько месяцев. Имеются также сообщения, что отдельные клеточные линии после нескольких лет хранения при азотных температурах теряли способность к росту после их реконсервации. Причины и природа этого явления в настоящее время не ясны и требуют дальнейших исследований.

Низкотемпературное хранение клеток опухолей. О пересадке жизнеспособных опухолевых трансплантатов после многолетнего их хранения при различных низких температурах без криопротекторов сообщали многие авторы [см. 567]. Создается впечатление, что клетки опухолей отличаются от обычных клеток некоторой резистентностью по отношению к действию низких температур, поскольку, по данным некоторых авторов, замораживание этих клеток в присутствии лишь отдельных моносахаров и при выборе оптимальных режимов замораживания дает довольно высокий процент их выживания.

Хотя этот вопрос полностью не решен и мы мало знаем о криочувствительности опухолевых клеток, уже сейчас признают, что лишь некоторые из этих клеток выживают при низких температурах, и этого достаточно, чтобы при трансплантации вызвать развитие опухоли. Конечно, на способность клеток опухоли к приживлению в значительной степени влияет скорость замораживания. Однако и в этом отношении существуют самые противоречивые данные. Например, в некоторых опытах на клетках мышей установлено, что лучшие результаты по выживаемости лейкемических кле-

ток получены после медленного замораживания в отличие от быстрого. По данным Моргана и соавторов (цит. по [567]), клетки асцитных опухолей, лимфосаркомы 6С3HED$_3$ и рака молочной железы, замороженные в 20%-ном растворе глицерина, теряют свою специфичность и при пересадке не дают характерных штаммов.

Иммунологическая реактивность клеток и тканей. Имеется много данных, свидетельствующих о том, что после низкотемпературного замораживания различных биологических объектов заметно снижается их антигенная активность при трансплантации реципиентам. Примеры такого снижения реактивности можно найти в различных разделах настоящей книги. Заметное снижение реакции тканевого ложа реципиента наблюдалось, например, после трансплантации соединительной ткани, замороженной в 30%-ном растворе глицерина при умеренно быстрых скоростях до —196°, клетки которой проявляли бо́льшую пролиферативную активность, чем контрольные. Снижение иммунологической реакции гомотрансплантатов замороженной в глицерине кожи происходит в том случае, если ее хранить именно при температуре —65°, но не при —79° или при —196°. Вместе с тем эти наблюдения оставляют открытым вопрос, являются ли изменения антигенной специфичности следствием низкотемпературного замораживания — оттаивания либо они обусловлены контактом с концентрированными растворами криопротекторов. Существует также предположение о том, что при таких условиях воздействия на ткань происходят определенные нарушения в функции центрального генетического аппарата клеток, изменяющих характер метаболизма белков. Однако эти вопросы до настоящего времени остаются открытыми и требуют исследований в аспекте изучения механизма этого явления.

Низкотемпературное замораживание субклеточных органелл различных клеток. Успешное низкотемпературное замораживание митохондрий печени крысы было осуществлено при медленных скоростях замораживания под защитой 10%-ного глицерина или ДМСО [330, 331]. Хорошие результаты низкотемпературной консервации изолированных митохондрий печени крыс были получены при использовании глицерина (быстрое замораживание до —196°) и ПЭО-400 при медленном двухэтапном режиме замораживания (первый этап —замораживание до —15—18°, второй этап— быстрое погружение в жидкий азот) [8, 9]. Этот способ был также использован для охлаждения хлоропластов в опытах in vitro Хебера с сотрудниками [358].

Анализируя данные литературы о замораживании суспензий различных клеток и их низкотемпературном хранении, можно сделать вывод, что эти процедуры имеют успех в том случае, если используются такие криозащитные соединения, как глицерин и ДМСО. Следует подчеркнуть, что удовлетворительные исходы низкотемпературной консервации во многом зависят от того, проникает ли внутрь клетки криопротектор. Кроме того, создается впечатление, что медленное замораживание клеток со скоростью

1° в минуту в присутствии криопротекторов является более рациональным, чем быстрое (за исключением эритроцитов и в некоторых случаях сперматозоидов). Плохая переносимость большинством животных клеток быстрых скоростей замораживания объясняется прежде всего образованием внутриклеточного льда, особенно если проницаемость мембран для воды понижена. Исключительное положение эритроцита в этом отношении объясняется именно высокой проницаемостью мембраны и сравнительно небольшими размерами, что обеспечивает его сопротивляемость к более высоким скоростям замораживания.

Глава IX

СОХРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И ВИРУСОВ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Проблема сохранения микроорганизмов замораживанием менее сложна, чем, скажем, проблема глубокого охлаждения высших организмов. Такие клетки, как споры, содержащие мало воды, вообще не повреждаются при замораживании, даже до сверхнизких температур, поскольку сведены до минимума такие повреждающие факторы, как дегидратация и внутриклеточное образование льда. Однако даже вполне гидратированные микроорганизмы могут при замораживании довольно хорошо сохраняться в течение длительного времени. В этом отношении известно многолетнее хранение микроорганизмов в замороженном молоке и бульоне и даже в дистиллированной воде [348]. В случае, если наблюдается снижение титра микроорганизмов после реконсервации, то достаточно использовать такие криопротекторы, как глицерин либо ДМСО, чтобы полностью предохранить микроорганизмы от криоповреждений.

Более высокая организация простейших в филогенетическом ряду вызывает уже трудности их сохранения путем низкотемпературного замораживания. Известно, что некоторые простейшие (трипаносомы, малярийные возбудители) хорошо переносят замораживание в естественном состоянии и естественных условиях. Однако для большинства простейших низкие температуры являются летальными, поэтому для их защиты широко используют глицерин и ДМСО. Ниже приведены данные о защитном влиянии криопротекторов на выживаемость простейших после их реконсервации.

Микроорганизм	Криопротектор в 10%-ной концентрации
Entamoeba histolitica	Глицерин, ДМСО
Трихомонады	Глицерин, ДМСО
Трипаносомы	Глицерин
Возбудитель таксоплазмоза	Глицерин
Нематоды	Глицерин, ДМСО

Эффективность глицерина зависит, очевидно, от его способности проникать внутрь микроорганизма. Это соединение не защищает, например, *Amaeba proteus,* поскольку она непроницаема для глицерина [762].

Физико-химические факторы, вызывающие гибель *E. coli*. Действие низких температур на микроорганизмы целесообразнее всего излагать с анализа структурно-функционального состояния *E. coli*, на которой были изучены общебиологические изменения свойств и поведения бактерий в этих экстремальных условиях.

Клетки *E. coli* в общем довольно устойчивые к действию низких температур и часто дают 90% выживаемости, хотя их реакция на замораживание отлична от реакции, например, дрожжей. Однако хранение замороженных бактериальных суспензий при температурах выше —79° обычно дает постепенное снижение жизнеспособности, которое увеличивается при повышении температуры хранения. Выживаемость обычно бывает выше тогда, когда взвешивающей средой является дистиллированная вода; повышение содержания солей оказывает обычно противоположное действие. Повреждение *E. coli* при быстром охлаждении происходит главным образом в особом состоянии — фазе логарифмического роста. Однако почти все исследования по замораживанию были выполнены на клетках в стационарной фазе, которая, согласно Майнел [570], полностью устойчива к тепловому удару выше 0°. Более того, имеются прямые доказательства того, что тепловой удар не действует ниже 0°. Это объясняется тем, что если клеточные суспензии быстро охлаждались до —9 или до —10° и хранились при этой температуре в переохлажденном состоянии, то изменений жизнеспособности *E. coli* не наблюдалось [707, 831, 832]. Повреждения в суспензии возникают в основном после начала формирования льда, хотя это не обязательно. Когда формируется лед, клетки становятся более восприимчивыми к изменениям температуры, что не обусловлено, как считают, эффектом теплового удара [542].

В настоящее время выяснено, что *E. coli* не погибают под воздействием кристаллизации непосредственно внешней среды. В этом отношении существенную роль играют, очевидно, концентрированные внеклеточные компоненты раствора, поскольку если этот эффект может быть снижен путем суспендирования клеток в дистиллированной воде перед их замораживанием до температуры —22 и —79°. При этом выживаемость сразу после замораживания и оттаивания приближается к 90% или бывает даже выше. Как и в случае дрожжей, внеклеточная кристаллизация в данном случае является недостаточной для гибели бактерий, т. е. простое снижение температуры само по себе не вызывает повреждения. При обычных лабораторных режимах замораживания, при хранении и оттаивании устойчивость обычно снижается и не дает 100%-ной выживаемости. Оказывается, что повреждения клеток прежде всего обусловлены концентрацией растворенных веществ, которая является результатом формирования льда. Выживаемость бывает ниже обычно тогда, когда средой суспендирования служит раствор NaCl, бульон или пептон. Лучший эффект в этом отношении дает дистилли-

рованная вода [216, 348]. Показано, что выживаемость *E. coli* снижается по мере повышения концентрации бульона, а также в процессе хранения культуры клеток. При температурах порядка —40 —50° выживаемость падает обычно низко [475]. Однако имеются и другие мнения. Например, выяснено, хто хранение замороженных клеток на обогащенных пептоном средах также хорошо действует на их выживаемость, как и охлаждение в дистиллированной воде [126—128]. Выживаемость *E. coli* после двухчасовой экспозиции при —9°, по данным Вейзер и сотрудников [831, 832], падает до 4%, а по данным других авторов, после 14 дней при —10° снижается до 50%. Хранение *E. coli* в воде, солевом растворе или пептоне при —7° в течение суток менее вредно, чем хранение при —18° или —30°. В то же время Клемент [216] получил хорошие результаты хранения *E. coli* в дистиллированной воде. Было также выяснено, что если клетки суспендируются в физиологическом солевом растворе, то их лучше хранить при температуре —23—40°. При этом через 24 *ч* были меньшие повреждения, чем при более высоких температурах хранения. Хейнс [336] получил 100%-ную выживаемость клеток при хранении *E. coli* в течение 2—3 недель при —20°; при более высоких температурах жизнеспособность культур клеток заметно снижалась. В других исследованиях было выяснено, что выживаемость после 15 *мин* была минимальной при —40° и максимальной при —15°. Последующее снижение числа жизнеспособных клеток при хранении было менее выражено при —40°, чем при —15° [475, 831, 832].

Следовательно, имеются значительные расхождения в данных о чувствительности *E. coli* к действию низких температур. Это обусловлено, очевидно, тем, что выживаемость замороженных и отогретых *E. coli* зависит от ряда факторов и их взаимодействия. К их числу относятся: а) концентрация клеток в суспензии; б) природа взвешивающей среды; в) физиологическое состояние клетки; г) формирование внутриклеточного льда; д) концентрация внеклеточных веществ, скорее всего электролитной природы.

Роль концентрации клеток в суспензии. Показано, что выживаемость *E. coli* зависит от концентрации клеток в суспензии. Например, установлено, что 3,2% клеток переносит хорошо однонедельное хранение при температуре —22°, если суспензия содержит 10^9 клеток на 1 *мл* бульона. Если эта концентрация падала до 10^6 *мл* бульона, то выживаемость составляла всего 0,006% [178, 179, 530, 707]. При —9° после 7-дневного хранения выживает 60% клеток, если их концентрация находится в пределах 2×10^9 на 1 *мл* бульона. Если она падала до 2×10^5 на 1 *мл* бульона, то жизнеспособными оказывалось всего 4% клеток. Промежуточные концентрации клеток в суспензии дают соответственно средние цифры выживаемости. Если сравнивать эти данные с замораживанием, например, дрожжевых клеток, то оказывается, что в случае последних увеличение их концентрации от 2×10^6 до 2×10^9 почти не сказывается на проценте их жизнеспособности. Поэтому полагают,

что концентрационная зависимость играет существенную роль в сопротивляемости бактериальной суспензии к действию низких температур. Эта защита при высоких плотностях клеток в суспензии обусловлена, очевидно, растворенными веществами, которые выходят из поврежденных клеток. Установлено, что повышенная чувствительность разбавленной клеточной суспензии *E. coli* к многократному замораживанию обусловлена не снижением числа клеток, а разбавлением их в истощенной питательной среде. Чувствительность к замораживанию и оттаиванию будет постоянной при клеточной концентрации, равной 10^6—10^9 на 1 *мл*, если клетки будут помещены в свежую неистощенную среду, содержащую необходимые соли и глюкозу [613].

Природа взвешивающей среды. Выживаемость клеток *E. coli* после хранения значительно зависит от специфической природы взвешивающей среды. Более того, оказывается, что существует спорное взаимодействие между типом среды, концентрацией клеток и температурой. Поэтому когда клетки замораживаются в дистиллированной воде, их выживаемость выше, а степень гибели при хранении ниже и меньше зависит от концентрации клеток, чем в том случае, если они суспендированы в бульоне, пептоне или растворе NaCl [216, 347, 348]. Если клетки суспендируются в растворе NaCl, выживаемость их при замораживании оказывается минимальным, а степень гибели при хранении при температурах выше эвтектической точки среды наиболее высокая. Например, было обнаружено всего 10% живых клеток после их 24-часового хранения при температуре —7—18° и 30—40% при более низких температурах, когда в качестве взвешивающей среды был взят 0,85%-ный NaCl [216]. По данным других авторов, самая низкая выживаемость и высокая летальность отмечаются при хранении в пределах —45° и выше, что, очевидно, ближе всего к точке эвтектической зоны морской воды, которая была взята в качестве взвешивающей среды. Таким образом, видно, что повреждения клеток *E. coli* могут быть обусловлены концентрационными эффектами и, в частности, влиянием таких ионов, как, например, Na^+ или Cl^-. Растворы, содержащие NaCl, обычно дают самую высокую смертность, однако эта летальность гораздо меньше при температурах ниже эвтектической точки. Далее, выдерживание клеток *E. coli* при низких температурах в средах, содержащих достаточное количество NaCl в переохлажденном состоянии, так же вредно, как и замораживание их в разбавленных растворах [475, 672]. Несмотря на большое число фактов, нельзя уверенностью сказать, является ли NaCl агентом, вызывающим гибель, поскольку не ясно, как ведут себя другие электролиты. Известно, например, что часто в качестве взвешивающей среды используют фосфатный буфер, который действует гораздо мягче по сравнению с растворами NaCl [178, 179, 671]. Другими вредными взвешивающими средами являются бульон и пептон. Оба они содержат значительное количество NaCl. Представляют интерес в этом отношении исследования по сравнительной

токсичности различных неорганических катионов и анионов для *E. coli*, хранившихся при температуре +2°С. Токсичность галоидов щелочных металлов при постоянном катионном или анионном составе среды зависит от их молярной растворимости. Поэтому при концентрациях выше 1 М снижение токсичности может быть представлено в следующем порядке: $Li^+ > Cs^+ > (Rb^+, Na^+) > > K^+ > F^- > Br^- > Cl^-$. Установлено, что после 25 дней хранения в 2,0М растворах при температуре +2° выживаемость *E. coli* составляет 0,5; 5; 12; 30 и 50% соответственно для LiCl, CsCl, RbCl, NaCl и KCl.

Физиологическое состояние клетки. Существенное значение для выживаемости клеток играет состояние их в момент замораживания. В частности, играет роль фаза роста клеток. Клетки в ранней фазе логарифмического роста более чувствительны к действию низких температур, чем в стационарном состоянии. Играют роль также условия культуры клеток, методика разбавления и питания. Например, клетки, насыщенные кислородом, более устойчивые, чем ненасыщенные [179, 347, 348, 530, 808]. В некоторых сообщениях было показано, что особых различий между чувствительностью клеток в фазе логарифмического роста и стационарной, как и между клетками с аэробным и анаэробным типом метаболизма, не имеется. Эти противоречивые результаты могут быть обусловлены тем, что использовались клетки поздней лаг-фазы, выращенные на простых, а не на сложных средах. Кроме того, использовались различные методы охлаждения и отогревания в пределах даже одного исследования и, что очень важно, разными исследователями. Наконец, имеют значение физиологические и генетические различия разных штаммов *E. coli*, использованных для опытов различными экспериментаторами.

Несмотря на эти противоречия, в настоящее время имеются данные о том, что постепенная гибель клеток *E. coli* с течением времени обусловлена не концентрацией внеклеточных растворенных веществ, а скорее всего обусловлена токсическими эффектами таких солей, как NaCl, которые в процессе физико-химического взаимодействия с биоструктурами клеток вызывают их лизис.

Формирование внутриклеточного льда. Имеются сведения, что внутриклеточный лед вообще не образуется в клетках *E. coli*, охлажденных при обычных скоростях, либо он и образуется, но не вызывает особых повреждений. Некоторые эксперименты, проведенные в этом направлении, показывают своеобразие поведения *E. coli* при использовании различных скоростей охлаждения, температуры, хранения и других факторов [707]. Показано, что быстрое охлаждение *E. coli* в дистиллированной воде более вредно, чем медленное. В некоторых случаях выживаемость после охлаждения до —30° со скоростью примерно 1 или 100° в минуту соответственно составляла 0 и 40%. При этом суспензия содержала 3×10^9 клеток в 1 *мл*. Эта разница была менее заметной при использовании более концентрированных суспензий. Выживаемость быст-

ро охлажденных клеток обычно падала, если их замораживали до более низких температур. При этом выяснилось, что при охлаждении клеток до —5, —20, —50, —70 и —180° жизнеспособность составляла соответственно 95, 74, 50, 63 и 53%. Во всех случаях медленно охлажденные клетки дают незначительный процент гибели либо она вообще отсутствует. При этом восстановление функций клеток колеблется от 64 до 88%. Скорость отогрева имеет, очевидно, относительное значение для сохранности *E. coli*, поскольку клетки, отогреваемые от —180° со скоростью примерно 1000° в минуту, дают 60%-ную выживаемость, а клетки, отогреваемые со скоростью около 10° в минуту, дают 35—53%-ную жизнеспособность. Выживаемость после замораживания и оттаивания до —30° и ниже была почти одинаковой в дистиллированной воде и в 0,85%-ном растворе NaCl. При медленном охлаждении выживаемость клеток в указанных средах была почти одинаковой и составляла соответственно 74 и 71%. Эти опыты указывают на то, что внутриклеточное образование льда может играть незначительную роль в гибели *E. coli*. Теоретические расчеты [536, 541, 544] по содержанию воды, функции температуры и размерам клеток позволяют предположить, что такие маленькие клетки, как *E. coli*, могут переносить внутреннее замораживание только в том случае, если скорость замораживания составляет около 100° в минуту либо более. Правда, в этом отношении большую роль играет проницаемость мембраны клеток для воды. Электронномикроскопически доказано, что клетки действительно претерпевают внутреннее замораживание под действием высоких скоростей охлаждения, превышающих 1000°в минуту. Влияние таких скоростей охлаждения было исследовано в тонких пленках *E. coli* в 10%-ном растворе сахарозы по следующим схемам:

1. Пленки выдерживали над жидким азотом в течение 3 *сек*, т. е. период, пока они не замораживались. Затем их погружали на 30 *сек* в жидкий азот, извлекали и медленно оттаивали при комнатной температуре. Уровень выживаемости в данном случае составлял 67%.

2. Пленки погружали прямо в жидкий азот и охлаждали до —196° в течение приблизительно 2 *сек*, а затем в течение 30 *сек* отогревали в буферном растворе. Жизнеспособность в этом случае составляла 38%.

3. Пленки погружали в жидкий азот и медленно оттаивали, как и в первом случае. Этот метод давал всего 17% выживаемости.

Данные по выживаемости *E. coli* свидетельствуют о том, что очень быстрое охлаждение оказывает более разрушительное действие, если клетки после размораживания отогреваются медленно. И, наоборот, медленное отогревание быстро замороженных пленок дает высокий процент гибели. Вместе с тем применение 10%-ной сахарозы в этих опытах в качестве взвешивающей среды в значительной мере уменьшает влияние повреждающих факторов замораживания, поскольку она является криопротектором [250, 831,

832]. Показано также, что замораживание *E. coli* в среде, обеспечивающей рост и оттаивание путем встряхивания в 0,15М NaCl при 37°, дает около 100% выживаемости, т. е. скорость оттаивания при этом составляла несколько сот градусов.

В качестве примера приводим результаты исследований по изучению влияния низких температур на выживаемость *S. serevisae* и других видов бактерий в зависимости от скорости охлаждения и условий опыта (рис. 128, 129, 130). Эти значения, конечно, приблизительны, поскольку данные по выживаемости, например, *E. coli* при низких температурах весьма противоречивы. Показано, что кривая выживаемости очень снижается при скоростях охлаждения ниже 1° в минуту, особенно при увеличении срока хранения материала. Более высокая жизнеспособность наблюдается при



Рис. 128. Ориентировочная выживаемость *S. serevisae* как функция скорости замораживания [543]:
1 — быстрый отогрев; *2* — гипотетическая кривая медленного отогрева.

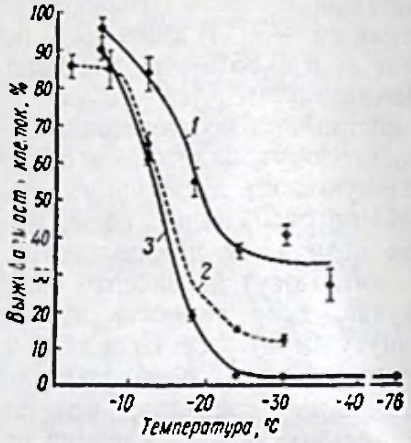


Рис. 129. Выживаемость клеток *S. serevisae*, суспендированной в:
1 — 0,1 М NaCl; *2* — 0,1 М KH_2PO_4; *3* — 0,1 М $CaCl_2$ [537].

использовании более высоких скоростей замораживания и быстрого отогрева. Это объясняется следущим: а) внутриклеточное замораживание не происходит до тех пор, пока скорость охлаждения не превысит 100° в минуту или более; б) скорости, необходимые для того, чтобы произошло замораживание, настолько высоки, что образованные внутренние кристаллы очень малы либо несовершенны и, следовательно, безвредны.

Более рациональной гипотезой, объясняющей возникновение значительной части низкотемпературных повреждений *E. coli*, возникающих вслед за охлаждением и в процессе хранения, может служить предположение, что основным повреждающим фактором является повышение концентрации растворенных внеклеточных веществ, особенно NaCl. Чувствительность клеток к растворенным веществам минимальна, если их большое количество суспендировано в растворе неэлектролитов. При этом происходит разбавление солей NaCl за счет частичной дегидратации клетки под влиянием экзогенного неэлектролита—когда разбавляются соли жидкостью клетки.

Таким образом, микроорганизмы по их чувствительности к низким температурам можно условно разделить на четыре категории:

1. Микроорганизмы, которые выживают практически во всех условиях замораживания и оттаивания.

2. Микроорганизмы, довольно устойчивые к непосредственному действию низких температур, но восприимчивые к условиям последующего хранения.

3. Штаммы, чувствительные к непосредственному замораживанию и к отдаленным его последствиям.

4. Культуры, которые не переносят замораживания при различных условиях.

К первой категории относится большинство спор. Бактериальные споры исключительно устойчивы к действию субнулевых температур и дают до 90% выживаемости [336, 650]. Споры грибов также очень устойчивы, если они охлаждаются в своих естественных условиях — воздухе, однако теряют это свойство, если их поместить в водную среду [535, 539, 540]. Споры мхов и папоротников переносят температуры вблизи абсолютного нуля, если их вначале высушивают в вакууме, но погибают при менее жестких условиях, если их предварительно не дегидратировать.

Высокая устойчивость всех этих форм организмов по сравнению с вегетативными клетками связана, очевидно, с тем, что они содержат сравнительно мало свободной воды, и в некоторых случаях вся вода в их теле представляет полимерную связанную воду, которая практически не замерзает. Однако некоторые виды вегетативных клеток, содержащих в своем составе больше воды, также нечувствительны к токсическим эффектам субнулевых температур. Например, 50%, а чаще 90% клеток микрококков, стрептококков и стафилококков выживает при различных режимах замораживания и продолжительного хранения [126, 127, 250, 251, 347—352]. Правда, по данным других авторов, эти виды микроорганизмов несколько более восприимчивы к действию низких температур, особенно в условиях хранения [530, 581, 846]. Совершенно иное положение у других видов микроорганизмов, которые погибают при низких температурах в самых различных условиях. Это происходит, например, со свободно живущими амебами [757] и большинством ресничатых простейших [514].

Основная масса микроорганизмов, относящихся ко второй и третьей группам, может быть разделена на две подгруппы по их восприимчивости к субнулевым температурам, включая такие показатели, как скорость охлаждения, температуру, взвешивающую среду, время хранения, температуру и скорость их отогрева.

Наиболее обширная литература по этому вопросу посвящена выживаемости микроорганизмов в зависимости от продолжительности хранения и других факторов, например температуры. При температуре — 78° и ниже степень гибели очень низкая либо при-

ближается к нулю, по крайней мере для таких микроорганизмов, как микробактерии туберкулеза, сальмонеллы, стрептококки, спирохеты Торелля.

Однако эти данные не всегда постоянны. Обнаружено, что клетки таких простейших, как *Trichomonas factus*, в 10%-ном растворе глицерина погибают быстрее при хранении в ящике с сухим льдом при температуре —76°, чем при —20°, что, очевидно, связано с резкими температурными перепадами [291].

При температурах в диапазоне —60 —0° выживание почти всех видов микроорганизмов со временем снижается и зависит от температуры хранения, взвешивающей среды и концентрации клеток. Бактериальные споры при таких температурах почти не подвергаются дегидратации либо подвергаются в очень малой степени, либо в интервале температур —1—20° это вообще не происходит [800].

Некоторые примеры выживаемости при хранении вегетативных клеток показаны на рис. 130. Как видно, уровень гибели микроорганизмов очень зависит от среды взвешивания, температуры хранения, а иногда и концентрации клеток. Хотя по сведениям большинства авторов, стаффилококки и стрептококки относятся к наиболее устойчивым микроорганизмам, данные на рис. 130 свидетельствуют о противоположном. Очевидно, к устойчивым формам можно также отнести *Lactobacillus* и *Aerobacter*, а такие микроорганизмы, как *Serratia*, *E. coli* и *Pseudomonas*, наиболее чувствительные к действию низких температур.

Из рис. 130 видно, насколько сильно влияет взвешивающая среда и концентрация клеток на выживаемость *Aerobacter aerogenes*, *E. coli*, *Salmonella* и *Serratia*. Гибель этих видов очень снижается, если суспензия концентрированная. Вместе с тем степень гибели других видов бактерий, например *Lactobaccilus*, *Micrococcus* и *Bacillus vulgaris*, не зависит от концентрации клеток.

Вместе с тем необходимо отметить, что данные по выживаемости и температуре хранения до сих пор весьма противоречивы. Ряд авторов указывают на то, что гибель таких клеток, как *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Salmonella* и *Streptococcus*, уменьшается с понижением температуры хранения в интервале температур —1 —30° [336, 777, 846]. Другие исследователи не выявили такой зависимости для первых двух видов микроорганизмов [126—128]. Было также показано, что, например, такие микроорганизмы, как *Vibrio costicolus*, выживают гораздо лучше при —25°, чем при —60°. Несколько иная зависимость обнаружена у *Lactobacillus bifidus* и *L. fermenti*, *Serratia marcescens* и *E. coli*.

Таким образом, создается впечатление, что существует довольно высокая индивидуальная (специфическая) чувствительность различных бактерий к действию низких температур, которые по-разному реагируют на факторы, возникающие при замораживании.

ЗАМОРАЖИВАНИЕ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНАЯ ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ВИРУСОВ

Широкое применение вакцин, состоящих из суспензий аттенуированных вирусов или инактивированных вирусов и риккетсий, выдвинуло перед криобиологией несколько проблем: 1) сохранение активности вакцин длительное время, которое необходимо для проведения испытаний и создания запасов; 2) сохранение иммунологических свойств вакцин, сохраняемых при различных условиях, и 3) сохранение активности вирусных суспензий в течение многих лет для использования их в качестве эталонных материалов и штаммов для посевов.

Если вирусы или риккетсии сохраняются длительное время, то они должны, во-первых, сохранять свойства к нормальному росту и репродукции, во-вторых, должны охлаждаться до температуры, при которой биохимические или биофизические процессы, ответственные за снижение активности, приостанавливаются или значительно тормозятся. Наконец, они должны быть высушены в достаточной мере для достижения указанных выше результатов.

Необходимо отметить, что разработка способов культивирования или трансплантации вирусов является трудоемким процессом. Сейчас они заменяются современными, вызывающими анабиоз или временное прекращение жизненных функций путем использования низких температур. Метод высушивания возгонкой в вакууме успешно применяется для приготовления суспензий бактерий и вирусов, сохраняющих рост и иммунологические свойства длительное время при хранении в неблагоприятных условиях [301, 329, 330, 345]. Однако сохранение замороженно-высушенных (лиофилизированных) в живом или активном состоянии биологических организмов возможно в том случае, если они переносят процесс превращения их воды в лед либо удаление охлажденной воды путем ее сублимации и обладают способностью восстанавливать свою структуру и функцию после перехода воды в жидкое состояние. Хотя эта проблема и сложна, решить ее все же можно. Как известно, основной инфекционный компонент вируса представляет собой высоко- и низкомолекулярные рибонуклеиновые кислоты и дезоксирибонуклеиновую кислоту. Вирус содержит также защитную оболочку, окружающую молекулы нуклеиновых кислот и служащую для переноса инфекционного начала в функционально неповрежденном состоянии в организм хозяина.

Несмотря на то, что при электронной микроскопии обнаружена сложность строения вирусов, использованные при этом методики не позволяют определить местоположение и количество присутствующей в микроорганизме воды. Для подробного описания и систематизации функциональных единиц отдельных вирусных частиц [129, 203, 244, 400—403, 539, 576, 613, 646, 647, 652, 653] были

использованы и другие физические методы исследования, такие как центрифугирование, световая и рентгеновская дисперсия, инактивация ионизирующей радиацией и рентгеновская дифракция.

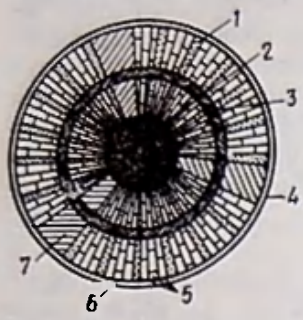


Рис. 131. Схематическое изображение строения вируса табачной мозаики диаметром 298 Å [333]:

1 — внутренний гидратный слой; *2* — ДНК; *3* — РНП; *4* — поверхностный гидратный слой; *5* — низкомолекулярные антигенные белки; *6* — высокомолекулярные антигенные белки; *7* — ферменты.

Исходя из результатов приведенных выше исследований физических структур, по данным электронной микроскопии, могут быть уже сделаны научные предположения относительно концентрации воды внутри вирусной структуры.

В вирусе мозаики южных бобов—растительном вирусе—структура воды имеет форму лучей, исходящих из самой середины нуклеиновой кислоты к поверхности (рис. 131). Вирус, по-видимому, также покрыт мономолекулярной пленкой воды. В другом вирусе, Т2 фаге бактерии, структура воды также представлена в виде лучей выходящих из середины нуклеиновой кислоты и направляющихся к наружной поверхности (рис. 132). Имеется некоторое основание считать, что ДНК полностью погружена в жидкую фазу. Этот вирус покрыт, по-видимому, наружным слоем воды толщиной в несколько молекул. Изучая вирус гриппа (рис. 133), исследователи установили, что его водная сердцевина содержит в основном нуклеиновую кислоту. В этой сердцевине находятся слои воды, которые соприкасаются с липидными сегментами, образующими часть поверхности вируса.

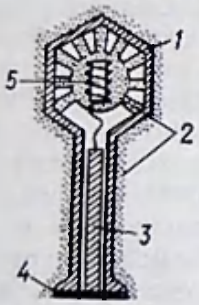


Рис. 132. Структура Т2 фага [643]:

1 — белковая оболочка; *2* — водные слои; *3* — сократительный белок; *4* — место прикрепления; *5* — нуклеиновые кислоты.

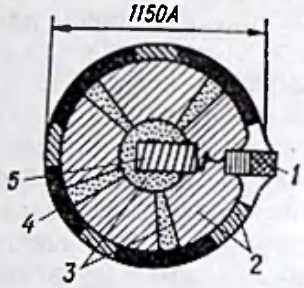


Рис. 133. Структура вируса гриппа [643]:

1 — место прикрепления; *2* — белки; *3* — вода; *4* — липиды; *5* — нуклеиновые кислоты.

Из приведенных выше примеров следует, что три основных класса вирусов (растительных, бактериальных и млекопитающих животных) представляют собой сложные образования, в составе которых имеется довольно много сложных структурных компонен-

тов. Установлено, что вирус гриппа содержит на поверхности мембраны фермент нейраминидазу [333, 418], которая способна лизировать оболочку нервных клеток и этим самым способствовать проникновению вируса внутрь. При исследовании криотолерантности и изменения реакций вирусов под влиянием низких температур необходимо помнить, что подвергнутые таким стрессам, как замораживание, консервирование при низких температурах и высушивание, они могут рассматриваться как клетки в миниатюре. Следовательно, температура и скорость замораживания, температура консервирования, суспендирующая среда и другие факторы должны быть изучены экспериментально с целью определения условий, необходимых для сохранения максимума их структурной и функциональной полноценности.

Методы замораживания вирусов. Поскольку замораживание представляет собой обычно первый и необходимый этап для успешного высушивания биологических материалов путем сублимации в вакууме, основным вопросом является проблема поведения воды в клетке при ее замораживании или возгонке. В литературе имеется много данных о влиянии охлаждения, вплоть до сверхнизких температур, на выживание тканей, клеток и целых организмов [514, 561, 614, 615, 673—675]. В настоящее время нет еще общепринятых стандартов, определяющих скорость замораживания. Когда в лабораториях, изучающих вопросы криобиологии, начнут более широко применяться созданные недавно аппараты для контроля скорости охлаждения биологических объектов, то будет решена в основном и эта проблема. Является также важным точное описание методик замораживания (вид контейнера, площадь замораживаемой оболочки и т. д.) с такой же тщательностью, как это делают радиобиологи при описании источников ионизирующего излучения. К сожалению, в большинстве публикуемых криобиологических сообщений характеристики методов замораживания приводятся редко.

Защитные смеси. Данные многих исследователей указывают на необходимость применения различных веществ как протекторных агентов, предупреждающих вредные влияния замораживания и высушивания при сублимации микроорганизмов в вакууме с целью сохранения активности биологического материала [325, 329—334, 492, 423, 759].

В табл. 46 приведены наиболее часто применяемые защитные смеси.

Предполагают, что эти протекторные составы действуют следующим образом: а) путем «конкуренции» с биологическими единицами во время интерфазы газ — жидкость, при которой имеет место денатурация белков [346]; б) используются в качестве субстрата для организмов [171]; в) вызывают первоначальное обезвоживание до замораживания [512]; в) образуют и сохраняют открытые каналы в затвердевшем межклеточном веществе, которые обеспечивают условия для метаболизма вирусных частиц [494, 498]; г) предупре-

ждают образование внутриклеточных кристаллов льда [517]; д) защищают от действия повышенной концентрации солей при замерзании [492, 493]; е) изменяют скорость образования, растворения и перераспределения льда [511].

В последнее время изучено действие на вирусы ДМСО, сорбитола и среды PDA, полученной из лаборатории Parke, Davis and Company (Детройт, Мичиган, США) и состоящей из лактобионата кальция и сывороточного альбумина человека, прибавленных в отдельности до 1%-ной конечной концентрации каждого из них в суспензии [333].

Таблица 46

Криозащитные вещества, добавляемые при низкотемпературном консервировании вирусов [333]

Природа защитной среды	Автор
Белковые адъюванты (желатин, сыворотка, пептон, альбумин и т. п.)	[609, 610]
Кипяченое молоко	[329, 334]
Глутаминовая кислота	[171]
Аллантоисная жидкость	[329]
Сахара (лактоза, сахароза, глюкоза, сорбитол)	[301, 759]
ДМСО	[133, 331]
Глицерин	[642]
Среда PDA-Park-Davis-Addative (лактобионат кальция и сывороточный альбумин человека)	[333]

Последними исследованиями показано, что ДМСО соответствует, а по некоторым показателям превосходит по своему действию глицерин при защите клеток и клеточных частиц от влияния вредных факторов замораживания при низких температурах [133, 330]. Обнаружено также защитное действие ДМСО для вирусов кори и гриппа при их циклическом замораживании — высушивании, а также консервировании при умеренно низких температурах, хотя механизм защитного действия ДМСО пока не известен. Согласно некоторым предварительным исследованиям, ДМСО в низких концентрациях изменяет степень переохлаждения растворов и сокращает время их замерзания [333]. Было также установлено, что при переохлаждении или слишком длительном замерзании инфекционные титры суспензий вируса гриппа снижаются. Действие перечисленных выше факторов на других вирусах не исследовано.

Замораживание в жидких средах. Влияние различных скоростей замораживания на активность суспензий вируса гриппа в физиологическом растворе изучалось с помощью «регулируемых скоростей охлаждения». В качестве примера приводим данные рис. 134, на котором представлено влияние различных скоростей замораживания на инфекционность вируса. Кривая *1* отражает

последовательность действия температур в образце, охлаждаемом со скоростью 1° в минуту. Части кривой соответствуют: *а* — переохлаждение, *б* — плато замерзания, *в* — завершение замерзания с продолжением охлаждения.

Путем регулирования скорости замораживания могут быть получены кривые *2* и *3*, в которых отсутствует резко выраженный скачок температур после переохлаждения либо в которых плато замерзания полностью исключено. Если охлаждать суспензию вирусов гриппа со скоростью замораживания согласно кривым *1*, *2* и *3*, то LD_{50} такой культуры снижается соответственно с $10^{-8,5}$ до $10^{-4,2}$, $10^{-5,5}$ и $10^{-6,2}$. При замораживании такой же суспензии со скоростью 60° в минуту (кривая *4*) LD_{50} становится значительно выше, чем при охлаждении со скоростью 40° в минуту. Полученные при этом титры соответствуют $10^{-7,2}$ и $10^{-6,6}$. Эти данные указывают на то, что для этих организмов более высокая скорость охлаждения улучшает восстановление их функциональных свойств.

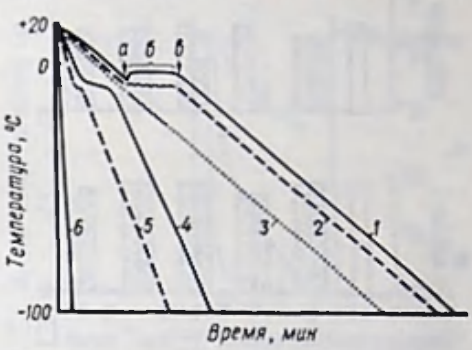


Рис. 134. Влияние различных скоростей замораживания на активность суспензий вируса гриппа [333]:

а — начало выделения скрытой теплоты замерзания (переохлаждение); *б* — плато замерзания; *в* — завершение замерзания суспензии; *1*, *2* и *3* — охлаждение суспензии со скоростью 1° в минуту; *4* — охлаждение со скоростью 60°; *5* и *6* — охлаждение со скоростью 40° в минуту.

В других опытах были использованы другие скорости замораживания [323]. Для этого суспензию вирусов быстро замораживали в пробирках, заранее охлажденных до —20, —40, —60, —76° и —196°; другие суспензии помещали в пробирки и медленно охлаждали путем погружения в низкотемпературную ванну при таких же показателях температуры с постоянным вращением для сосредоточения вирусных суспензий лишь на стенках пробирок.

Влияние вышеупомянутых замораживающих способов на титры вируса гриппа, взвешенного в физиологическом растворе, или вирусов кори и полиовируса, суспендированных в среде 199, показано на рис. 135. Замороженные образцы размораживали путем помещения пробирок под проточную воду при температуре +10° при постоянном встряхивании до полного оттаивания. Все суспензии вирусов гриппа, кори и полиовируса, замороженные медленно или быстро при —40° в ванне, кроме полиовируса, замороженного быстро при такой же температуре, обнаруживают значительное снижение активности. Титры суспензий вирусов кори и полиовируса также снижаются при быстром замораживании до —190°. Титры суспензий трех изучающихся вирусов незначительно отличались от соответствующих контрольных, замораживаемых медленно

или быстро в ванне при температуре —76°. Активность суспензий вируса кори была наиболее устойчивой, суспензии вируса гриппа обнаруживали небольшие потери титра. Интересно отметить, что Лавлок [492, 493] обнаружил максимальное повреждение эритроцитов после кратковременной экспозиции при —40°, что обусловливалось денатурацией белков под влиянием гиперконцентрации солей.

Замораживание в охлажденном воздухе с криозащитными веществами. Замораживание вирусов в холодильниках имеет ряд преимуществ по сравнению с замораживанием в жидкостях или плавающем льде. Во-первых, при этих условиях можно замораживать одновременно большее количество образцов. Во-вторых, в камере охладителя сублиматора с морозильным устройством в одном и том же аппарате можно проводить одновременно и замораживание и высушивание. Однако в связи с тем, что холодный воздух в закрытых камерах распределяется равномерно довольно медленно, это, собственно, и обусловливает очень низкие скорости замораживания клеток в таких камерах. Поэтому время, необходимое для достижения конечной избранной температуры, будет зависеть от свойств и размеров контейнеров, суспендирующей среды, количества суспензии в замораживаемом контейнере, начальной температуры образцов, теплоемкости холодильника и других факторов.

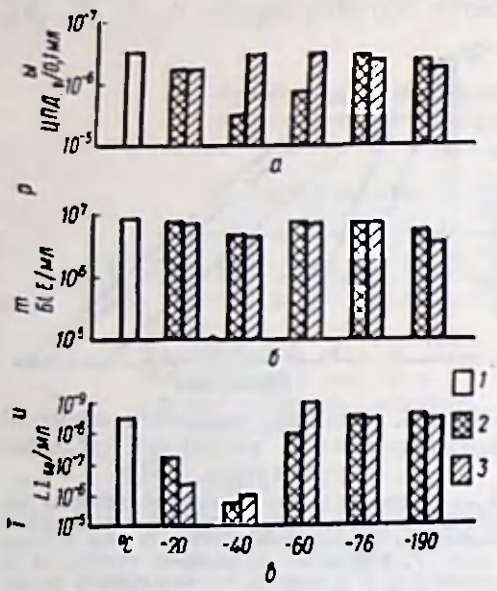


Рис. 135. Влияние быстрого или медленного замораживания на различные виды вирусов [333]:

а — титры полиовируса; *б* — титры вируса кори, суспендированного в среде 199; *в* — титры вируса гриппа, суспендированного в физиологическом растворе; *1* — контроль (незамороженный); *2* — медленное замораживание; *3* — быстрое замораживание.

Грейфф и сотрудники [333] для низкотемпературного консервирования 0,6 *мл* вирусов таким способом используют предварительное охлаждение до —4° суспензии вируса в тонкостенных пробирках пирекс. При этом используются следующие скорости охлаждения: до —20° в холодильнике со скоростью 1° в минуту; до —40° при скорости 5° в минуту и до —65° со скоростью 15° в минуту (рис. 135). Каждый препарат вируса первоначально суспендируют в основной среде, которая обеспечивает ему максимальную жизнеспособность. Полиовирус и вирус кори были суспендированы в среде 199, а вирус гриппа — в физиологическом растворе.

Как видно, вирус кори довольно хорошо сохраняет свои свойства в диапазоне всех изученных температур, в то время как полиовирус и вирус гриппа по-разному реагируют на низкие температуры. При замораживании вируса гриппа до —20° или —40° как при медленных, так и быстрых скоростях охлаждения его LD_{50} очень резко снижается. Замораживание этого вируса при температурах —60, —76 и —196° практически не влияет на его инфекционность. На полиовирус отрицательное влияние оказывает медленное замораживание до температуры —40 и —60°. Эти данные довольно наглядно показывают различия в реакции разных по своей природе вирусов на характер, темпы охлаждения и температуру хранения.

Циклическое замораживание и оттаивание вирусов. О влиянии циклического замораживания и оттаивания на активность суспензий вирусов имеются данные в очень немногих работах. Например, Сандерсон [703] замораживал медленно до —76° суспензию фага. В результате 10, 15 или 20 последовательных циклов замораживания и оттаивания титры обработанных суспензий отличались от контроля незначительно. Однако циклическое замораживание и высушивание другого микроорганизма — вируса Сен-Луиса вызывало медленное снижение его титра [461]. Вирулентный титр вируса гриппа, суспендированного в хорионаллантоисной жидкости и медленно замороженного до —40°, быстро снижается уже после 5 циклов замораживания и оттаивания [329].

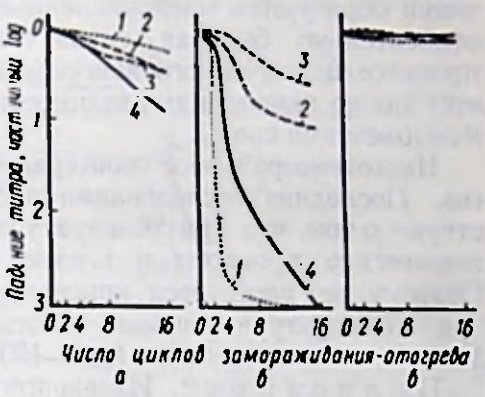


Рис. 136. Влияние циклического замораживания (—76°) и отогрева (+10°) на инфекционные титры вируса кори (*а*), вируса гриппа (*б*) и полиовируса (*в*) [333]:
1 — замораживание в основной среде + 5%-ный раствор сорбита; *2* — в основной среде + PDA; *3* — в основной среде + 2%-ный DMCO; *4* — в основной среде без протекторов.

Если суспензию вирусов кори (0,2 *мл*), гриппа (0,2 *мл*) и полиовируса (0,6 *мл*) медленно замораживать до —76° и оттаивать при постоянном встряхивании на бане при +10°, используя 1, 2, 4, 8 или 16 циклов замораживания и оттаивания, то можно вызвать потерю титров этих микроорганизмов (рис. 136).

Состояние суспензий в процессе замораживания, как известно, зависит не только от температуры и скорости замораживания, но и от предшествующей тепловой характеристики клеточной суспензии. При медленном замораживании и медленном переходе температуры через точку замерзания происходит, как правило, переохлаждение среды и формирование нескольких больших кристаллов льда [561]. При повышении скорости тепловых изменений число кристаллов льда возрастает, однако их размеры уменьшаются.

Окончательный размер кристаллов является результатом взаимоотношения скорости роста кристалла и скорости изменения температуры. Если скорость охлаждения очень высока, то рост существующих кристаллов ограничен. Кроме того, сверхнизкие температуры в момент замораживания тормозят образование дополнительных центров кристаллизации в клетке. Кристаллические центры таких клеток не разрушаются при оттаивании до тех пор, пока температура среды не достигнет 50—95° [512].

Когда клетку замораживают повторно, то сформированные ранее в ней центры кристаллизации способствуют тому, что при замерзании образуются многочисленные мелкие кристаллы. Несомненно, относительно быстрая смена таких состояний, имеющих место в процессе циклического замораживания и оттаивания, сопровождается также изменениями взаимоотношений между многими другими компонентами среды.

Низкотемпературное консервирование различных форм вирусов. Последние исследования в области криобиологии свидетельствуют о том, что при температурах ниже —130° все физические и химические процессы в клетке снижаются до минимума [564]. Поэтому рекомендуется консервировать биологические материалы при температуре жидкого азота (—196°) или в газообразной фазе над жидким азотом (от —150 до —176°).

П о л и о в и р у с. Изменения титра суспензии полиовируса в среде 199 или в среде 199 в комбинации с PDA либо в присутствии ДМСО, замороженной медленно в жидкой ванне до температуры —20, —40 или до —76° и сохраняемой при температуре —20, —40 или —65° в течение различных сроков (до 180 дней), существенно не отличаются от соответствующего контроля (рис. 137).

В и р у с к о р и. Титры всех суспензий вируса кори в среде 199 при медленном замораживании в жидкой ванне до —20, —40 или —76° и хранившиеся при —20, —40 или —65° до 180 дней значительно падают (рис. 137). При замораживании этого вируса в среде 199 его титры быстро снижаются в течение первых 30 дней консервирования, однако в дальнейшем либо вообще не снижаются, либо снижение очень незначительно. Наименьшие потери титра отмечались в суспензиях, медленно замороженных до —20° и сохраняемых при —20° либо замороженных медленно до —20 или —40° и хранящихся при —65° [333].

Активности замороженных и консервированных суспензий вируса кори были различны в зависимости от добавления ДМСО или PDA к среде 199. Хотя в присутствии этих смесей и наблюдалось некоторое падение титров, в конечном итоге титры после 180-дневной консервации были значительно выше, чем в соответствующих суспензиях, содержащих только среду 199. Защитное действие PDA выше, чем действие ДМСО для суспензий, консервированных при —40°. В течение 180 дней консервирования суспензий, содержащих PDA и замороженных медленно до —20,

—40 или —76° и консервированных при —65°, снижения титров не наблюдалось.

Вирус гриппа. У этого вируса, как и у вируса кори, титры суспензий вируса гриппа, замороженные медленно в жидкой ванне до —20, —40 или —76° и консервированные при —20, —40

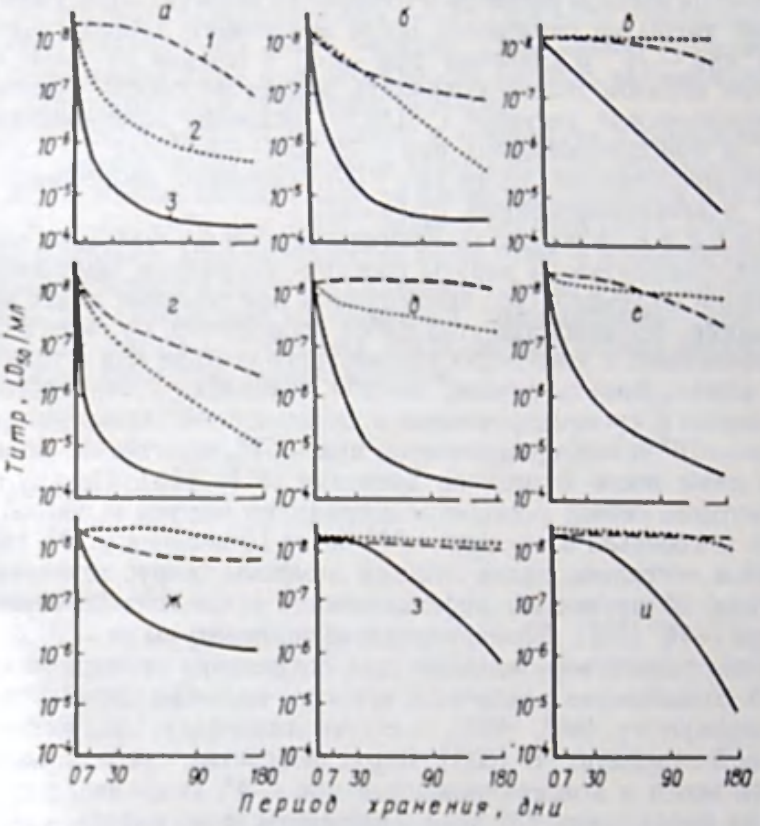


Рис. 137. Влияние медленного замораживания и низкотемпературного хранения на титры вируса гриппа, суспендированного в физиологическом растворе (*1*), физиологическом растворе + PDA (*2*) и 0,85%-ном NaCl + 2%-ный ДМСО (*3*):

а — замораживание до —20°, хранение при —20°; *б* — замораживание до —40°, хранение при —20°; *в* — замораживание до —76°, хранение при —20°; *г* — замораживание до —20°, хранение при —40°; *д* — замораживание до —40°, хранение при —40°; *е* — замораживание до —76°, хранение при —40°; *ж* — замораживание до —20°, хранение при —65°; *з* — замораживание до —40°, хранение при —65°; *и* — замораживание до —76°, хранение при —65°.

или —65° до 180 дней, значительно падают (рис. 137). Для большинства изученных температур замораживания и консервирования в физиологическом растворе титры быстро снижаются в течение первых 90 дней консервирования, а затем либо изменяются очень медленно, либо вообще не изменяются. Наименьшие потери титров обычно наблюдаются в суспензиях, замороженных медленно до —20, —40° и консервированных при —65° (рис. 137).

Титры суспензий вируса гриппа, взвешенные в физиологическом растворе в сочетании с PDA или ДМСО, значительно выше при всех указанных выше температурах замораживания и консервирования, чем для суспензий, охлаждаемых в одном лишь физиологическом растворе. При замораживании суспензий вируса в физиологическом растворе и добавлении вышеуказанных защитных смесей титры не снижаются после медленного замораживания до —40° или —76° и хранения при —65° в течение 180 дней. Аналогичным образом можно сохранять жизнеспособность суспензий в физиологическом растворе с ДМСО, медленно замороженных до —76° и консервированных при —20 или —40°, или в суспензиях на физиологическом растворе с PDA, медленно замороженных до —40° и консервированных при —40°.

Другие вирусы. Многочисленные исследования влияния низких температур на вирусы касались в основном замораживания суспензий до температур, применяемых при обычных видах консервирования. Большинство этих работ проводилось на вирусах, суспендированных в жидкостях неизвестного состава или в измельченных тканях. Вирусы гриппа, желтой лихорадки и мышиного энцефаломиелита, суспендированные в измельченной ткани, замороженные до —76° и консервированные при —76°, заметно не изменяют титра даже после 6 месяцев хранения [811—813]. Пользуясь таким методом, сейчас успешно консервируют вирусы мышиной пневмонии и собачьей чумы при —76° более 10 месяцев [372]. Необработанные экстракты ткани птичьей лимфомы (вирус птичьего лимфоматоза) обнаруживает инфекционность после года консервирования при —76° [191]. Консервирующие температуры от —20 до —30° признаны удовлетворительными для сохранения неочищенных суспензий большинства различных вирусов, включая сифилитическую лимфогранулому [463, 464], желтую лихорадку, полиомиелит и японский энцефалит В [333]. Вирус бешенства, суспендированный в ткани мозга и консервированный при —4°, сохраняет вирулентность на протяжении 732 дней. Препараты этого вируса, консервированные при —20°, сохраняют инфекционность после 883 дней хранения [463].

Количественная оценка влияния замораживания на вирусы в различных разведениях и различных суспендирующих средах дана Олитским [609, 610].

10%-ная суспензия мозга мышей многих нейротропных вирусов (восточный, западный, русский, дальневосточный, японский энцефалит В и энцефалит Лапсинга) при соотношении нормальной кроличьей сыворотки в физиологическом растворе 1 : 1 сохраняет почти полную инфекционность до 9 месяцев хранения при —25°. Вирус группы PR8 и Lee B и вирус паротита можно замораживать в 10%-ной суспензии инфицированной аллантоисной жидкости в нормальной лошадиной сыворотке и физиологическом растворе в соотношении 9 : 1. При этом происходит частичная потеря их инфекционности, а понижение титра обнаруживается после 3 месяцев хранения.

Спек и соавторы [768] изучали сохранение вируса herpes simplex в различных средах при —70 или —20°. В тканях животных этот вирус был очень стабилен, но, помещенный в инфицированную амниотическую или аллантоисную жидкость, он оказывался относительно нестабильным. При смешивании этой 10%-ной суспензии со снятым молоком или яичным желтком она в течение 7—8 месяцев очень хорошо сохранялась при —70°. При —20° соответствующие титры сохранились до 4 месяцев. При любой температуре среда, содержащая лишь физиологический раствор, является непригодной для сохранения указанных вирусов.

При изучении влияния скоростей и температур замораживания на инфекционные титры препаратов вируса гриппа, суспендированных в хорионаллантоисной жидкости и консервированных при —10, —20, —40, —63, —70 или —192° более 3 месяцев [1333], изменений не было выявлено. При температуре ниже —40° в процессе консервирования отмечается заметное снижение титров. Эти исследования показали, что независимо от скоростей замораживания или температур, до которых суспензия была первоначально охлаждена, наблюдается снижение титров вирусов.

Глава X

КРИОФИЛАКТИКИ

Значительные успехи, связанные с восстановлением жизнеспособности клеток после низкотемпературного воздействия, во многом обязаны открытию и применению различных защитных соединений. В качестве таких соединений использовались разнообразные сложные химические и биологические растворы, сыворотки, полимеры либо вещества, которые вызывали частичную дегидратацию клеток. Использование криопротекторов, вызывающих частичное обезвоживание, было основано на изучении природных моделей, которые показали, что в окружающей среде выживают при низких температурах лишь те организмы, клетки которых предварительно подвергаются частичной дегидратации [514]. Это была одна из наиболее ранних теории механизма действия криопротекторов. В дальнейшем благодаря бурному развитию криобиологических исследований в области структурных моделей воды и ее значению в функционировании биомакромолекул были получены принципиально новые факты по вопросу взаимодействия различных криопротекторов с биологическими структурами.

Из предыдущих разделов книги вытекает, что идеальным исходом низкотемпературного воздействия на биологический объект явилось бы витрифицированное состояние жидкой фазы клетки, не содержащей кристаллов льда, которые, как известно, являются одним из повреждающих факторов при воздействии низких температур. Однако охлаждение биологического объекта с любой скоростью всегда сопровождается образованием разнообразных кристаллов льда. При медленных скоростях замораживания (от 1 до 10° в минуту) образуются гексогональные формы льда, которые локализируются в основном вне клетки. В процессе дегидратации клетки в результате понижения температуры такие кристаллы постепенно увеличиваются в размерах и могут оказывать внешнее механическое давление на клетки. При более быстрых скоростях замораживания (20—40° в минуту) как в клетке, так и вне ее образуются смешанные формы льда — гексогональный и кубический, кристаллы которых оказывают более губительное действие на клетку. При сверхбыстрых скоростях замораживания (300—400°

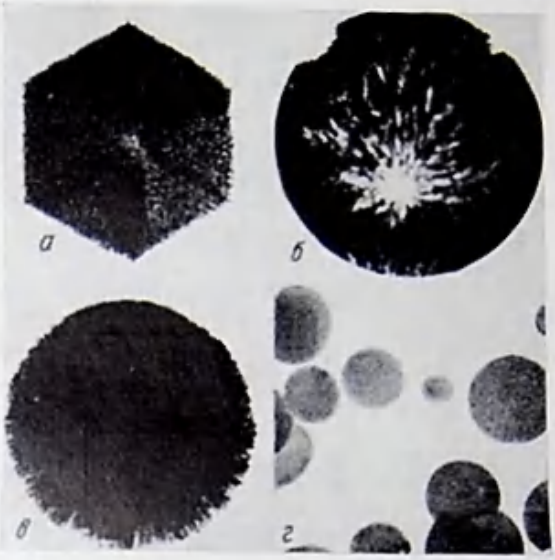
в минуту) затвердевание воды в клетках происходит почти мгновенно и в большом количестве образуется аморфный, так называемый «стекловидный» лед, в котором образуются особые структуры — быстроисчезающие сферуллиты. Опасность образования такого внутриклеточного льда в клетке очень велика, поскольку при их отогреве наступают процессы рекристаллизации, сопровождающиеся увеличением размеров кристаллов льда и необратимыми повреждениями клеточных структур.

Поэтому считают, что медленные скорости замораживания являются более благоприятными для выживания клеток. Как видно, при относительно медленных скоростях замораживания (1° в минуту) замораживание вызывает образование в основном крупных внеклеточных кристаллов, а при повышении скорости охлаждения образуются внутриклеточные кристаллы, которые в процессе хранения могут расти и вызывать необратимые повреждения клеточных структур и особенно биомембран. Вместе с тем медленное замораживание также может привести к гибели клетку, поскольку рост внеклеточных кристаллов сопровождается более или менее выраженной ее дегидратацией и увеличением времени контакта с гиперконцентрированными растворами. Кроме того, в таких условиях клетки сильно переохлаждаются, в результате чего давление паров в ней оказывается значительно выше, чем во внешнем льду. Такой температурный градиент способствует также тому, что вода из клетки начинает элиминировать более энергично, чем в обычных условиях. По мере прогрессирования внеклеточной кристаллизации внутри клетки увеличивается концентрация растворенных веществ, среди которых особой активностью обладают биологически эффективные электролиты (K^+, Na^+, Ca^{2+} и др.). Увеличение уровня электролитов выше критического влияет на структуру протеинов и их нативное состояние, а также изменяет их буферные свойства и pH. Биомакромолекулы, обычно не взаимодействующие в таких условиях, пространственно сближаются и могут реагировать друг с другом. Существенным моментом является также образование в клетке различных токсических метаболитов (мочевина, газы и др.). Не менее важным является соотношение свободной и связанной воды в клетке, поскольку последняя является крайне необходимой для поддержания третичной и четвертичной структуры биомакромолекул. Обычно считают, что потеря гидратной воды приводит к необратимым изменениям в макромолекулах. Такая гидратная вода клеток, образующая довольно прочные водородные связи с биомакромолекулами, способна формировать гексагональные решетки, подобные решеткам льда. На уровне гидрофобных связей такая вода образует пентагональные решетки, напоминающие кубический лед и характерные для структуры клатратов [431—435, 677, 678].

Кристаллографически выявлено, что третичная структура таких белков, как миоглобин, лизоцим, рибонуклеаза и оксигемоглобин, внешне окружена слоями гексагональных решеток воды, а

внутри спиралей расположены пентагональные клатратно-подобные структуры воды. Термодинамические расчеты показали, что гидрофобные связи, образованные такими решетками воды, играют большую роль в поддержании специфических свойств биомакромолекул. Например, структура ДНК в значительной мере зависит от состояния гидратационной воды, которая способствует стабилизации межмолекулярных сшивок спирали этой макромолекулы. Кроме того, ионные фосфатные группы, расположенные на поверхности нуклеиновых кислот, имеют значительные гидратационные связи за счет воды, имеющей гексагональную решетку. Спектроскопические данные свидетельствуют о том, что прочно связанная вода с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями приобретает клатратную структуру и при замораживании всей системы не изменяется. В связи с такой организацией биомакромолекул при медленном замораживании происходит очень постепенное включение клеточной воды во внеклеточный лед, что благоприятствует временной стабилизации макромолекул при таких экстремальных условиях. Действительно, при таких условиях имеется достаточно времени для перестройки структуры воды, стабилизирующей окружающие белки и ферменты клетки. Если температура снижается быстро, то группы из 4—6 молекул воды быстро образуют центры кристаллизации, которые способствуют дальнейшему росту кристаллов внутри клетки, т. е. в данном случае отсутствует какое-либо время для перестройки молекул воды и дегидратации клетки, что способствует дальнейшему росту внутриклеточных кристаллов, которые вызывают гибель клетки. Этот рост кристаллов внутри клетки обусловлен тем, что при быстром охлаждении возникшие многочисленные небольшие кристаллы термодинамически более подвижны и по сравнению с белками обладают способностью связывать воду значительно быстрее. Поэтому такие кристаллы способны очень быстро адсорбировать воду не только с поверхности белков, но и сконцентрированную во внутренней решетке спирали биомакромолекулы.

Следовательно, если будут созданы какие-то дополнительные условия внутри клетки, которые не позволят поглотить всю структурно-связанную воду, то возникновение внутриклеточных кристаллов при быстром охлаждении окажется не опасным для клетки. Вместе с тем имеется еще много невыясненных вопросов, связанных с возникновением внутриклеточного льда и реакцией на этот процесс замораживаемой клетки. Например, при быстром замораживании до —196° внутри эритроцита образуются кристаллы льда, однако клетки при этом не погибают. Медленно замороженные (1° в минуту) клетки опухолей и кожи подвергаются внутриклеточной кристаллизации, но сохраняют жизнеспособность в таких условиях. Клетки костного мозга, погруженные в жидкий азот в присутствии ПВП, также могут оставаться жизнеспособными, несмотря на то что в цитоплазме и ядре клетки происходит образование кристаллов льда. Как известно, ПВП почти не проникает



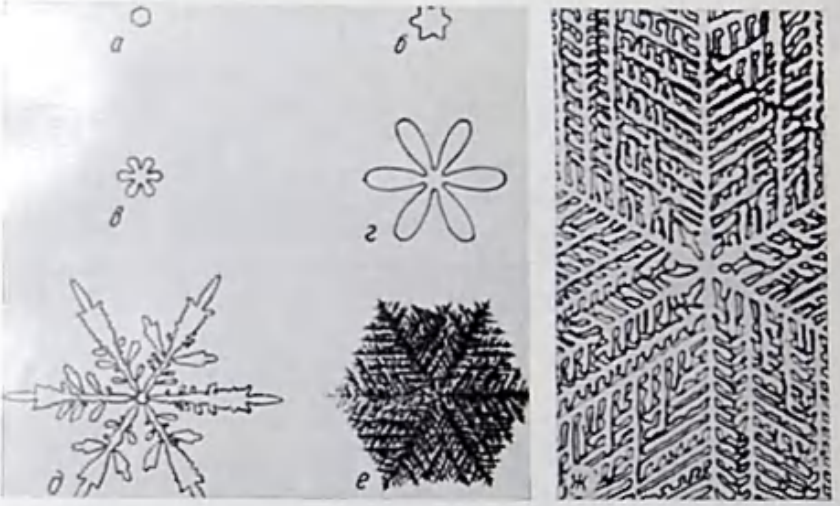
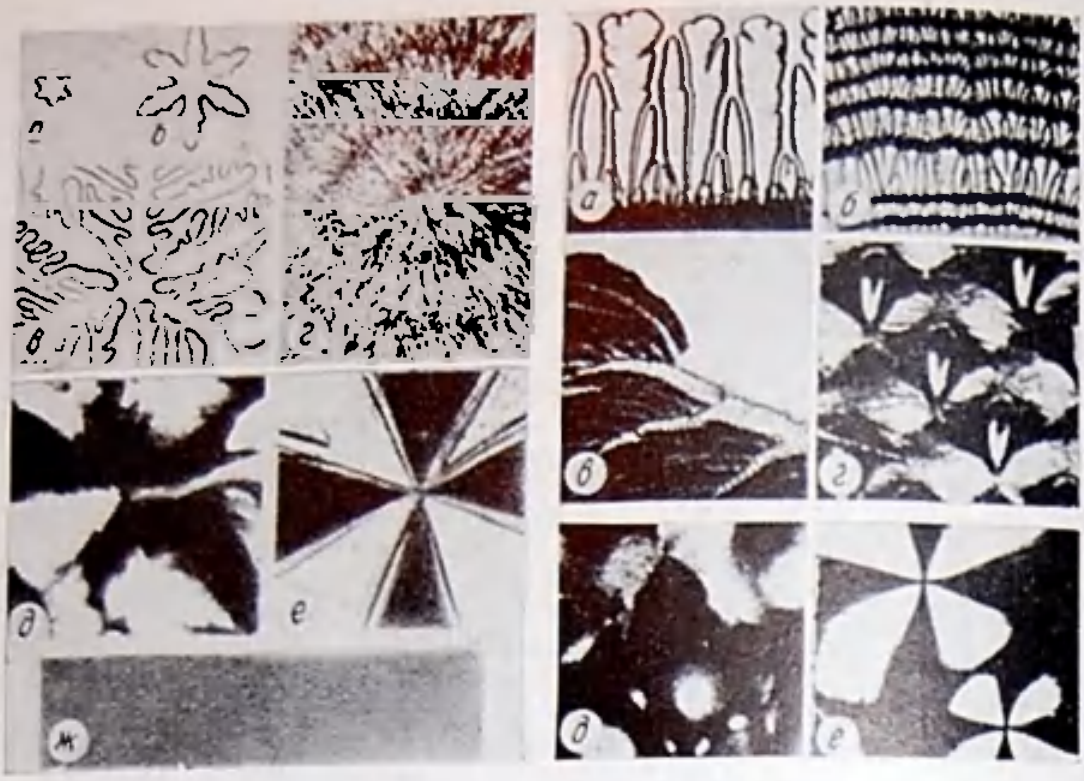


Рис. 18. Четыре основных типа формирования льда для водных растворов с различной степенью концентрационных градиентов и температур [524]:

а — гексагональные формы льда в 6М глицерине при —35°; *б* — неправильные дендриты в 10%-ной сахарозе при —65°; *в* — простые сферулиты в 6М глицерине при —60°; *г* — исчезающие сферулиты в 50%-ной сахарозе при —45°. Толщина препаратов 0,02 *мм*

Рис. 19. Формы гексагонального льда при высоких субнулевых температурах в 35%-ных растворах альбумина [524]:

а, *б*, *в*, *г* — при —1,5°; *д* — при —2°; *е* — при —2,5°; *ж* — гексагональный кристалл, выращенный при —2° в 35%-ном растворе альбумина. Срезы толщиной 0,01 *мм* × 102.



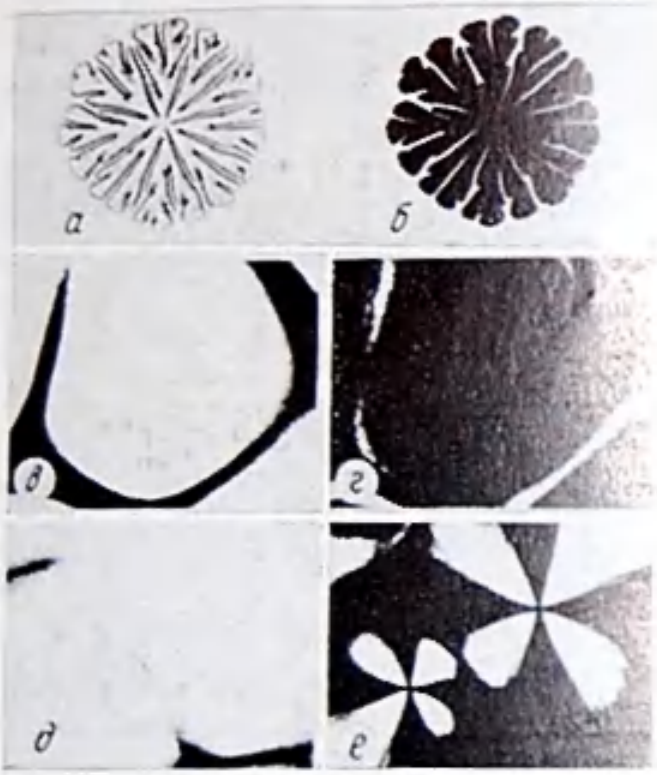


Рис. 20. Влияние скоростей замораживания на структуру льда:

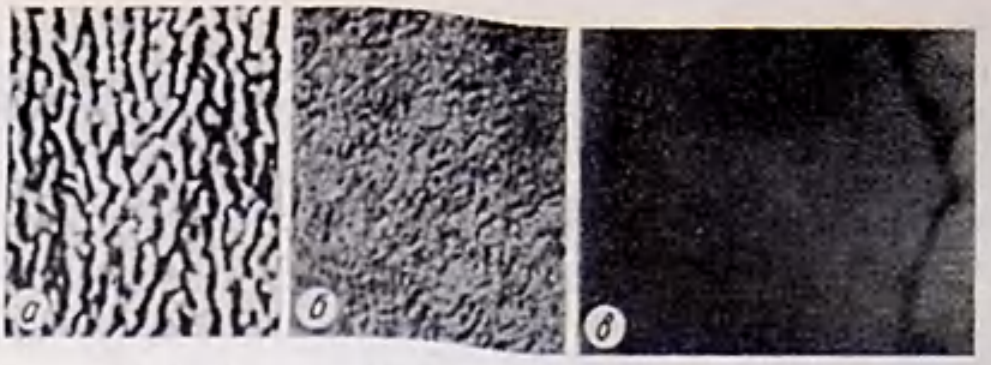
а, б, в — неправильные дендриты; *г* — грубые сферулиты; *д* — исчезающие сферулиты; *е* — характерная для грубых сферулитов лучистость; *ж* — промежуточное строение льда

Рис. 21. Формирование льда промежуточных типов при —10° [628]:

а — дольки «неправильных розеток», исчезающих сферулитов; *б* — тип «колловада»; *в* — тип «ряби»; *г* — тип кожуры «ананаса»; *д* — «усоподобные» сферулиты; *е* — быстро исчезающие сферулиты в поляризованном свете

Рис. 22. Процессы рекристаллизации в розетках и исчезающих сферулитах [661]:

а — розетки, формирующиеся в 50%-ном желатине при —30°; *б* — розетки, выращенные при —8°; *в, г, д* — исчезающие сферулиты, сформированные в 30%-ном желатине при —40° и —8°; *е* — снимки в поляризованном свете. Срезы толщиной 0,02 мм. × 70 (*а, б*); × 47 (*в, г*); × 58 (*д, е*).



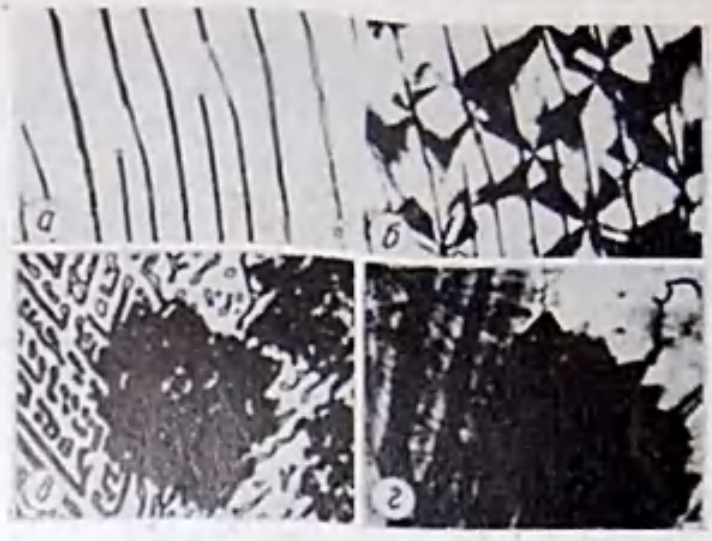




Рис. 23. Электронная микрофотография ультраструктуры исчезающих сферулитов, сформированных в растворах желатина [524]:

а — дендровидное строение среза при низких скоростях замораживания; *б* — при высоких скоростях; *в* — при сверхвысоких скоростях

Рис. 25 Первичная и вторичная кристаллизация в растворах глицина и β-аланина [524]:

а — первичная кристаллизация в 20%-ном растворе глицина при —4°; *б* — вторичная кристаллизация внутри исчезающих сферулитов при —10° (в поляризованном свете); *в* — вторичная кристаллизации внутри полиэдра в 20%-ном растворе β-аланина при —18°; *г* — вторичная кристаллизация внутри регулярных дендритов в 20%-ном растворе β-аланина при —30° × 80.

Рис. 26. Стадия вторичной кристаллизации в 10%-ном растворе хлористого натрия [524]:

а — лед; *б* — концентрированный раствор соли.

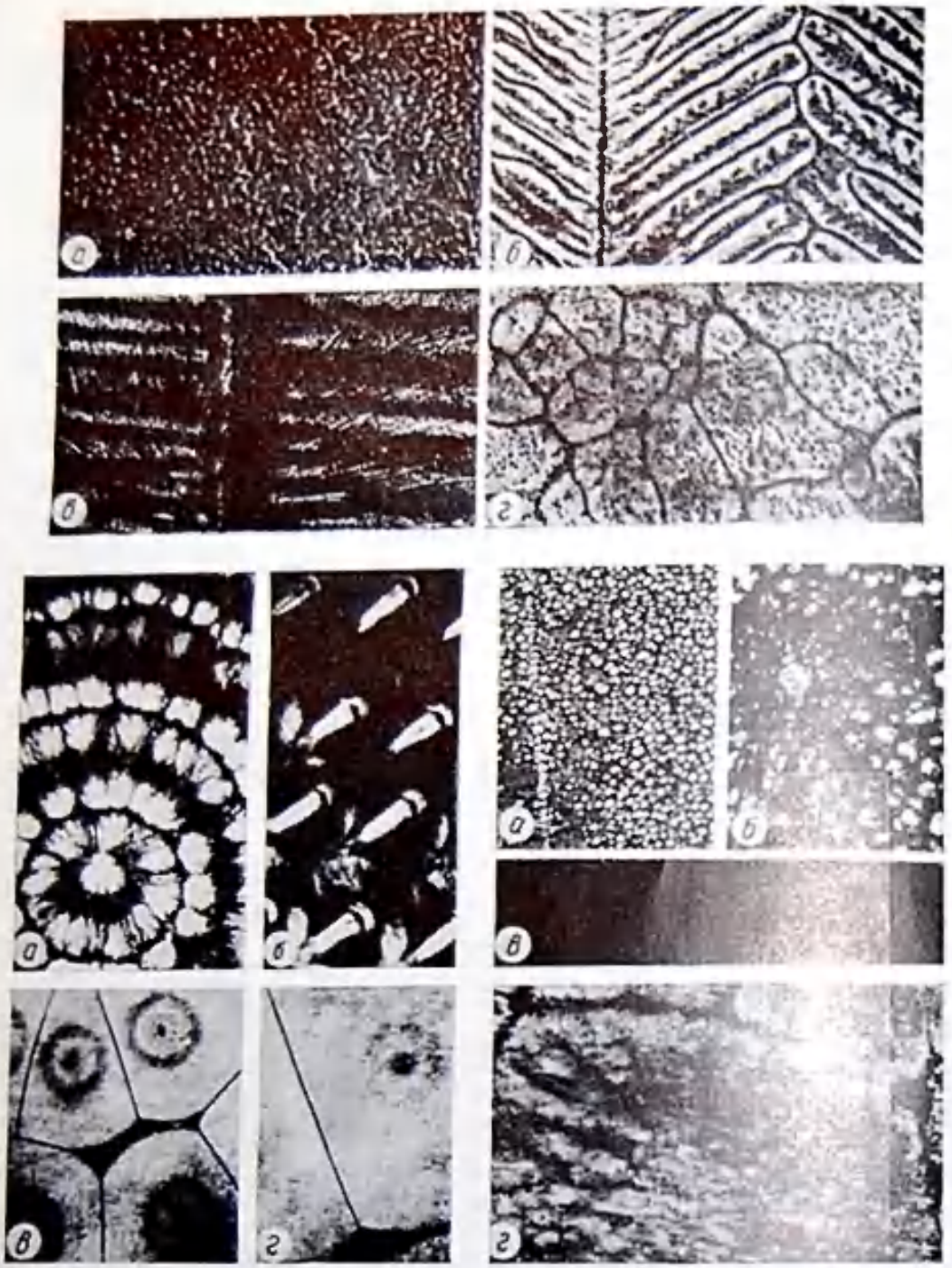


Рис. 27. Тонкий слой 20%-ного раствора хлористого калия, замороженного и замороженно-высушенного по методу «желатинового сэндвича» [526]:

а — быстро исчезающие сферулиты в полигональном ракурсе; *б* — регулярные дендриты льда, в составе кристаллов солей; *в* — исчезающие сферулиты, расположенные в регулярных дендритах; *г* — кристаллизация солей у краев исчезающих сферулитов в солевом растворе в присутствии альбумина. Толщина срезов 1 *мк*.

Рис. 28. Динамика развития фаз льда в различных растворах [520]:

а — 10%-ный альбумин при —40°; *б* — 30%-ный желатин при —20°; *в* — 50%-ная сахароза при —40°; *г* — деталь позиции *в*. Срезы 0,2 *мм*. × 74.

Рис. 30. Процессы рекристаллизации в тонких срезах раствора желатина [526]:

а — исчезающие сферулиты; *б* — микроокружение вокруг центра исчезающего сферулита; *в* и *г* — процессы спонтанной рекристаллизации вдоль края исчезающего сферулита. Срезы толщиной 1 *мк*.

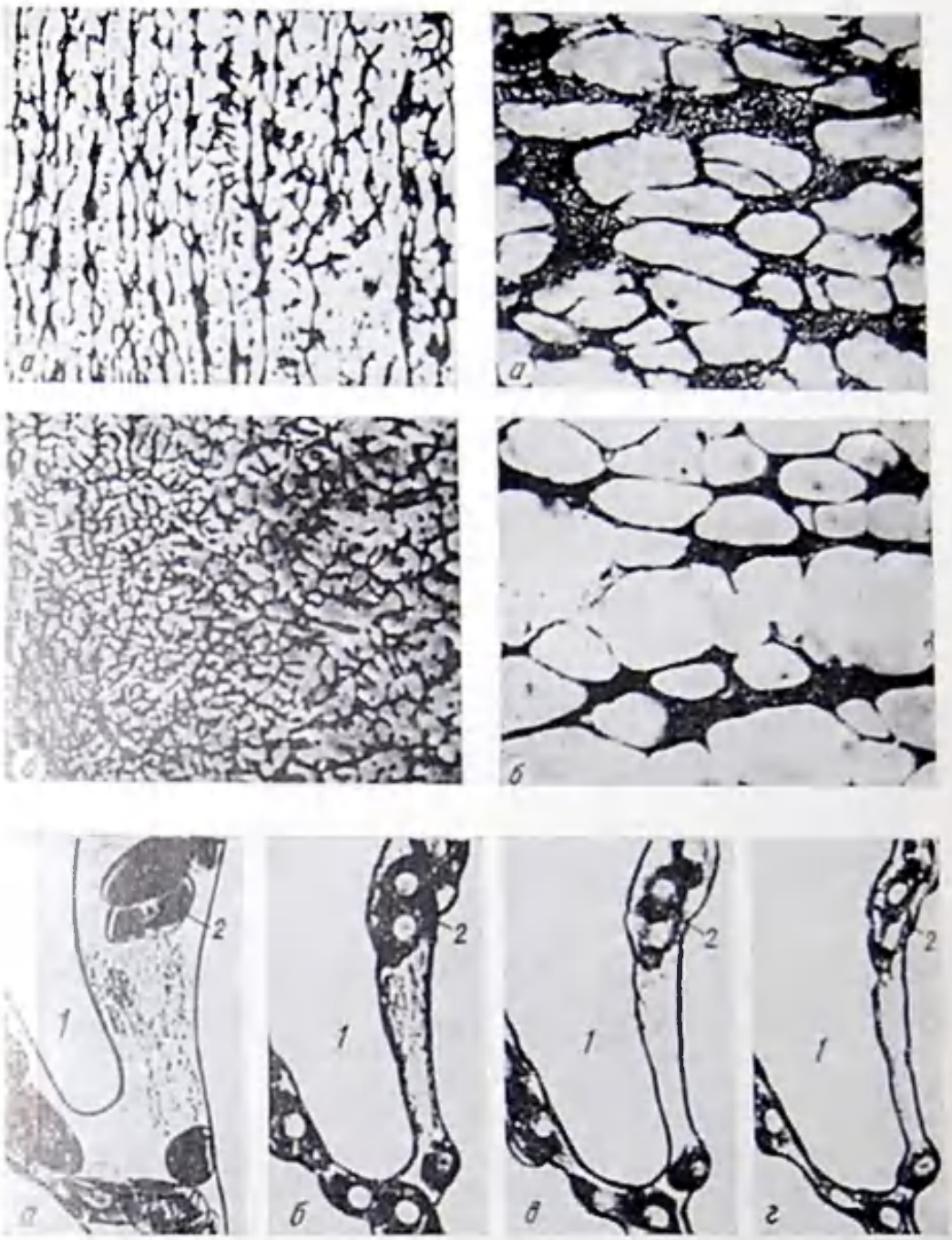


Рис. 48. Продольный (*а*) и поперечный (*б*) срез быстро замороженного мышечного волокна [551, 551а].

Толщина срезов 1 *мк*. × 6500.

Рис. 49. Поперечный (*а*) и продольный (*б*) срез мышечного волокна, замороженного до —150° и отогретого до —15° через стадию рекристаллизации [551].

Толщина срезов 1 *мк*. × 6500.

Рис. 50. Влияние медленного замораживания на клетки крови лягушки при высоких субнулевых температурах [661]:

а — при —1,5°; *б* — при —5°; *в* — при —7°; *г* — при —10°; *1* — поля льда; *2* — клетки крови. Срезы толщиной 0,005 *мм*. × 100.

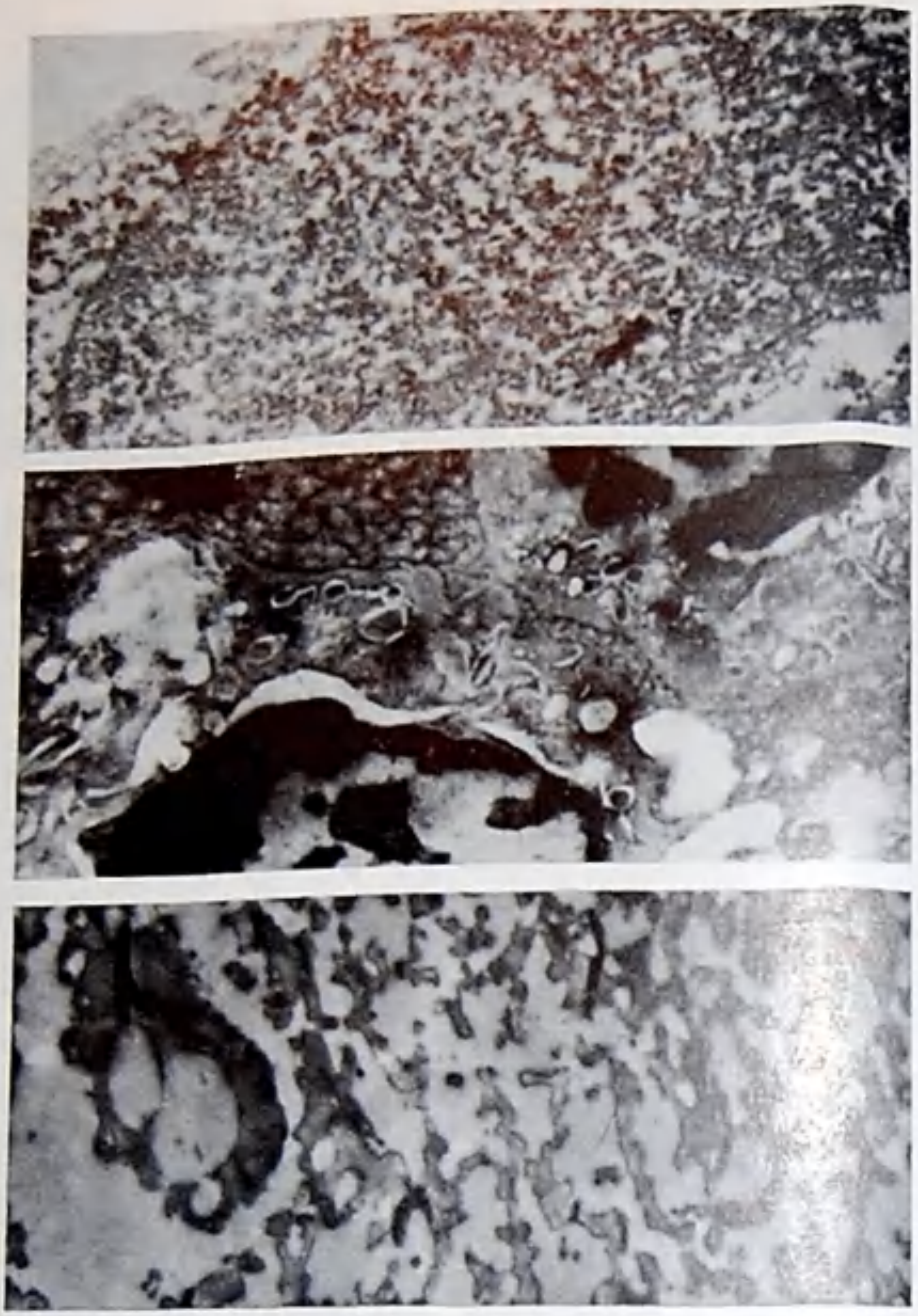


Рис 90. Электронограмма замороженных клеток костного мозга в растворе ЦОЛИПК-3 при температуре —90°.

Внеклеточное льдообразование. Клетки уменьшены в размерах и располагаются между большими острыми кристаллами размером от 2 до 10 мк. × 10 000.

Рис. 91. Замораживание клеток костного мозга в растворе ЦОЛИПК-3 с добавлением 15%-ного полиэтиленоксида при температуре —90°.

Резкое ослабление процессов вне- и внутриклеточной кристаллизации, редко встречающиеся глыбки льда небольших размеров (1—1,5 мк) расположены вдоль клеточной мембраны. Основная масса замораживаемой взвеси имеет мелкокристаллическую структуру. × 20 000.

Рис. 92. Замороженные клетки костного мозга в растворе ЦОЛИПК-3 с добавлением 8%-ного поливинилпирролидона при температуре —90°.

Внеклеточная кристаллизация при добавлении ПВП значительно отличается от кристаллизации при использовании других криопротекторов. Кристаллы мелкие, большие глыбки льда отсутствуют. × 5000.

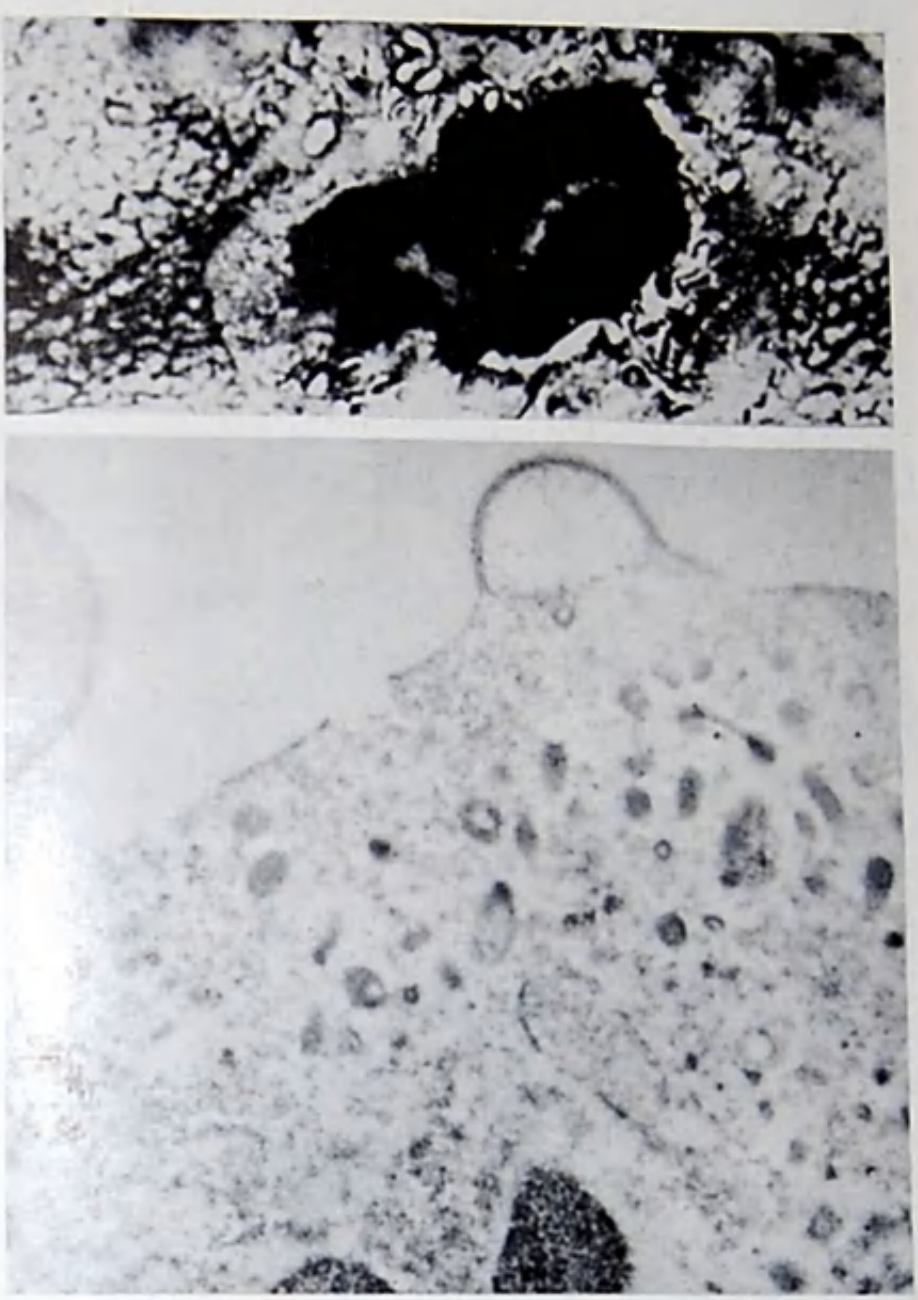
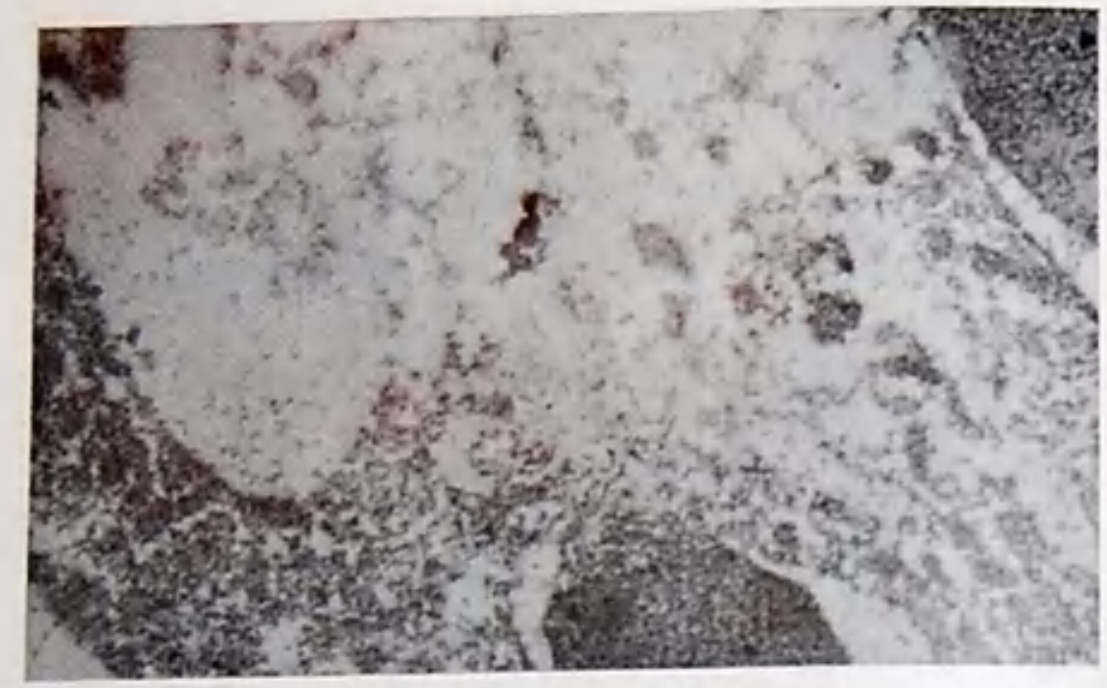


Рис. 93. Замороженные клетки костного мозга в растворе ЦОЛИПК-3 с добавлением 10%-ного ДМСО при температуре —90°.

Отмечается равномерная мелкокристаллическая структура как вне клеток, так и внутри клеток. × 10 000.

Рис. 94. Участок нейтрофильного гранулоцита с образовавшейся под наружной мембраной вакуолью в результате 2-часового пребывания в растворе ЦОЛИПК-3 при температуре + 4°. × 22 000.



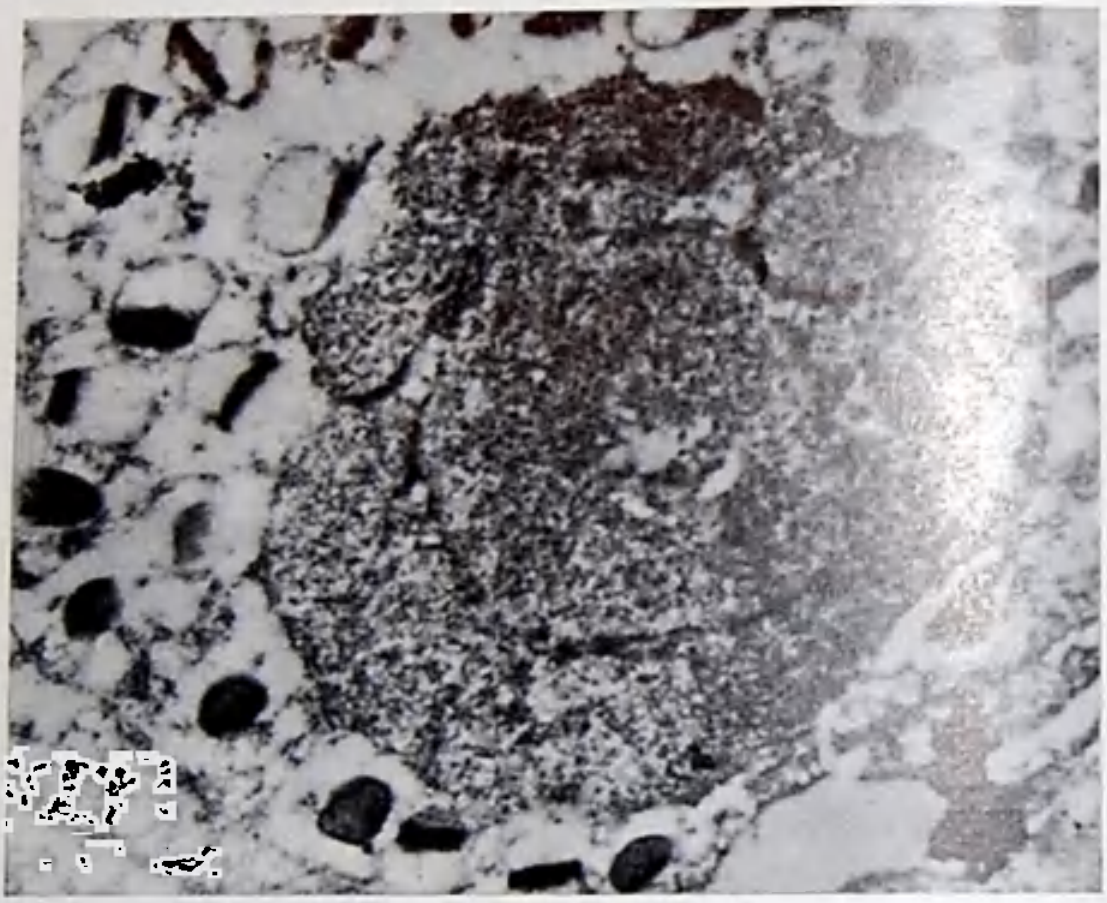


Рис. 95. Гранулоцит после экспозиции в растворе ЦОЛИПК-3 с 10%-ным ДМСО при температуре +4°.

Ядро и протоплазма сильно уплотнены, в клетке видны трещины и разрывы. × 19 000.

Рис. 96. Ацидофильный гранулоцит после 30-минутной экспозиции в растворе ЦОЛИПК-3 с 15%-ным глицерином.

В цитоплазме большие зоны разрушения вокруг секреторных гранул. × 18 000.

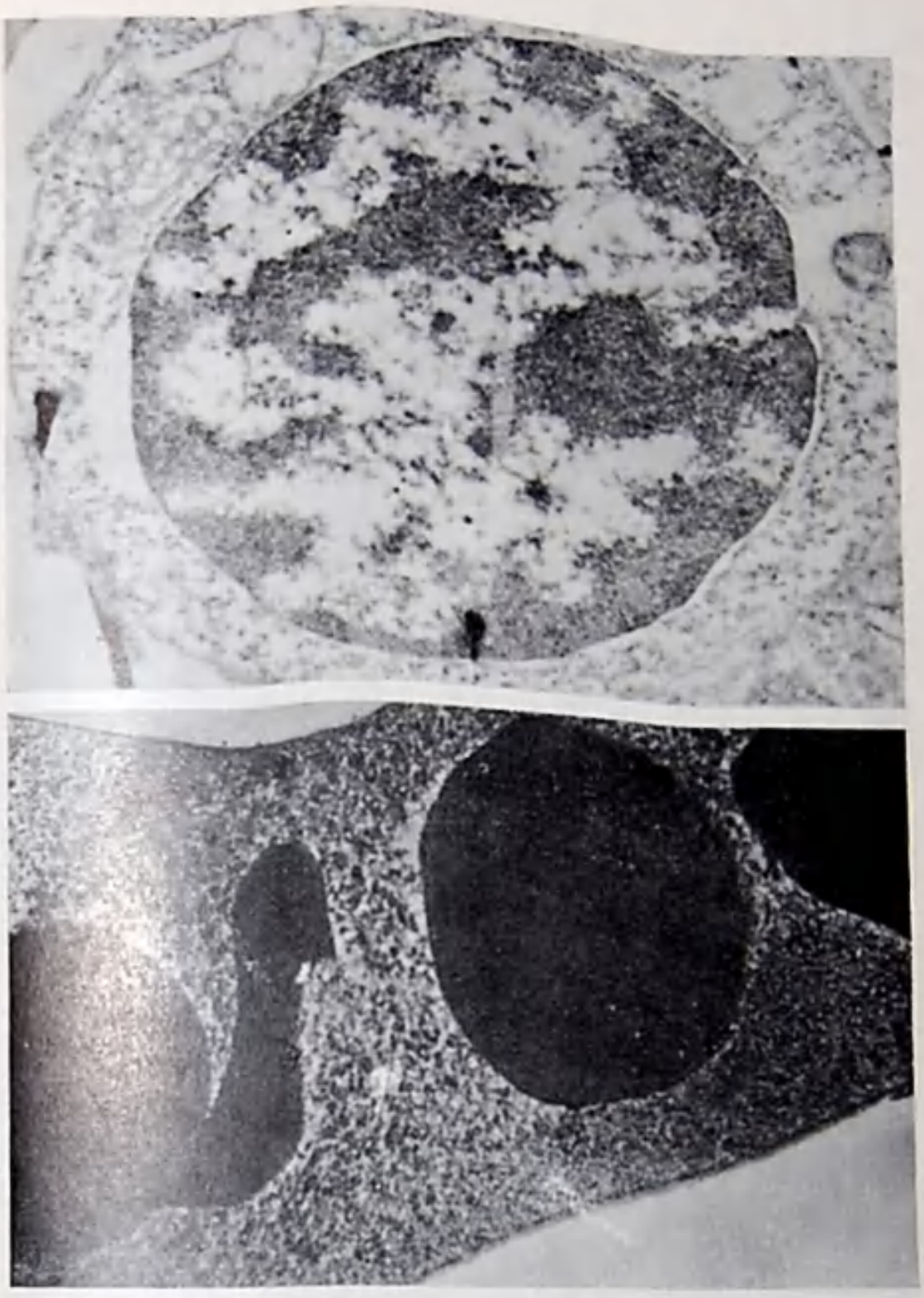


Рис. 97. Полихроматофильный эритробласт после одночасовой экспозиции в растворе ЦОЛИПК-3 с 15%-ным ПЭО-400.

Наблюдается некоторое набухание аппарата Гольджи, митохондрий, а также расширение перинуклеарной зоны. × 12 000

Рис. 98. Каналец льда с находящимися в нем эритроцитами.

Образование канальцев происходило в результате действия консервирующего раствора, содержащего 15%-ный ПЭО-400. × 6000.

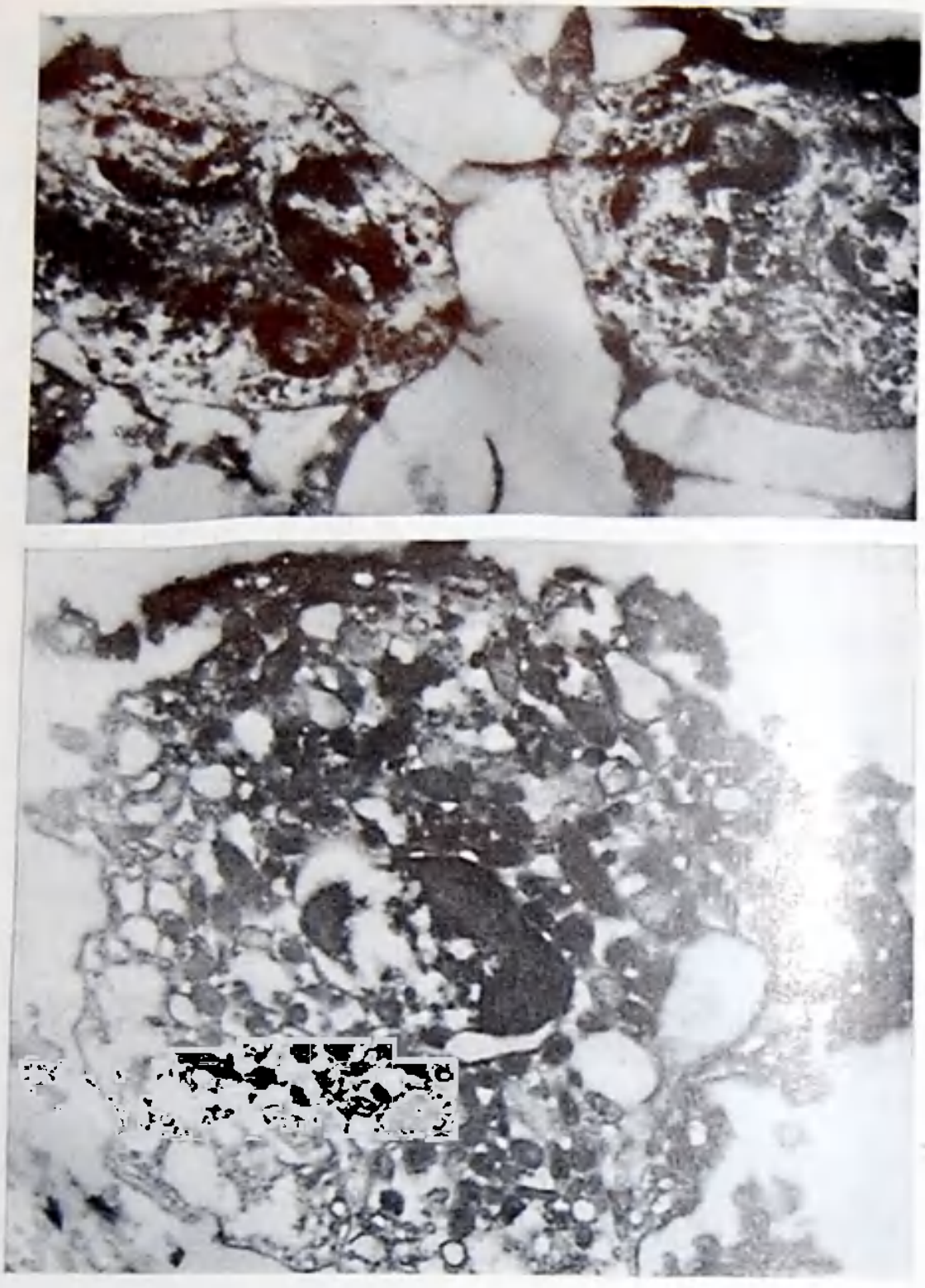


Рис. 99. Нейтрофильные гранулоциты, замороженные с ПЭО-400 до температуры —196°

Клетки имеют нормальное строение; повреждений, вызванных действием низких температур, не обнаруживается. × 7000.

Рис. 100. Гранулоцит, замороженный с глицерином до температуры — 196°. Клетка сильно повреждена внутриклеточным льдом. × 13 000.

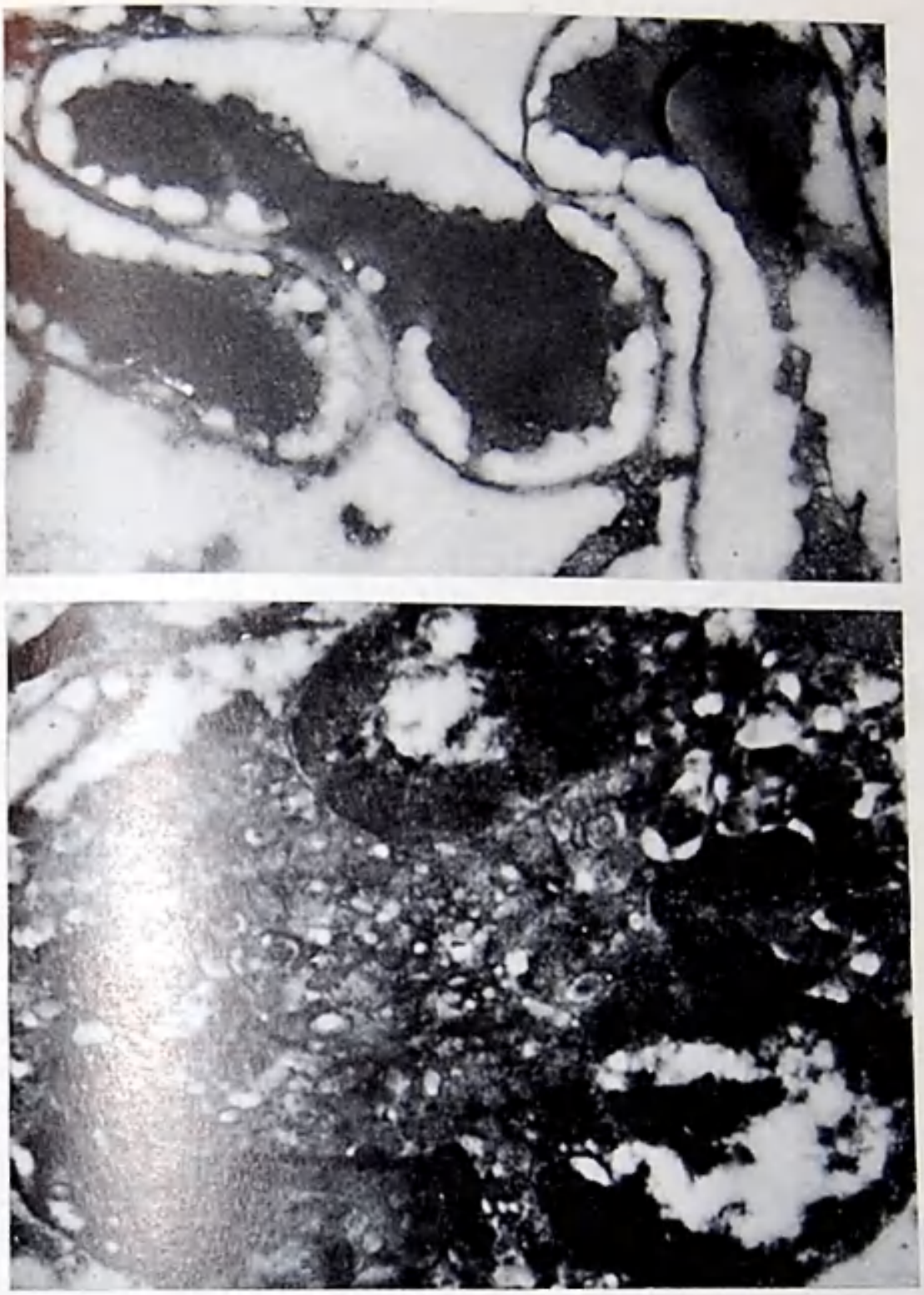


Рис. 101. Эритроциты, замороженные до температуры —196° с глицерином из переохлажденного состояния.

Ледяные кристаллы, образовавшиеся вдоль наружной оболочки, оттесняют содержимое эритроцита к центру клетки. × 12 000.

Рис. 102. Гранулоцит, отогретый после замораживания с глицерином; клетки сильно повреждены внутриклеточным льдом. × 18 000.

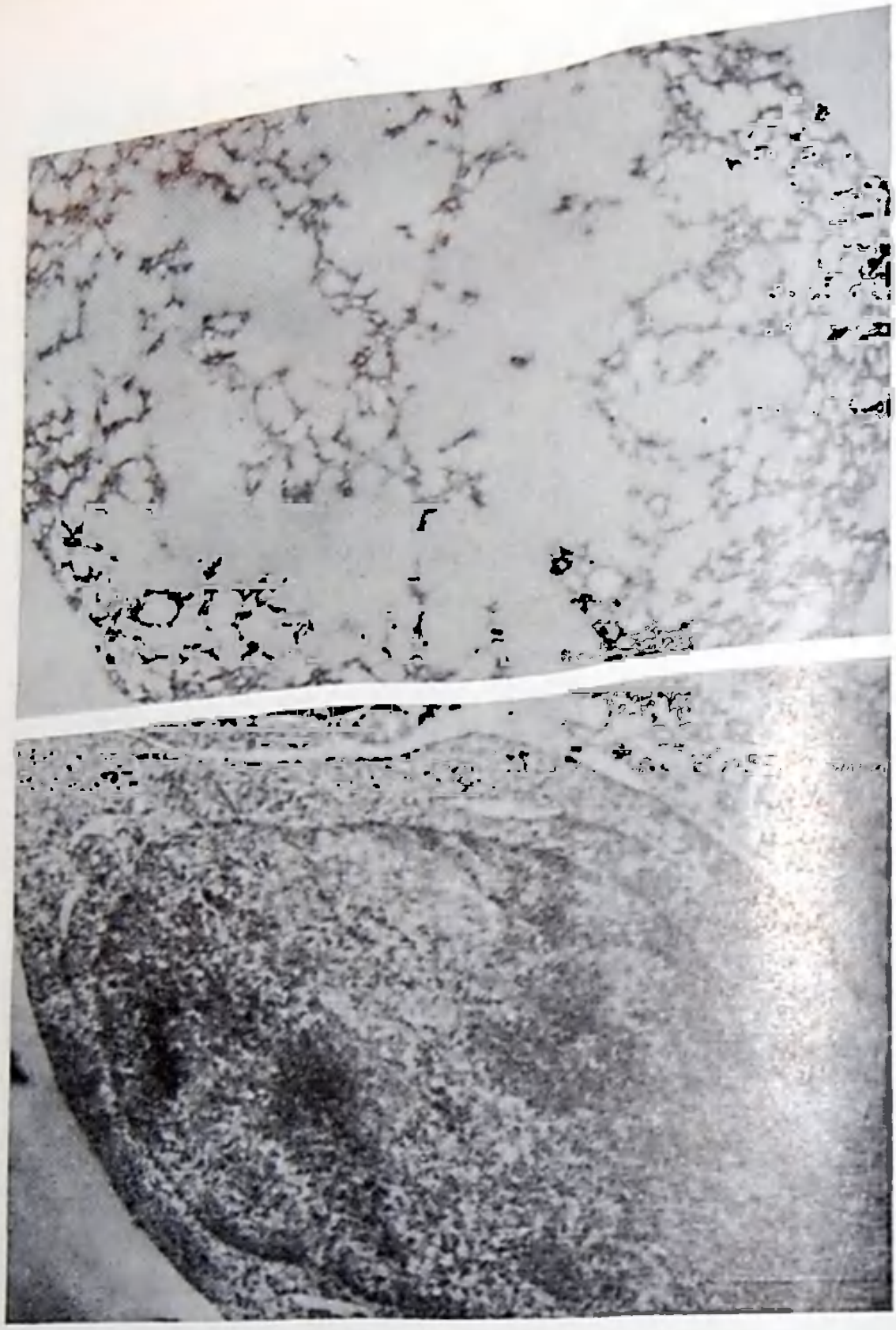


Рис. 103. Повреждения в эритроците, вызванные внутриклеточным льдом после замораживания и отогрева под защитой 10%-ного раствора ДМСО. × 15 000.

Рис. 104. Гемоцитобласт после замораживания и отогрева с ПЭО-400.
Клетка сохраняет нормальное строение, отмечается лишь некоторая размытость структур × 10 000.

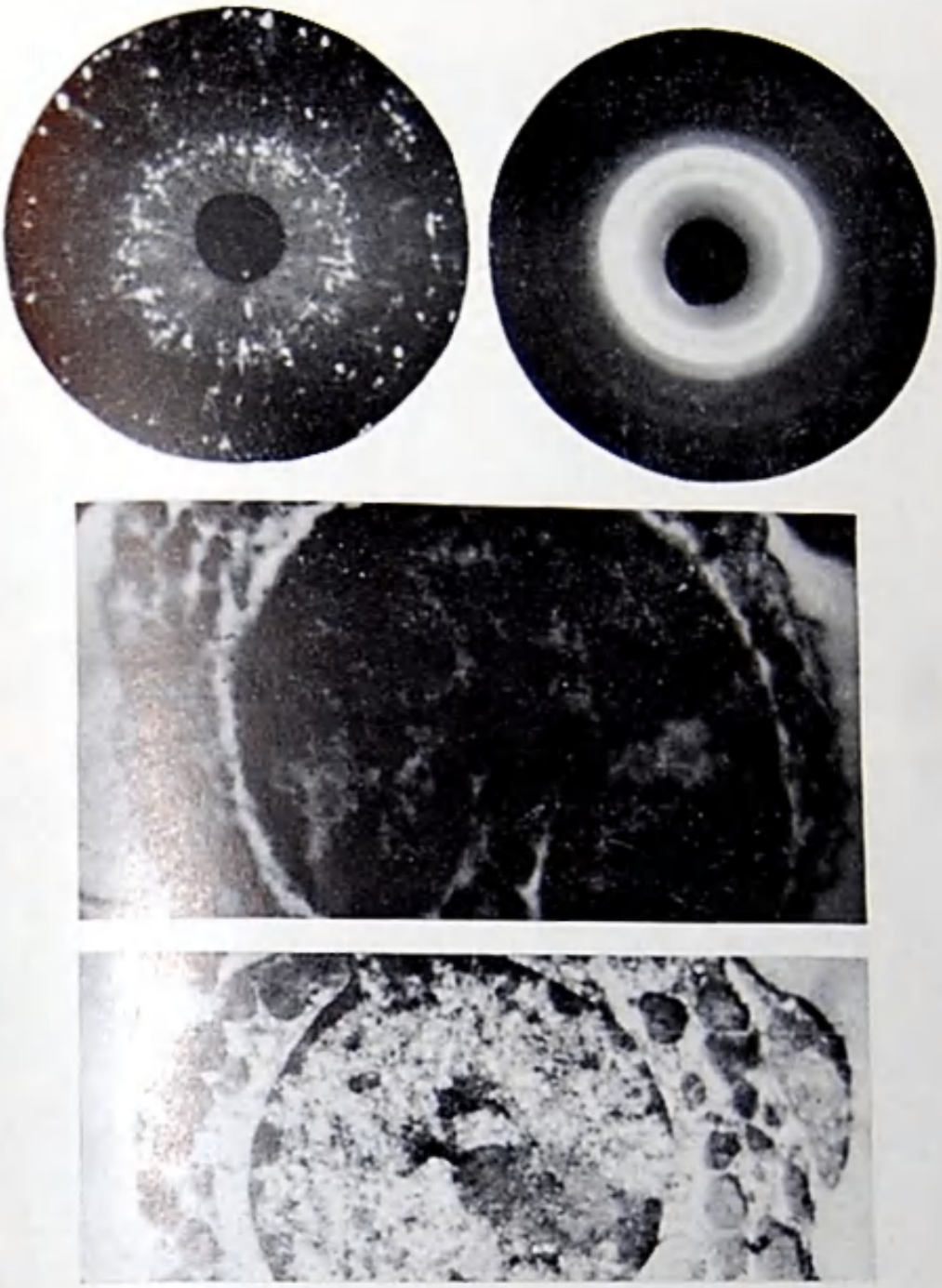


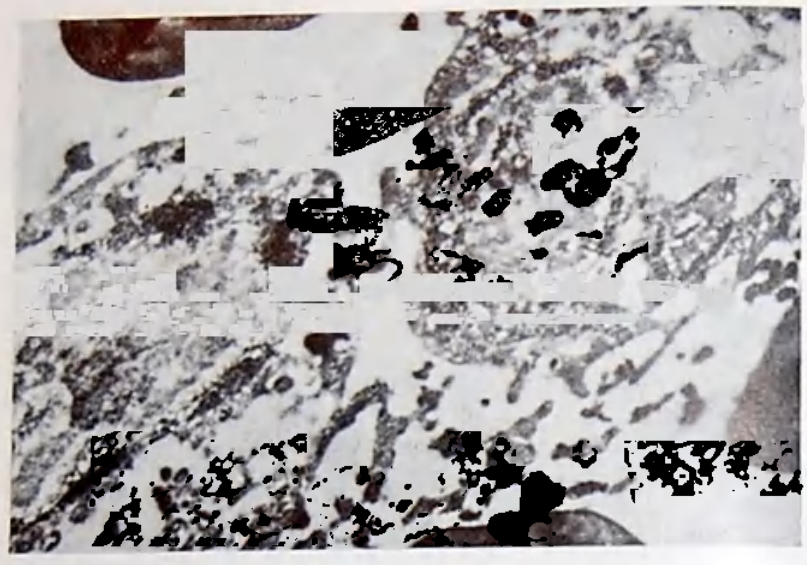
Рис. 105. Рентгенограмма суспензии клеток костного мозга в 20%-ном растворе ДМСО. Видны четкие дифракционные кольца, свидетельствующие о мелкокристаллической структуре замороженного препарата. Реплики мелкие, хорошо укладываются на дебаевские дуги.

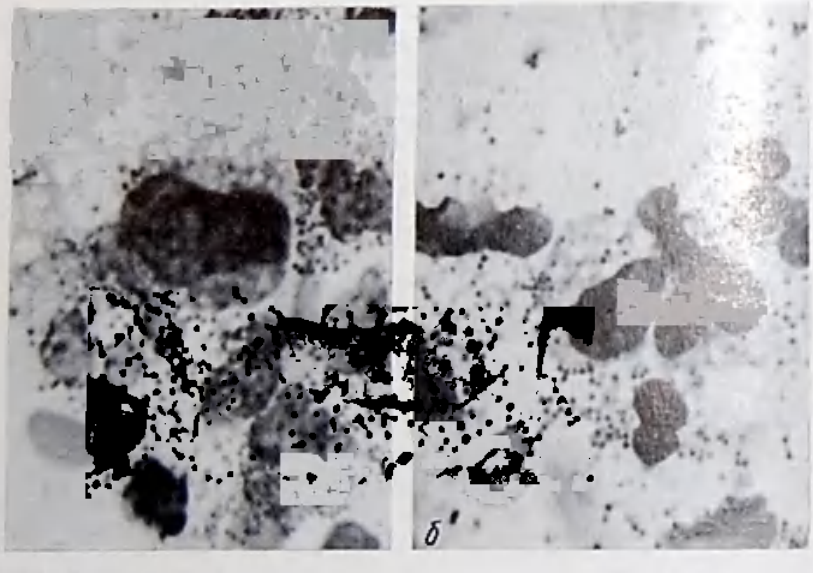
Рис. 106. Рентгенограмма ПЭО-400.

Видно широкое однородное гало в области малых углов, что свидетельствует об аморфности замороженного образца

Рис. 107. Миелоцит после часовой экспозиции в растворе ПОЛИПК-3. × 18 000.

Рис. 108. Эозинофильный миелоцит после замораживания и оттаивания под защитой ПЭО-400. × 18 000.





а

Рис. 109. Сегментоядерный нейтрофил и метамиелоцит после часовой экспозиции костного мозга с глицерином. × 12 000.

Рис. 110. Фагоцитарная активность клеток костного мозга:
а — до консервации, *б* — после реконсервации под защитой ПЭО-400. × 1200.

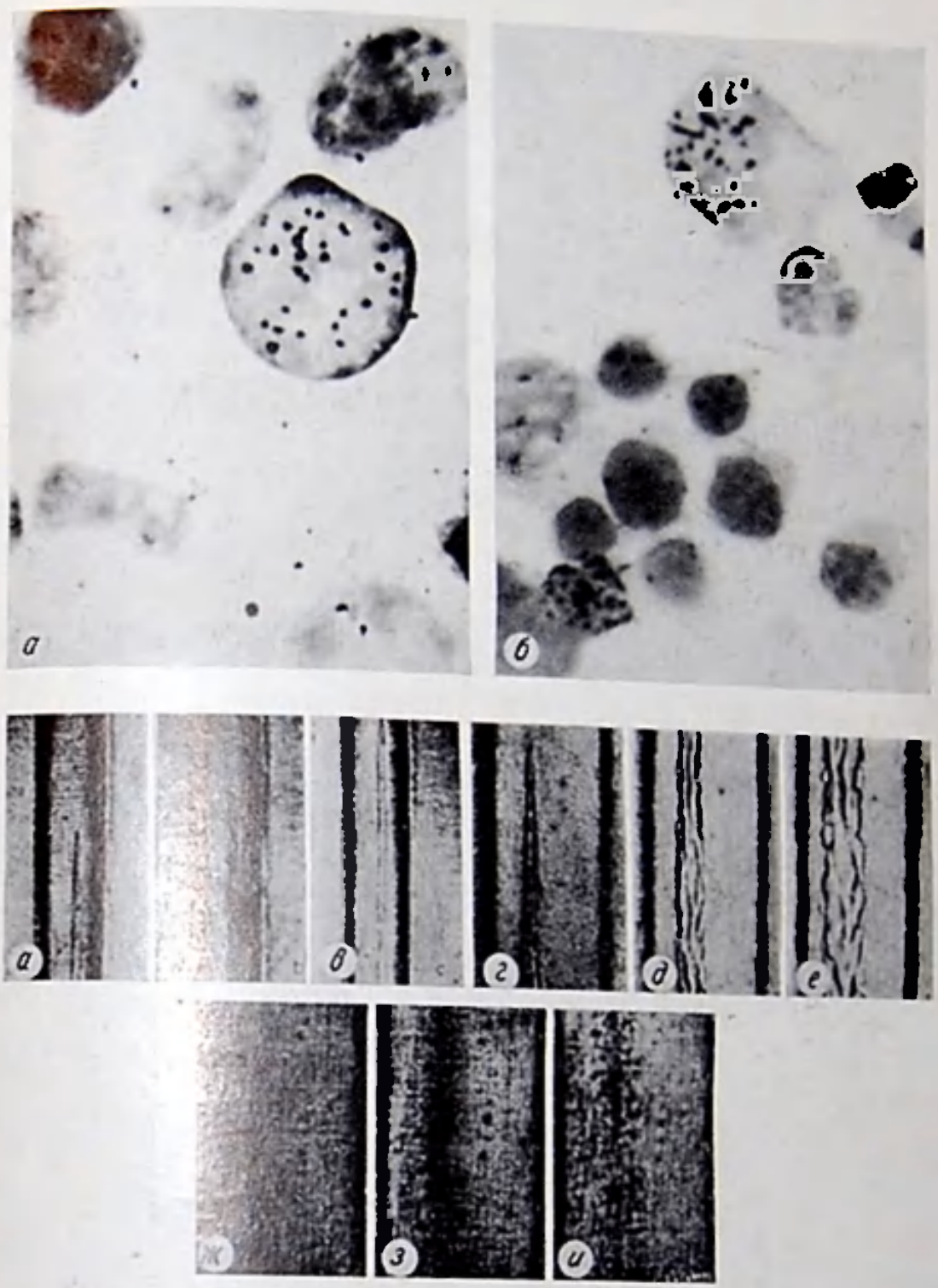


Рис. 112. Включение H^3-тимидина в миелокариоциты [73]:
а — до консервации, *б* — после замораживания — оттаивания. × 1200.

Рис. 125. Гистограммы развития и роста кристаллов льда в мышце [491]:
а, б, в — частично дегидратированная мышца, замороженная до —7°; *г, д, е* — необезвоженный актомиозин, замороженный до —2,5° (отмечаются деформации фибрилл актомиозина); *ж, з, и* — фибрилла актомиозина, замороженная до —3°. Отмечается нарастание мозаичности клетки. × 310.



Рис. 127. Поперечный срез сигнального нерва лягушки, замороженного в изопентане при температуре —60° и лиофилизированного при —60° [567].

Срезы толщиной 1 мк. × 9800

Рис. 130. Срезы суспензии бактерий, замороженные при различных условиях [567].

Chromobacterium lividum: *а* — контроль, *б* — в дистиллированной воде до —150°; *E. coli*: *в* — до —150° в дистиллированной воде, *е*—в 15% ной сахарозе до —150°; *Chromobacterium lividum*: *г* — в 15%-ной сахарозе до —150°; *Bacterium megaterium*: *д* — в 15%-ной сахарозе до —150°. × 44 000.

внутрь клеток и, следовательно, его вклад в формирование внутриклеточных кристаллов как криопротектора очень мал и им фактически можно пренебречь. Более того, в последнее время показано, что клетки в таких условиях защищены от вредного действия низких температур даже в том случае, если полностью ингибировать возможность пиноцитоза ПВП или другого полимера внутрь клетки. Таким образом, эти вопросы остаются открытыми [683, 733].

Остается также неясным вопрос механизма действия различных низкомолекулярных веществ, которые независимо от их криозащитных способностей снижают концентрацию электролитов в соответствии с образованием льда во время замораживания. Как известно, почти все вещества, растворимые в воде, способны замедлять рост кристаллов льда. Методом дифракции рентгеновских лучей было выявлено, что растворы «истинных» криопротекторов при замораживании как будто способствуют формированию так называемого стекловидного льда, в то время как соединения, не способные оказывать протекторный эффект, образуют главным образом гексагональные кристаллы [251, 252, 254—257]. Скорость образования льда, как известно, во многом зависит от способности того или иного вещества образовывать водородные связи — чем выше это свойство, тем быстрее снижается скорость роста кристаллов льда и наоборот. Показано, что соединения, обладающие способностью образовывать большое число водородных связей с жидкой фазой, проявляют, как правило, защитные свойства. Такое свойство этих соединений способствует уменьшению количества способной к кристаллизации воды в клетке и изменению характера самой кристаллизации — возникает так называемый мелкозернистый «стекловидный» лед. Поэтому клеточные структуры, которые принципиально могут изменяться в присутствии внутриклеточного льда из-за потери воды, оказываются защищенными, поскольку предупреждается образование кристаллического льда [249, 252]. Указанную выше концепцию Деблера по механизму криозащитного действия различных соединений разделяют многие исследователи в криобиологии.

Согласно другим воззрениям, гибель клеток при замораживании является результатом необратимой потери структурно-связанной клеточной воды, которая обеспечивает, как известно, метаболическую и структурную целостность биомакромолекул, биомембран и субклеточных образований клетки. Было отмечено, что глицерин связывает воду клетки и уменьшает долю кристаллизационных процессов, что снижает уровень и темп ее дегидратации [555]. Глицерин в данном случае действует не только первично, связывая воду, но и путем образования стабилизированных участков ориентированной воды вокруг каждой молекулы. Поэтому существует мнение, что разрушение гидратных структур мембран клеток является, очевидно, одним из основных механизмов повреждения при замораживании на фоне химических последствий образования

льда. Защитные вещества, связывающие водород до определенной степени, могут стабилизировать поверхностную гидратацию клетки за счет упрочения гидратационных решеток, окружающих белки, что уменьшает возможность их повреждения при замораживании [248, 410]. Образно говоря, защитные вещества как бы предварительно «замораживают» клетку, предупреждая потерю воды, удерживающую структурную конфигурацию биомакромолекул и мембран клетки.

КЛАССИФИКАЦИЯ И ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КРИОПРОТЕКТОРОВ

Защитное действие на клетки при замораживании оказывают самые разнообразные соединения (табл. 47). Число этих соединений с каждым днем возрастает. Как известно, научное обоснование использования криопротекторов было дано в результате экспериментов с глицерином [642, 644], использованным вначале для замораживания половых клеток животных и крови [755], затем для самых различных биологических объектов. В дальнейшем было установлено, что криопротекторной способностью обладают многие соединения (табл. 47).

В настоящее время все защитные вещества условно разделены на две основные группы: на вещества эндо- и экстрацеллюлярного механизма действия [566, 568]. Очевидно, следует выделить еще один класс криопротекторов, которые обладают смешанным эффектом действия — эндо-экстрацеллюлярным. Однако классифицировать криопротекторы строго по их способу действия пока не удается, поскольку одно и то же соединение по-разному влияет на клетку. Например, внеклеточно расположенный глицерин является хорошим криопротектором для неоплодотворенных яиц мышей и спермы быка, тогда как проникший в клетку глицерин оказывается уже токсичным для них. Кроме того, криозащитная способность любого соединения очень варьирует в зависимости от типа ткани и различна даже для одного и того же типа ткани от различных животных. Глицерин почти не оказывает криозащитного эффекта на эритроциты быка и в то же время является эффективным при замораживании эритроцитов человека. Замороженный до —80°в 15%-ном глицерине костный мозг человека аналогичным образом дает примерно 60—58% выживания, тогда как те же клетки мыши при таких же условиях погибают на 88% [285, 498, 499]. Причина этого различия во многом остается неясной, хотя предполагают, что это зависит от ряда физико-химических факторов, биологической вариабельности структур клетки и ее функционального состояния. Если, например, в одни клетки глицерин проникает очень легко, то в случае других он способен лишь адсорбироваться на их поверхности [852]. Скорость пассивной диффузии какого-либо криопротектора через биомембрану зависит от растворимости соединения, его

Таблица 47

Характеристика криозащитного действия различных соединений [414]

Соединения	Клетки или ткань	Автор
Ацетамид	Эритроциты человека, клетки почек человека в культуре ткани, бычья сперма, трипаносомы, ткань сердца эмбриона цыпленка	[417, 495, 645]
L-аланин	Костный мозг мыши	[635—637]
Альбумин	Эритроциты человека	[717]
Уксуснокислый аммоний	Эритроциты человека	[565]
Хлороформ	Сердце собаки	[см. 414]
Холин	Костный мозг мыши	[146]
Декстраны	Эритроциты человека, костный мозг мыши	[146, 181, 864]
Диэтиленгликоль	Эритроциты человека и культивированные клетки почек человека	[586, 587]
Диметилацетамид	Эритроциты и культивированные почечные клетки	[586, 587]
Диметилформамид	Эритроциты, почечные клетки человека	[587]
Диметилсульфон	Клетки почки человека	[см. 414]
Диметилсульфоксид	Бычья кровь, эритроциты человека, лейкоциты человека, хлоропласты помидоров, культура почечных клеток, бычья сперма, роговица кролика и человека, матка морской свинки, сердце крысы	[378, 498, 499]
Эритрол	Эритроциты человека и костный мозг мышей	[146, 495]
Этанол	Эритроциты человека и культура почечных клеток человека	[494, 495]
Этиленгликоль	Эритроциты человека, культура почечных клеток человека, костный мозг мышей, кожа мышей и крыс	[146, 494, 495]
Формамид	Культура почечных клеток человека, эритроциты человека, ткань сердца эмбриона цыпленка	[417, 495]
Глюкоза	Кровь быка, эритроциты человека, костный мозг мышей, сердечная ткань эмбриона цыпленка, культура почечных клеток человека, сперма быка, трипаносомы	[146, 494, 517, 645]
Глицерин	Кровь быка, эритроциты человека, сперма быка, трипаносомы, лейкоциты, культура почечных клеток человека, костный мозг	[198, см. 414]
	мышей, кроликов, человека, кожа мышей, крыс, роговица кролика, сердце хомяка и мышиного эмбриона, почки собаки, митохондрии печени крыс	[495, 515, 556]
		[562, 567, 663]

Продолжение табл. 47

Соединения	Клетки или ткань	Автор
Глицин	Костный мозг мышей	[334, 635—637]
Гидроксикрахмал	Эритроциты человека	[251, 252, 636]
Инозитол	Костный мозг мышей и культура почечных клеток человека	[146, 682, 683]
Лактоза	Кровь человека, эритроциты человека, костный мозг мышей	[146, 681, 788, 862]
Хлористый магний	Кровь, сердце крысы	[139, 413, 414]
Сернокислый магний	Сердце крысы, морской свинки, кролика, собаки	[410, 412, 414]
Мальтоза	Кровь человека	[681, 682]
Маннитол	Костный мозг мышей, культура почечных клеток человека	[146]
Манноза	Культура почечных клеток человека	[414]
Метанол	Эритроциты человека, костный мозг мышей, сперма быка, трипаносомы, культура почечных клеток человека	[146, 494, 644]
Метилацетамид	Эритроциты человека	[586, 587]
Метилформамид	Эритроциты человека	[586, 587]
Метилмочевина	Ткань сердца эмбриона цыпленка	[417]
Моноацетин	Эритроциты человека, культура почечных клеток человека	[494]
Фенол	Культура почечных клеток человека	[567]
Полиэтиленгликоль	Эритроциты человека	[494]
Полиоксиэтилен	Эритроциты человека	[251]
ПВП	Эритроциты человека, костный мозг человека, хрящ человека	[181, 251, 629, 683]
L-пролин	Костный мозг мышей	[635, 637]
Пропионамид	Ткань сердца эмбриона цыпленка	[417]
Пропиленгликоль	Эритроциты человека, культура почечных клеток человека	[494, 495]
Пиридиноксид	Эритроциты человека, культура почечных клеток человека	[567, 586]
Резорцинол	Культура почечных клеток человека	[567]
Рибитол	Костный мозг мышей	[146]
Рибоза	Культура почечных клеток человека	[567, 635]
L-серин	Костный мозг мышей	[637]
Арсенид натрия	Костный мозг, эритроциты человека, культура почечных клеток человека, ткань сердца эмбриона цыпленка	[251, 567]
Иодистый натрий	Костный мозг мышей	[637]
Нитрат натрия	Костный мозг мышей	[637]
Сульфат натрия	Костный мозг мышей	[637]
Сорбитол	Костный мозг мышей, культура почечных клеток человека	[146, 567]
Сахароза	Кровь быка, кровь человека, эритроциты человека, костный мозг мышей, кожа крысы, сердце быка, трипаносомы	[664, 681]

Продолжение табл. 47

Соединения	Клетки или ткань	Автор
Триэтиленгликоль	Эритроциты человека	[494, 495]
Мочевина	Эритроциты человека, культура почечных клеток человека, ткань сердца эмбриона цыпленка	[251, 417, 567, 586]
L-валин	Костный мозг мышей	[635, 637]
Ксилоза	Эритроциты человека, сперма быка, трипаносомы	[643, 645]

электрического заряда, вязкости и температуры. Защитные же свойства криопротекторов в основном зависят от их способности образовывать водородные связи с жидкой фазой клетки [417] за счет большого количества неспаренных электронов, обладающих большой химической реакционной способностью [586, 587]. Поэтому считают, что вещества защитного действия типа глицерина, ДМСО, циклических многоатомных молекул и ряда других оказываются эффективными именно благодаря их способности образовывать водородные связи.

Необходимо отметить, что многие криопротекторы могут оказывать так называемый «псевдотоксический» эффект, суть которого заключается в кратковременном выключении функции какого-либо фермента, которая восстанавливается через некоторое время после удаления криопротектора из клетки, т. е. речь идет об одной из разновидностей обратимых процессов после такого воздействия. «Псевдотоксический» эффект криопротекторов наиболее четко проявляется при обработке глицерином или декстраном мышцы животного. После удаления криопротектора сокращение мышцы сердца полностью восстанавливается. Аналогичные явления можно наблюдать при действии на мышцу сердца ДМСО, метилформамида, метилацетамида, диметилацетамида и ряда других криопротекторов [411, 412]. ДМСО, связывая воду, вызывает изменения функциональной активности ферментов, которые могут быть обратимыми после удаления его из клеток [609]. Декстран благодаря наличию многочисленных гидроксильных групп способен образовывать водородные связи и поверхностно связываться с белковыми молекулами и мембранами клеток. При этом могут произойти нарушения функции биомембран, которые полностью устраняются после удаления декстрана из среды. Как видно, природа «псевдотоксического» эффекта может быть обусловлена взаимодействием криопротектора со свободными реакционно-способными группами белков и ферментов, а также с водой, окружающей эти макромолекулы. В результате такого взаимодействия наступает кратковременное выключение функции макромолекулы без существенных нарушений в ее первичной и вторичной структуре. В противоположность «псевдотоксическому» эффекту истинная токсичность характеризуется необ-

ратимыми нарушениями функции клетки. Это обычно происходит в том случае, если клетка находится в соприкосновении с криопротектором длительное время либо его концентрация слишком высокая.

Поэтому одним из важных характеристик криопротекторов является степень их токсичности. Считают, что существует два типа токсических явлений: а) собственная токсичность соединения; б) неспецифическая токсичность, связанная с криопротекторами вообще.

Неспецифическая токсичность криопротекторов связана с их концентрацией, температурой в момент воздействия и временем эквилибрации. Увеличение концентрации криопротекторов, как и времени их контакта с клеткой, как правило, сопровождается увеличением токсических проявлений в биологическом объекте. Вместе с тем токсичность криопротектора любой концентрации заметно снижается, если его используют при более низких температурах [413]. В последнее время были проведены исследования по эффективности комбинации различных криопротекторов. В качестве примера приводим некоторые исследования в этом направлении. Так, можно получить 30—40%-ную выживаемость в культуре *Entamoeba invadens,* если ее обработать 0,24 М раствором глюкозы в сочетании с 2,1 М ДМСО и медленно заморозить до —196°. Декстроза в концентрации 0,5—1,2 М и комбинации с лактозой (0,1—0,4 М раствор) обеспечивает 90%-ную выживаемость эритроцитов некоторых животных и человека, охлажденных со скоростью около 100° в секунду до —65° с последующим быстрым отогревом. Тромбоциты крысы, обработанные ДМСО в сочетании с декстрозой, ксилозой или сахарозой, можно успешно замораживать погружением в жидкий азот. После быстрого отогрева такие тромбоциты сохраняют свою морфологическую целостность и способность оказывать специфический эффект при тромбоцитопении [240, 244, 788, 789]. Добавление 5%-ной декстрозы в сочетании с 5%-ным ДМСО к плазме позволяет сохранить в живом состоянии 70—87% оттаянных тромбоцитов. Вместе с тем раздельное применение указанных выше криопротекторов вообще не эффективно. В ряде других работ показано, что 0,3 М раствор сахарозы в сочетании с 1,4 М ДМСО оказывает лучшее защитное действие на роговицу при замораживании, чем каждое из этих соединений в отдельности. Хороший криопротекторный эффект по отношению к коже дает смесь, в состав которой входит 0,3 М раствор сахарозы, 1,4 М ДМСО и 1,4 М глицерин.

Из приведенных примеров видно, что состав любой смеси, как правило, содержит ДМСО. Действительно, являясь поверхностноактивным веществом, ДМСО не только самостоятельно легко проникает в клетку, но и способствует проникновению в клетку других полимеров, являясь своеобразным «криопротекторным проводником». Вместе с тем это положение, очевидно, относится не ко всем случаям замораживания. Недавно было показано, что 6%-ный

раствор декстрана с молекулярным весом 70 000 в солевом растворе в сочетании с 1,8 М ДМСО оказывается менее эффективным при замораживании мышцы сердца крысы, чем каждый криопротектор в отдельности [412].

МЕХАНИЗМЫ КРИОПРОТЕКЦИИ

Механизм защитного действия разнообразных классов соединений изучался многими учеными [410, 412, 414, 565, 566]. Одно из наиболее ранних положений, выдвинутых лабораторией Люйе [522], заключалось в признании способности различных соединений оказывать частичную осмотическую дегидратацию ткани, что обеспечивает ее выживаемость при низких температурах. Обоснованием к признанию важной роли дегидратационной способности криопротекторов являлись наблюдения за животными, переживающими замораживание после частичной дегидратации клеток их организма, а также в результате проведения опытов с миокардом эмбриона цыпленка, который сохранял свою жизнеспособность после погружения в жидкий азот в том случае, если ткань предварительно была обработана следующими гипертоническими растворами, дегидратирующими клетки: 5,3 М раствором этиленгликоля, глицерином (3,5—7,5 М), глюкозой (1,5 М) либо NaCl (1,0 М). Наряду с дегидратационными веществами криопротекторы должны обладать еще и такими: а) способностью легко проникать в ткани, б) относительно низкой токсичностью; в) эффективно связывать воду, т. е. проявлять так называемые коллигативные свойства; г) низкой эвтектической температурой. Поскольку дегидратационная теория Люйе [522, 524] не учитывает специфичности действия криопротекторов, в дальнейшем Лавлок [492—494] на основании экспериментов с эритроцитами внес ряд новых положений в эту теорию. В частности, было показано, что при выборе криопротекторов важно учитывать специфичность замораживаемой ткани и скорости охлаждения. Наиболее существенным в этой теории является то, что некоторые вещества, включая и глицерин, могут оказывать на ткани криопротекторное действие, даже если соединение неспособно проникать в клетки. В ряде опытов с замороженными эритроцитами млекопитающих было показано, что разрушение клеток во время замораживания связано с увеличением в клетке концентрации электролитов. В присутствии глицерина деструкция клеток под влиянием электролитов происходит значительно медленнее. На основании многочисленных опытов Лавлок [494] пришел к убеждению, что механизм защитного действия заключается в основном в коллигативных особенностях неэлектролитных криозащитных растворов, которые понижают эффективную концентрацию солей при образовании льда при любой температуре ниже точки замерзания. Таким образом, при добавлении криопротектора к замораживающим клеткам повышение концентрации солей никогда не

достигает такого критического уровня, который способен нанести биологическое повреждение еще до того, как температура не понизится до такой степени, при которой скорость реакции повреждения станет ничтожной. Согласно положениям данной концепции, любой криопротектор должен обладать следующими особенностями: а) не быть токсичным в избыточных концентрациях; б) должен хорошо растворяться в жидкой фазе; в) легко проникать в клетки.

Как уже отмечалось, коллигативная теория имеет ряд существенных недостатков, в частности она не может объяснить такие факты, как, например, каким образом оказывают защитное действие такие непроникающие криопротекторы, как декстраны, ПВП, сахароза и другие соединения.

Согласно положениям Левита [467], свойства криопротекторов проявляются не только в том, что они оказывают влияние на клеточную воду, но и в результате непосредственного присоединения их к белкам. Поскольку вода при замораживании освобождается из белков, глицерин может присоединяться водородными связями к гидрофильным их участкам и, очевидно, таким образом сохранять структуру белка. При этом криопротектор замещает связанную воду, образуя защитный слой вокруг молекул белка и этим самым предупреждает их изменение [466].

Хебер и соавторы [358] поддерживают это положение и считают, что такие органические гидроксисоединения, как, например, сахара, проявляют свое криопротекторное действие благодаря их способности задерживать воду или замещать ее в структурах, весьма чувствительных к дегидратации. Моносахариды способны образовывать неустойчивые комплексы с белками с помощью водородных связей в водных растворах. Дисахариды, наоборот, образуют прочные связи с водой, что препятствует их взаимодействию во время замораживания. В этот период часть воды, связанная с дисахаридами, может теряться, в результате чего создаются предпосылки к взаимодействию между белком и дисахаридом.

Следовательно, согласно указанным выше положениям, криозащитное действие является результатом стабилизации водородных связей, возникающих между криопротектором и белками, которые не разрушаются во время замораживания. Вместе с тем эти положения носят явный предположительный характер, поскольку не подкреплены экспериментально.

На основании экспериментальных данных, полученных при замораживании различных миозинов и каталазы, Шикама [737, 738] предполагает, что криопротекторы скорее всего стабилизируют решетку водных «айсбергов» нативных белков и мало влияют на процесс образования кристаллов льда. Хотя криопротекторы и снижают степень денатурации, они не способны изменить время процесса либо критическую температуру (от —10 до —80°) денатурации, вызванную замораживанием. Учитывая то, что внутри спиралей белки содержат кубическую пентагональную решетку воды,

полагают, что аналогичные решетки вокруг неполярных боковых цепей аминокислот также являются кубическими. Поскольку кубические решетки воды имеют очень низкую термодинамическую стабильность, они могут изменять свою конфигурацию под влиянием замораживания, когда образуются кристаллы гексагонального льда. Использование метода электронной дифракции показало, что гексагональные кристаллы льда образуются только в чистой воде, замороженной при температурах около —80°. Стекловидный лед, образующийся при сверхбыстрых скоростях охлаждения (до —180°), превращается в кубический при отогревании до —140°. Если температуру раствора повысить до —80°, то наступает переход от кубических форм льда до гексагональных. Кубическая структура решетки воды нативных белков удерживается стабильно лишь в присутствии кубического льда. Если возникают гексагональные формы льда, они оказывают разрушающее действие на кубические решетки и функция белка или фермента может изменяться. Действительно, установлено, что максимальная инактивация энзимов наступает обычно в диапазоне температур от —10 до —80°, т. е. в момент преобладания гексагональных форм льда. Если быстро заморозить каталитический белок до —87—90°, то их инактивация будет минимальной. При отогреве происходит реассоциация кристаллической решетки кристаллов льда. Однако мнение Шиками [737, 738] о повреждающем действии гексагонального льда на кубическую решетку белков не разделяется некоторыми авторами, которые считают, что гексагональный лед не входит в контакт с решетками, расположенными внутри белка, т. е. гексагональные кристаллы не затрагивают структуру кубических решеток и, таким образом, не могут изменить структуру белка [169, 416, 419, 738]. Наконец, хорошо известно, что медленное замораживание, сопровождающееся образованием гексагональных структур льда, позволяет получить в некоторых случаях большой процент жизнеспособных клеток. Следовательно, сейчас еще очень мало известно о вкладе в криоповреждения компонентов клеток, связанных с нарушением различных форм воды макромолекул.

Существует мнение, что криозащитные свойства тех или иных соединений связаны с их способностью образовывать хелатные связи с бивалентными ионами металлов, которые играют значительную роль в сохранении специфических черт тех или иных биомакромолекул. Методом ЭПР и спин-метки показано, что глицерин образует комплексы с такими биологическими активными микроэлементами, как Cu^{2+} и Fe^{2+}. Следовательно, наличие в мембране подобного рода катионов в значительной мере может препятствовать проникновению глицерина в клетку. Более того, остается ряд невыясненных вопросов, касающихся проблемы обратимости взаимодействия криопротекторов с каталическими белками и ряд других вопросов, связанных с особенностями действия криопротекторов на биологические мембраны. Поэтому необходимо осуществить

дальнейшие эксперименты для выяснения механизма действия криопротекторов на различные уровни организации биоструктур, что позволит изыскать более эффективные и менеее токсичные соединения, влияющие на стабилизацию гидратных оболочек и других функциональных групп макромолекул и биомембран клеток.

КРИОПРОТЕКТОРЫ ЭНДОЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕЙСТВИЯ

Защитные свойства глицерина. К эндоцеллюлярным криопротекторам, защитное действие которых наиболее хорошо изучено, прежде всего относится глицерин. Впервые в качестве криопротектора его применил Н. А. Максимов [62]. Со времени повторного его открытия как защитного вещества, давшего практический выход [642, 644, 762], наиболее фундаментальные исследования по механизму его защитного действия провел Лавлок [494, 495] на эритроцитах. Показано, что глицерин легко проникает в эритроциты и, действуя как противосолевой буфер, защищает как внутриклеточную структуру, так и мембраны от возрастающей концентрации солей и электролитов по мере понижения температуры замораживаемого образца. Такое повышение уровня электролитов ведет к ослаблению связи фосфолипидов с белками и гликопротеинами клеточной мембраны и увеличению ее проницаемости, что изменяет ее биологические свойства. На основании экспериментальных и теоретических расчетов была выведена формула расчета необходимого количества глицерина, способного предотвратить наступление необратимых изменений при определенной температуре в случае замораживания различных видов клеток, в том числе и эритроцитов.

Со времени обоснования Лавлоком механизма действия глицерина на клетки положения его концепции по этому вопросу были существенно модифицированы и дополнены (табл. 48).

В дальнейшем в связи с широким внедрением в практику глицерина как высокоэффективного вещества удалось предохранять разнообразные биологические объекты от повреждающего действия холода — сперматозоиды быка, клетки крови и др. [642]. Детальный механизм действия глицерина как криопротектора был исследован главным образом на эритроцитах. В этих опытах было показано, что гемолиз эритроцитов, вызванный замораживанием и оттаиванием, связан в основном с повышением концентрации электролитов по мере вымораживания воды из раствора. Поэтому для защиты клеток от гибели широко используется глицерин, который, как и другие криопротекторы эндоцеллюлярного действия, по мнению Лавлока [494], Деблера и сотрудников [249, 251], характеризуется следующими особенностями: а) препятствует замерзанию воды путем стабилизации водородных связей в кристаллической решетке, б) обладает хорошими растворяющими свойствами по отношению к электролитам; в) свободно проникает в мембрану клетки и ее цитоплазму; г) имеет низкую токсичность.

Установлено, что при медленных скоростях замораживания для обеспечения защиты обязательно проникновение в клетку криопротектора. Поэтому проницаемость мембран клеток для этих веществ является существенным фактором в чувствительности тканей к замораживанию. Оказалось, что скорость проникновения глицерина через внешнюю мембрану различна у разных клеток. Например,

Таблица 48

Некоторые трактовки механизма действия глицерина

Характер действия глицерина	Автор
Глицерин «витрифицируется» внутри клеток и переохлаждает внутреннюю среду клетки, в результате чего внутриклеточная кристаллизация при охлаждении клеток даже до —60° в средах, содержащих глицерин, не наблюдается	[758]
Тормозит внутриклеточную кристаллизацию	[308, 755]
Проникая в клетки, увеличивает количество связанной воды и тем самым уменьшает количество образовавшегося льда и свободной воды	[567]
Понижает скорость распространения фронта кристаллизации и, способствуя переохлаждению среды, обусловливает мелкокристаллическое замерзание растворов. Поскольку глицерин не кристаллизуется одновременно с водой, он разбавляет солевые растворы, не допуская резкого повышения их концентрации. Перемещает границу эвтектики в зону низких температур, способствует образованию стекловидных структур	[567]
Действует как противосолевой буфер, а также как вещество, поддерживающее в клетке некоторый уровень жидкости и препятствующее молекулярному контакту внутриклеточных структур	[562]
Местом приложения защитных свойств глицерина являются биологически активные ионы металлов; глицерин может образовывать комплексы с ионами металлов, предотвращая разрушение активных центров биомакромолекул, содержащих эти ионы при замораживании	[492—497]
Замещает элиминировавшую из клеток воду, в результате чего происходит стекловидное замерзание внутренней среды клетки. Все возрастающая в процессе вымерзания воды концентрация глицерина смягчает неблагоприятное влияние гипертонических растворов. Свойство глицерина не увеличиваться в объеме при охлаждении, а сжиматься приводит к «решению» проблем давления водного и криогидратного льда	[498, 522]

скорость проникновения глицерина в эритроциты крысы в 242 раза выше, чем в эритроциты овцы. Плохой проницаемостью для глицерина отличаются также и эритроциты быка по сравнению с эритроцитами человека. Широкое использование глицерина как криозащитного агента в гематологии поставило на повестку дня решение некоторых проблем, связанных с удалением этого соединения из клеток после их оттаивания. В этом отношении глицерин обладает

именно этим существенным недостатком. В процессе эквилибрации его с эритроцитами перед замораживанием он вполне хорошо проникает в клетки и защищает их от вредных последствий замораживания. Однако его удаление из клеток после их оттаивания связано с определенными трудностями. Дело в том, что пребывание клетки в гипертонической среде с проникшим в него криопротектором вызывает временное, очевидно, и безвредное уменьшение объема клетки до установления внутри- и внеклеточного равновесия. Если же такие клетки, пропитанные криопротектором высокой концентрации, поместить в изотоническую среду без криопротектора, то такая процедура вызывает набухание клетки и ее гибель. Поэтому очень часто отрицательный исход при восстановлении функции клеток после их низкотемпературного замораживания связан именно с тем, что клетки после отогрева помещаются в среду без криопротектора. Экспериментально было доказано, что гораздо лучшие результаты можно получить, если замороженные клеточные культуры, обработанные глицерином, после их отогрева поэтапно суспендировать в растворах глицерина с постепенно уменьшающейся концентрацией и потом перенести их в среду без глицерина [494].

Одним из малоисследованных вопросов остается влияние глицерина на структуру и функцию воды клеток и биомакромолекул. Между тем, проникая в клетки, глицерин, очевидно, способен не только изменять кристаллическую структуру воды в направлении ее большей стабилизации, но и образовывать связи с боковыми реакционно способными группами белков, обратимо изменяя их конфигурацию и, возможно, конформацию.

Ряд литературных данных свидетельствует о том, что понижение температуры белка в различных растворах электролитов и неэлектролитов (например, в мочевине) ведет к углублению дезорганизации молекулы белка. Действительно, при исследовании температурной зависимости спектрополяриметрических характеристик α-глобулина, β-овальбумина было установлено, что понижение температуры углубляет денутурацию этих белков с образованием α-спиральных («левых») структур.

При этом наблюдается повышение левовращения, уменьшение значений дисперсионной константы λ_c,— b_0 стремится к положительным значениям (табл. 49). Как известно, «левые» структуры в большинстве случаев малоустойчивы. Следовательно, целый ряд денатурирующих агентов вызывает разрыхление спиральной структуры белков с появлением коротко- или долгоживущих «левых» структур, т. е. белок переходит в первую фазу неустойчивого состояния — метастабильную форму. Срок существования последней определяется природой белка, денатуранта и способа денатурации, причем количество левых структур обратимо возрастает с понижением температуры. Природа этих «левых» структур остается малоизученной.

Несколько иначе ведет себя белок в растворах глицерина. Исследование нативного γ-глобулина и β-овальбумина в растворах

глицерина показывает, что даже в высоких концентрациях глицерин не разрушает нативную структуру. Скорее он несколько увеличивает содержание «правых» структур. Действие глицерина гораздо мягче и слабее, чем 2-хлорэтанола и этиленгликоля. Более того, когда помещали денатурированный белок в раствор глицерина, то наблюдали значительно меньшее оптическое вращение влево и нормализацию измеряемых величин. Параллельно уменьшению оптического вращения происходит изменение спектрополяриметрических констант, преобретающих значения, свойственные нативному белку. Представляет интерес то, что использование глицерина позволяет ренатурировать даже такие необратимо денатурирующие белки, как, например, овальбумин (табл. 49). Ренатурация

Таблица 49

Изменение спектрополяриметрических характеристик γ-глобулина лошади в присутствии глицерина [39]

Раствор глицерина, % конечной концентрации	T, °С	m' [579]	λ_c	$-a_0$	$-b_0$	H, %	β, %
Без глицерина	+18	51	208	334	0	+15	+26
50,1	+18	49	209	313	0	+15	+27
50,0	—11	47,5	209	306	+16	+15	+29
Без глицерина	+19	84	218	536	0	+4	+9
50,0	+19	64,3	218	410	+8	+10	+19
50,0	—14	63,8	214	405	+17	+9	+21

Примечание. γ-глобулин был подвергнут денатурации при pH 12,35 в течение 9 часов.

белка сопровождается образованием правовращающих форм, что противоположно действию мочевины и низким температурам.

Считают, что такое действие глицерина связано с образованием водородных связей, укрепляющих молекулярную структуру белка. Молекулы белка даже после частичной ренатурации, очевидно, приобретают более высокую жесткость и меньше изменяют вращение поляриметрического луча при понижении температуры. В глубоко денатурированных белках хотя и повышается степень упорядоченности структуры при помещении в глицерин, последняя, очевидно, не закрепляется достаточным количеством связей и находится в неустойчивом состоянии. В этом случае понижение температуры сдвигает равновесие в сторону увеличения левовращения. Эти данные свидетельствуют о том, что одним из факторов, определяющих защитную роль глицерина при низкотемпературной консервации биологического материала, является повышение жесткости молекулы и предохранение ее от образования менее устойчивых «левых» структур («левого выворота»).

Таким образом, глицерин как защитное соединение, применяющееся в криобиологии, обладает весьма многосторонним действием на различные структуры в клетке, обеспечивая их более плотную упаковку и стабильность при низких температурах. Поэтому

глицерин фактически сочетает в себе способность криопротектора и стабилизатора биомакромолекул, что обеспечивает ему высокие защитные свойства.

Защитные свойства ДМСО. В 1959 г. лаборатория Лавлока [498, 499] впервые сообщила об использовании ДМСО в качестве защитного криопротектора. Оказалось, что данное соединение в отличие от глицерина имеет такое преимущество, что оно легче проникает через мембрану клеток. Доказательством этого служит то, что эритроциты быка, разрушающиеся при замораживании и оттаивании под влиянием глицерина, полностью восстанавливают свою функцию в присутствии ДМСО. Преимуществом ДМСО является также и то, что его не надо удалять из клеток после их отогрева. Кроме того, ДМСО, как известно, является естественным продуктом липидного метаболизма и в умеренных концентрациях не токсичен. ДМСО как криопротектор очень быстро нашел практическое применение (табл. 50), причем большинство исследователей пришло к заключению, что оптимальной концентрацией ДМСО, обеспечивающей защиту клеток от криоповреждений, являются 7—10%-ные его растворы.

ДМСО, как известно, способен тормозить образование льда при замораживании клеток до —30°, способствует образованию некристаллического льда, уменьшает электролитные изменения, а также предупреждает повреждающее действие свободных радикалов [159, 688].

В последнее время ДМСО используется не только для защиты изолированных клеток при их замораживании, но и для предохранения целых органов при подготовке их к низкотемпературному консервированию. На основании ряда экспериментов было установлено, что ДМСО в смеси с глицерином, декстраном и Mg^{2+} оказывает неплохое защитное действие на сердечную мышцу и, очевидно, может оказаться эффективным при низкотемпературном консервировании сердца [117, 413]. Однако это мнение разделяют не все исследователи. Перспективным оказалось применение ДМСО для низкотемпературного хранения почек — перфузия органа растворами, содержащими 7,5—20%-ный ДМСО, позволяет несколько недель сохранять жизнеспособным орган [160, 340, 458, 813, 836]. Однако после пересадки таких почек животному через некоторое время, как правило, наступает смерть, поскольку ДМСО сам по себе обладает токсическим действием на клетки почечных канальцев, интерстиций и другие субклеточные и молекулярные структуры, в результате чего наступают необратимые дегенеративные изменения органа. Оказалось, что эти изменения наступают в результате осмотического влияния препарата, который повышает сосудистую проницаемость, что может привести к закупорке мелких сосудов и частичному некрозу ткани. Более высокий процент выживаемости можно получить после перфузии смесью, содержащей кроме ДМСО маннитол и декстран, которые уменьшают повреждающее действие ДМСО [494].

Таблица 50

Использование ДМСО для консервирования различных биологических объектов

Объект исследования	Результаты исследований	Автор
Эритроциты	Данные противоречивы. Оказывает хороший защитный эффект, но, по-видимому, требует отмывки перед трансфузией	[16, 277, 356]
Костный мозг	В концентрации 5—20% дает хороший эффект — от 50—60 до 80—90% жизнеспособных клеток	[36, 71, 102, 103, 133, 201, 233, 321, 624, 629, 690]
Лейкоциты человека и животных	В концентрации 10—20% дает хороший эффект. Сохраняет фагоцитарную активность, митоз. Клетки пригодны для серологических целей и переливаний при агранулоцитозе	[133, 159, 380, 627]
Тромбоциты, сывороточные липопротсины	Данные противоречивы. Препарат очень резко изменяет проницаемость мембран	[244, 245, 425, 426, 445, 446]
Роговица	Эффективен, но уступает по действию глицерину. Рекомендуется 7,5%-ный ДМСО в комбинации с 10%-ным глицерином	[198, 763]
Кожа	10%-ный ДМСО подобен по своему действию глицерину	[94, 95, 762]
Клетки почек, печени, селезенки, опухолей, сперматозоиды, эмбриональная ткань	В 5—10%-ной концентрации дает хороший результат, за исключением сперматозоидов и эмбриональных клеток, при консервирования которых в его присутствии проявляется токсичность	[282, 283, 316, 321, 627, 734, 762]
Различные микроорганизмы	Эффективен для всех бактерий. Сохраняет вирулентность и антигенные свойства	[240, 331—334]
Аорта, мочеточники, селезенка, печень, матка, кишечник	Результаты очень противоречивы. Низкая эффективность	[94, 762]

В 1969 г. на международном совещании МАГАТЭ, посвященном современным проблемам трансплантации костного мозга, были сделаны сообщения об эффективности действия ДМСО при замораживании костного мозга, крови и других тканей до —196°. Предполагают, что он легче, чем глицерин, проникает в клетки через мембрану. После замораживания ядросодержащих клеток крови с этим эндоцеллюлярным защитным веществом субмикроскопическое

строение большинства клеток, выявленное с помощью электронного микроскопа, изменяется мало. Очевидно, основное действие ДМСО заключается в его способности связываться с биомакромолекулами и структурировать эндоплазматическую сеть и особенно поверхность клеток.

Однако, несмотря на некоторое преимущество ДМСО по сравнению с другими защитными соединениями, в последнее время обращают внимание на то, что это соединение обладает способностью вызывать необратимые повреждения тканей в результате денатурации каталитических белков, а также мембранных структур цитоплазмы и ядра. Имеются основания думать, что ДМСО может оказывать онкогенный эффект в связи с его повышенной токсичностью по отношению к белковым структурам. Отсутствие широкой клинической проверки влияния ДМСО на организм реципиента в составе перелитых консервированных клеток делает проблематичным практическое использование этого криопротектора.

КРИОПРОТЕКТОРЫ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕЙСТВИЯ

Среди разнообразных классов криопротекторов экстрацеллюлярного действия наиболее выраженными свойствами обладают ПВП и различные сахара.

Поливинилпирролидон. В 1955 г. Брика и Безис [181] впервые использовали ПВП для консервирования клеток крови, однако получили отрицательные результаты, по-видимому, вследствие использования очень небольших скоростей замораживания. Несколько позже этот полимер был использован в качестве криопротектора при замораживании эритроцитов с большим успехом, поскольку были применены очень быстрые скорости замораживания [51—53].

Очевидно, ПВП сам по себе не проявляет выраженного защитного эффекта и его лучше применять в комбинации с другими криопротекторами и стабилизирующими растворами. Например, клетки костного мозга могут быть хорошо заморожены в 3,5%-ном растворе ПВП в сочетании с метанолом, этиленгликолем, рибитолом, маннитолом и сорбитолом в различных концентрациях. Замораживание можно производить до —25° со скоростью 1° в минуту, после чего замораживаемые пробы помещают в жидкий азот. Кроме метанола, проявляющего иногда токсический эффект, остальные алкоголи, как правило, обладают защитными свойствами. Лучшие результаты могут быть получены в результате применения сорбитола в 7,6%-ной концентрации [146].

Другим примером успешного замораживания биологических тканей при низких температурах являются исследования, в которых костный мозг мыши замораживали в 0,9%-ном солевом растворе с 3,5%-ным ПВП при добавлении к нему различных аминокислот. ПВП, по мнению ряда авторов, сам по себе не обладает защитными свойствами и вводится в замораживаемую среду для

предупреждения агглютинации клеток [635]. Из применяемых аминокислот в качестве стабилизирующих соединений можно рекомендовать глицин, серин, аланин, триптофан и особенно пролин, которые защищают клетки костного мозга при их замораживании до —25° со скоростью 1° в минуту, после чего изучаемые объекты переносят в жидкий азот. Цистеин, аспарагин, лизин и аргинин обладают низкими протекторными свойствами. Создается впечатление, что теория Лавлока [495—498] о механизме защитного действия химических веществ применима лишь к эритроцитам и, по-видимому, не может быть использована при работе с клетками костного мозга. Интересно, что аминокислоты являются электролитами, но тем не менее обладают защитными свойствами. Поэтому считают, что защитных свойств не имеют те вещества, которые имеют свободную группу —CH—, обладают щелочными свойствами и содержат по одной амидо- и аминогруппе.

Замораживание костного мозга до —25°, а затем до —196° со скоростью охлаждения 1° в минуту свидетельствует о том, что все применявшиеся комбинации веществ проявляют защитные свойства. На основании ряда экспериментальных данных установлено, что лучшими защитными свойствами по отношению к клеткам крови обладает ПВП с молекулярным весом 25 000. Ф. Р. Виноград-Финкель с соавторами [18, 19], дав сравнительную оценку ПВП с молекулярным весом 12 000, 25 000 и 40 000, установили, что полимер с молекулярным весом 40 000 не пригоден для замораживания крови, поскольку при микроскопическом исследовании после оттаивания эритроцитов обнаружена их агломерация и явления гемолиза [678, 687].

В настоящее время считают, что в результате применения экстрацеллюлярных защитных веществ при ультрабыстром замораживании не требуются большие концентрации криопротекторов, так как скорость замораживания сама по себе является ограждающим средством. Это объясняется тем, что при сверхбыстрой скорости замораживания (когда отдача тепла из клетки идет почти мгновенно) и хранении при —196° поддерживается структура льда размером 1 *мк*, кристаллы которого не повреждают структуры эритроцитов. Если в качестве криопротекторов использовать ПВП с молекулярным весом 12 000 и 25 000 в 8%-ной концентрации и 1%-ный альбумин, то можно получить довольно высокий процент жизнеспособности клеток после оттаивания. Однако ряд авторов считает целесообразным при замораживании эритроцитов сочетать вещества эндо- и экстрацеллюлярного действия, позволяющие укреплять мембрану и связывать известную долю воды в клетке, что уменьшает общую массу льда. Кроме того, такое сочетанное применение защитных веществ способствует мелкокристаллическому замораживанию протоплазмы и поддержанию осмотического равновесия между клетками и внешней средой. В состав ограждающей среды при замораживании эритроцитов сейчас рекомендуют вводить: глицерин в 5%-ной концентрации, цитрат натрия, дисахариды или манит,

т. е. применяют такие защитные среды, в которых содержатся интра- и экстрацеллюлярные криопротекторы (глицерин, дисахариды и цитрат натрия). Это обеспечивает успешное замораживание эритроцитов в комбинированных средах с эндо- и экстрацеллюлярными криопротекторами. Как известно, эндоцеллюлярные криопротекторы способны оказывать модифицирующее действие на структуру воды за счет образования с ней дополнительных водородных связей. Например, каждый из H^+-ионов криопротектора способен структурировать (стабилизировать) вокруг себя около 10 молекул воды. Упорядочивающее воздействие на воду оказывают также ионы Mg^{++}, Ca^{++}, Na^+, которые в отличие от ионов молекулы неполярных соединений взаимодействуют с молекулами воды лишь слабыми вандервальсовыми силами. Вместе с тем действие этих неорганических катионов на структуру воды весьма значительно. Присутствие неполярной молекулы криопротектора повышает количество водородных связей в слое близлежащей воды при комнатной температуре на 13% и возрастает с понижением температуры раствора. Таким образом, присутствие в растворе ионов Na^+ (в результате диссоциации в растворе, например, цитрата натрия) глюкозы или глицерина, являющихся неэлектролитами, приводит значительную часть воды в состояние, охарактеризованное Рентгеном как жидкий лед, затвердевание которого происходит практически без перераспределения воды в клетке, что снижает повреждение клеток при замораживании.

Необходимо отметить, что механизм действия криопротекторов экстрацеллюлярного характера полностью не ясен. Согласно некоторым предположениям, механизм защитного действия ПВП [515, 516, 558, 628, 629, 680—683] заключается в следующем: 1) ПВП действует исключительно как экстрацеллюлярное защитное вещество; 2) прочно связывает внеклеточную воду и часть воды, экстрагированной из клетки, замедляет рост кристаллов льда; 3) обволакивает клетки, препятствуя непосредственному воздействию уже образовавшихся кристаллов льда на клетку; 4) защищает при быстром замораживании от вредного воздействия концентрированных растворов солей внутри и вне клетки, поскольку при быстром образовании мелких кристаллов соли замерзают вместе с водой. Вместе с тем механизм действия ПВП как криопротектора полностью не выяснен и требует дальнейших экспериментальных исследований. Остается не ясным, в частности, каким образом соли вне и внутри клетки не оказывают повреждающего действия на структурные элементы клетки при быстром охлаждении, которое способствует замерзанию кристаллов солей вместе с водой. Очевидно, это возможно при витрификации, которая наступает только при охлаждении замораживаемого образца объемом не более 0,2 *мл* со скоростью 5000° в секунду [775]. Такие условия при замораживании более крупных образцов отсутствуют. Поскольку при быстром замораживании образуются очень мелкие кристаллы льда

величиной в миллимикрон, то это свидетельствует о перераспределении молекул воды, которые способны независимо от солей образовывать свою кристаллическую решетку, т. е. может происходить самостоятельный процесс кристаллообразования воды и солевых растворов.

Методом термического и микроструктурного анализа было показано, что при быстром охлаждении мгновенное разрушение клеточных элементов может вообще не происходить. В результате быстрого кристаллизационного процесса клетки крови как бы затвердевают без каких-либо видимых признаков повреждения. Последующее повреждение клеток крови, очевидно, объясняется не механическим их повреждением, а, скорее, возникающими большими градиентами концентраций электролитов. При образовании кристаллов у поверхности клеток всегда образуется слой электролитов с концентрацией значительно более высокой, чем вдали от поверхности.

Сейчас считают, что вещества, применяемые в качестве криопротекторов при замораживании эритроцитов (сахара, глицерин, ПВП), связывают воду как внутри клетки (проникающие в клетку), так и вне ее (не проникающие в клетку) и тем самым затрудняют ее вымерзание в виде крупных кристаллов льда, предотвращая тем самым образование концентрированных солевых растворов [763].

При исследовании методом рентгеноструктурного анализа характера кристаллизации эритроцитов при ультрабыстром замораживании в средах с ПВП 7%-ной концентрации обнаруживается, что в замораживаемых образцах происходит вначале мелкоструктурная кристаллизация с постепенным формированием более крупных кристаллов, образование которых можно рассматривать либо как совокупность массы мелких кристалликов, либо как первичное образование крупных кристаллов деформированного типа. При этом до 90% эритроцитов остается неповрежденными, поскольку в клетке формируется мелкокристаллический лед. Применение криопротектора именно и способствует образованию таких мелких кристалликов, которые не способны повреждать оболочку эритроцитов. Аналогичные результаты можно получить после применения глицерина в малых концентрациях в сочетании с глюкозой, лактозой при ультрабыстром замораживании [50]. Причем быстрое замораживание эритроцитов с применением в качестве криопротектора ПВП свидетельствует о том, что защитный эффект этого соединения проявляется почти одинаково в том случае, если эритроциты замораживают в изотоническом солевом растворе, а оттаивают в 20%-ном растворе ПВП или в том случае, если их замораживать только в присутствии этого полимера. Меримен [562, 563] предполагает, что защитный эффект ПВП сводится к тому, что в обоих случаях полимер образует вокруг клетки полимерную оболочку, которая придает механическую устойчивость мембране, предохраняя ее от разрыва вследствие высокого концентрационного градиента, мгновенно возникающего в процессе перераспределения воды, освобождающейся из тающих кристаллов льда.

При замораживании биологических объектов в присутствии экстрацеллюлярных защитных веществ наблюдаются осмотические явления, поскольку охлаждение хотя и осуществляется с большой скоростью, но происходит в большом объеме жидкости. Осмотические явления, связанные с переносом воды через мембрану, осуществляются не только в результате кристаллобразования, но также являются следствием различных осмотических условий в клетке и вне ее. Клетка, окруженная липопротеидной мембраной, служит ей хорошим теплоизолятором, охлаждается медленнее окружающей среды, чему способствует не прекращающийся до исчезновения жидкой фазы обмен веществ. Это создает градиент давления паров на

Таблица 51

Эффективность ПВП при быстром замораживании эритроцитов [562]

Характер суспендирующей среды замораживания	Оттаивание с ПВП в растворе и без него (отогрев при +42°)	Процент гемолиза	Тотальный гемолиз, наступающий после ресуспендирования в изотоническом растворе, %
Изотонический раствор	Изотонический раствор	39,6	44,1
Изотонический раствор	20%-ный ПВП; 0,3%-ный NaCl	8,3	27,3
20%-ный ПВП; 0,3%-ный NaCl	Изотонический раствор	5,3	10,0
20%-ный ПВП; 0,3%-ный NaCl	20%-ный ПВП; 0,3%-ный NaCl	3,2	9,7

границе клетки и внешней среды, который увеличивается по мере частичного обезвоживания клетки ПВП. В результате в процессе замораживания происходит перераспределение воды между клеткой и окружающей средой.

Не исключается также, что внеклеточные криозащитные полимеры адсорбируются на поверхности клетки, предохраняя их от криоденатурации [565, 566]. Известно, что потеря мембранами клеток липопротеинов повышает ее проницаемость для катионов, способствуя тем самым осмотическому лизису клетки при отогреве. Комплексирование полимерных молекул криопротектора с мембраной клетки в таком случае может, очевидно, предотвратить денатурационные явления либо стабилизировать мембрану к последующим нагрузкам [562, 586]. Результаты экспериментальной проверки этих предположений представлены в табл. 51. В данном случае были использованы быстрые скорости замораживания эритроцитов в присутствии ПВП и без него и отогревание их при температуре 42° в солевых растворах с ПВП и без него.

Как видно из табл. 51, отогрев эритроцитов в растворе ПВП способствует более высокой выживаемости клеток, несмотря на то что ПВП, очевидно, не может войти в контакт с клеткой до тех пор, пока оттаивание не завершится полностью. Это свидетельствует о

том, что ПВП стабилизирует клетку именно в тот момент, который наступает непосредственно после оттаивания.

В настоящее время считают, что внеклеточные криопротекторы и полимеры оказываются эффективными главным образом при замораживании эритроцитов. Относительно замораживания ядросодержащих клеток животного происхождения большинство мнений сводится к тому, что для их криопротекции необходимо использование проникающих криопротекторов, которые оказывают хороший эффект в определенной концентрации, в основном при медленных скоростях замораживания.

КРИОПРОТЕКТОРЫ СМЕШАННОГО ДЕЙСТВИЯ

Возможность применения моно-, диэтиленгликоля, полиэтиленгликолей при консервировании эритроцитов человека была доказана Лавлоком [495], Словитером [753, 754], Равдином [754]. В 1955—1956 гг. Лавлоком и Мерименом [499,563] была предпринята успешная попытка заморозить эритроциты с помощью синтетических веществ полигликолевого ряда (Е-400, Е-1000, Е-6000, Е-9000). С этой целью были использованы в качестве криопротекторов вещества тетранического ряда (Т-700) и плюронического (F-44, F-62, F-64, F-68). Исследователи считали, что механизм защитного действия применяемых веществ заключается в том, что они содержат полярный углерод, связанный с кислородом, который обладает гидратирующими свойствами в растворе.

В последнее время синтезирован целый ряд защитных соединений оксиэтилена — полиэтиленоксиды (ПЭО) различного молекулярного веса — от 100 до 4000 и выше. Целесообразность использования этого соединения как криопротектора обусловлена его свойствами и прежде всего тем, что это соединение оказывает заметное структурирующее действие на воду клетки и является относительно малотоксичным соединением.

Способность ПЭО увеличивать количество связанной воды определяется химической структурой этого соединения, в соответствии с которой он обладает меандровидным строением оксиэтильных соединений, обусловливающих винтообразное расположение кислородных атомов. В силу такого строения ПЭО доступ к оксиэтильным звеньям молекул воды значительно облегчается, причем вода присоединяется кислородным атомом к полимеру по типу оксониевых соединений. Это приводит к «сшиванию» молекул ПЭО с молекулами воды в новые образования с ограниченной подвижностью молекул [22, 23]. При консервировании крови или костного мозга хороший эффект оказывает ПЭО с молекулярным весом 4000, который в 15—20%-ной концентрации обладает наибольшими защитными свойствами [21, 30].

Если замораживание этих объектов производить достаточно быстро (со скоростью 0,5—12° в секунду), то вокруг эритроцитов образуется аморфная, или мелкокристаллическая, фаза, которая

не вызывает гемолиза клеток. При небольших скоростях замораживания (0,05—0,5° в секунду) образуются крупные кристаллы льда, вызывающие гемолиз. Возрастание гемолиза при скорости замораживания 22° в секунду зависит скорее всего от внутриклеточной кристаллизации льда. Таким образом, лучшие защитные свойства по отношению к эритроцитам проявляет ПЭО с молекулярным весом 4000, механизм защитного действия которого исключительно экстрацеллюлярный. Очевидно, при этом дипольные молекулы полимера, взаимодействуя с концентрированными участками белковой поверхности клеток, образуют комплексы. Следовательно, ПЭО адсорбируется на поверхности эритроцита и может увеличивать прочность клеточных мембран. Замораживание со скоростью 5—12° в секунду при 15—20%-ной концентрации ПЭО в контейнерах специальной конструкции вызывает дегидратацию клеток, не опасную для морфологической и функциональной целостности эритроцитов. При этом оставшаяся часть свободной воды в силу значительного переохлаждения подвергается мелкоструктурной кристаллизации.

При замораживании костного мозга максимальными защитными свойствами обладает ПЭО с молекулярным весом 400. Изучен характер кристаллизации различных сред, в том числе и взвеси костного мозга в растворах ПЭО-400 при их замораживании до температуры жидкого азота. Методом низкотемпературной кристаллографии и рентгеноструктурного анализа установлено, что полимер в концетрации 20—15% оказывает выраженное действие на процессы кристаллизации и ведет к образованию аморфной структуры льда при замораживании до —196°. Хороший эффект оказывает при этом метод двухэтапного замораживания костного мозга, который обеспечивает лучшую выживаемость клеток при сверхнизких температурах [85].

Изучение процесса проникновения криопротектора в клетки костного мозга и его влияние на рост кристаллов методом рентгеноструктурного анализа, низкотемпературной кристаллографии, а также с помощью электронномикроскопических исследований показало, что ПЭО в значительно меньшем количестве, чем глицерин, проникает в клетку, основная же масса его локализуется экстрацеллюлярно. Кристаллообразование в эритроцитах, замороженных по двухэтапной программе, увеличивается от периферии к центру, что трактуется как результат количественного уменьшения ПЭО в клетках в том же направлении. Поэтому считают, что ПЭО-400 как криопротектор является веществом эндо- и экстрацеллюлярного действия. Кроме того, ПЭО в оптимальных концентрациях не является токсичным и оказывает, по всей вероятности, «псевдотоксические» эффекты на биологические объекты. Такие свойства ПЭО позволили широко применять его при замораживании патогенных простейших, крови, костного мозга и спермы. Криопротекторный эффект ПЭО в известной мере зависит от специфичности ткани и молекулярного веса защитного соединения (табл. 52).

Таблица 52

Данные о криопротекторном действии полиэтиленоксидов

Молекулярный вес ПЭО	Биологический объект	Оптимальная концентрация	Жизнеспособность после реконсервирования
100, 400, 1000, 2000, 4000, 6000	Костный мозг человека	15%-ный ПЭО-400	81,5% жизнеспособных клеток
400	Лейкоциты человека	15%-ный ПЭО-400	98% жизнеспособных клеток, хорошая сохранность ферментов гликолиза и дыхания
200, 400, 800, 1000, 1500, 2000, 4000, 6000, 15 000	Эритроциты человека	20%-ный ПЭО-4000	95—98% жизнеспособных клеток
400	Гемопоэтическая эмбриональная ткань	15%-ный ПЭО-400	95% жизнеспособных клеток
100, 200, 400, 800, 1000, 1500, 2000, 4000, 6000	Сперматозоиды быка	5%-ный ПЭО-100	84,3% оплодотворящей способности
400	Экспериментальные опухолевые штаммы (асцитная аденокарцинома Эрлиха, карцинома Браун — Пирса)	15%-ный ПЭО-400	90—92% жизнеспособных клеток, хорошая приживаемость
200, 400, 800, 1000, 1500, 2000, 4000, 6000, 1500	Патогенные штаммы простейших (трихомонады и токсоплазмозы)	20—35%-ный ПЭО-400	Сохранение вирулентности и способности к делению
400	Ядра клеток	15%-ный ПЭО-400	87—90% жизнеспособных клеток
400	Митохондрии печени крыс	10%-ный ПЭО-400	Практически не влияет на дыхательную цепь и окислительное фосфорилирование
400	РНКаза кристаллическая	15%-ный ПЭО-400	Сохранение 87,4% активности фермента
400	Некоторые токсины, сыворотки	10%-ный ПЭО-400	Сохранение биологических свойств
400, 500	Сывороточный альбумин	15%-ный ПЭО-400	Сохранение люминесценции в условиях измененной структуры белка

Из приведенных данных видно, что ПЭО с молекулярным весом 4000 обладает наиболее выраженными криопротекторными свойствами по отношению к эритроцитам человека, ПЭО-100 оказывается эффективным при замораживании спермы. Особенно широко исследовано влияние ПЭО с различным молекулярным весом на морфо-функциональное состояние миелокариоцитов, замораживаемых до —196°.

ДРУГИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КРИОЗАЩИТНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Исследование множества различных соединений с целью выявления их криопротекторных свойств при медленном замораживании показало, что защитное действие их на клетки и соматические ткани очень различно. Ниже приведена криопротекторная эффективность различных соединений [см. 567].

Высокая	Средняя	Низкая
Этиленгликоль	Ацетамид	Диметилсульфон
Диэтиленгликоль	Диметилацетамид	ПВП
Пропиленгликоль	Формамид	Сыворотка крови человека и животных
Глицерин	Диметилформамид	
ДМСО	Д-манноза	
Пиридин-α-оксид	Д-рибоза	
Гексаметилентетралин	Глюкоза	
ПЭО	Д-маннитол	
	Сорбитол	
	Инозитол	

В культуре тканей было испытано действие метанола, этанола, фенола, резорцинола и NaCl, которые оказывают токсическое действие на клетки. Следует отметить, что использование криопротекторных соединений дает всегда более высокий эффект выживаемости клеток, если до этого были тщательно выработаны режимы замораживания. Например, можно получить до 70—85% выживаемости эритроцитов человека, если регулировать определенные скорости их замораживания даже в отсутствие криопротекторов. Введение в систему при таких условиях непроникающих сахаров или других полимеров может повысить эти результаты до 95%. Например, было показано, что при быстром замораживании интактных эритроцитов в присутствии 0,2 М лактозы можно получить 95% выживаемости [785—787], а при добавлении 7,5%-ного ПВП с молекулярным весом 30 000 — почти 100%. Считали, что защитный эффект таких непроникающих криопротекторов, как сахара, обусловлен их способностью предотвращать осмотический шок при быстрой элиминации внеклеточной воды. В экспериментальных условиях было показано, что в то время как различные соли повышают чувствительность хлоропластов к инактивирующему действию замораживания, ряд нейтральных растворимых веществ, наоборот, способен легко образовывать связи с водой и оказывать защитный эффект на эти субклеточные частицы.

Высокие защитные качества присущи таким сахарам, как арабиноза, глюкоза и сахароза. С увеличением молекулярного веса эффективность защитного действия подобного рода соединений уменьшается настолько, что декстраны или растворимые крахмалы уже почти не обладают защитными свойствами. Сахароза является одним из наиболее эффективных защитных соединений в отношении хло-

ропластов. Например, для предотвращения инактивации мембран хлоропластов замораживанием достаточно использовать 0,05 М (около 2%) раствор сахарозы. Действительно, установлено, что среди соединений с низким молекулярным весом только сахара встречаются в таком большом количестве в клетках морозоустойчивых растений. Положительная корреляция между содержанием сахара в растении и их устойчивостью к низким температурам была установлена довольно давно, поэтому не возникает сомнения, что аккумуляция сахаров имеет важнейшее значение в процессе выработки устойчивости растения к низким температурам [465]. При этом, однако, важным является место локализации криопротектора внутри клетки. Сахара, локализованные внутри больших вакуолей клеток растений, не способны оказывать защитный эффект на чувствительные межклеточные мембранные системы от криоденатурации.

Другие соединения с небольшим молекулярным весом встречаются в клетках морозоустойчивых растений в меньшем количестве, чем сахара. К их числу относятся аминокислоты, фосфорные соединения, органические кислоты, неорганические соли и др. Некоторые из этих веществ либо не оказывают защитного эффекта либо даже, наоборот, тормозят защитное действие сахаров. Особенно это характерно для солей натрия и некоторых других биокатионов (Mn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}), добавление которых к изолированным хлоропластам, защищенных сахарами, способствует их разрушению при замораживании [705, 706]. Однако увеличение концентрации сахаров предотвращает повреждающее действие солей [359]. Поэтому механизм защитного действия сахаров заключается, очевидно, в обезвоживании клеток, вследствие чего предотвращается образование в них большого количества льда. В процессе постепенного обезвоживания молекулы протоплазмы освобождаются от жидкой фазы воды и стабилизируются в основном структурной (связанной) водой. Следовательно, после такой процедуры следует вводить в клетку различные криопротекторы, которые были бы способны существенно изменить характер кристаллизации льда, не оказывая вместе с тем токсического влияния на биомакромолекулы. Естественное накопление или искусственное введение в клетки низкомолекулярных сахаров, спиртов или других соединений приводит к повышению их концентрации в протоплазме, что позволяет ей осмотически удерживать связанную воду. Считают, что защитные вещества противодействуют сильному дегидратирующему эффекту замораживания и этим удерживают SH-группы соседних белков на расстоянии, достаточном для предотвращения или замедления реакции между ними. Повышение резистентности групп SH к окислению в группы S—S в протоплазматическом белке может быть усилено прибавлением в инкубационную среду различных ингибиторов и стабилизаторов.

Растворы чистых белков можно успешно замораживать in vitro, защищая их активные центры путем экранирования SH-групп

криопротекторами типа ДМСО, цистеина, глицерина и др. Однако методы, дающие эффект при защите белков от криоденатурации in vitro, очевидно, не являются пригодными для применения in vivo. Это зависит по крайней мере от трех основных причин: а) криопротекторы могут изменяться, например, окисляться внутри клетки; б) после проникновения в клетки они могут преобретать токсичные свойства; в) стабилизатор, адресованный к SH-группе, может недостаточно быстро проникать в живую клетку.

Например, было обнаружено, что добавленный глутатион не оказывает защитного действия, поскольку легко окисляется в клетке. Другие стабилизаторы, такие, как *п*-хлормеркурибензоат, этилмаленамид и даже меркаптоэтанол, токсичны, кроме тех случаев, когда они применяются в небольшой концентрации (10^{-4} для меркаптоэтанола и 10^{-5} для *п*-хлормеркурибензоата). Однако если даже и удалось бы стабилизировать отдельные ферменты, ничего не известно о том, как будут они влиять на ткань. Возможно, что они, наоборот, будут увеличивать криоповреждение клеток. Например, клетки костного мозга, замороженные и оттаянные в растворах различных веществ, могут быть предохранены от повреждающего действия холода различными полиалкоголями, аминокислотами и даже неорганическими солями [636]. Вместе с тем таких два меркаптана, как L-цистеин и 2-меркаптоэтилгуанидин, которые способны защищать от криоповреждений изолированные ферменты, оказались неэффективными криопротекторами по отношению к цельным клеткам. Аминокислоты подобные L-цистеину также не способны защищать клетки от криоповреждений. Поэтому криозащитные свойства SH-групп сейчас подвергаются сомнению. При относительно высокой концентрации (0,5 М) меркаптоэтанол снижает устойчивость к замораживанию [443], однако при снижении концентрации до 10^{-2} М это соединение может оказать эффективное криозащитное действие, поскольку, как показано, способно защищать клетки при их высушивании [651]. Тиоловые криопротекторы в принципе, очевидно, оказывают двоякое действие на клетки: они предотвращают криоповреждения либо путем экранирования SH-групп, либо за счет увеличения количества S—S-связей в полипептиде. Такие переходы SH-групп в S—S-связи были показаны при тепловой денатурации бычьего сывороточного альбумина, в процессе которой наблюдалось исчезновение SH-белков [826]. Скорость денатурации этого белка уменьшалась при избытке *п*-хлормеркурибензоата, цистеина или глутатиона в более высоких концентрациях. Активность фосфоглюкомутазы в составе гомогенатов и тканей может быть увеличена при давлении в реагирующую смесь восстановленного цистеина либо восстановленного глутатиона. Однако, как показали исследования, добавление к чистому ферменту восстановленного цистеина способствует его инактивации. Денатурация этого белка-фермента происходит, очевидно, вследствие расщепления SH-группы фермента. Поэтому сни-

тают, что пока не будут найдены эффективные соединения, надежно защищающие SH-группы от разрушения до дисульфидных связей (S—S-связей), лучше всего применять вещества, защищающие белки скорее физически, чем химически (например, применение полиалкоголей, ПЭО, ДМСО).

Следует отметить, что еще очень мало известно о тех белках, которые быстро денатурируют при замораживании. Хотя и предполагается осуществление так называемых «криопротеинов» [465], очень быстро денатурирующихся под влиянием замораживания, нам пока мало известно о природе этих белков и причинах их столь быстрой криоденатурации. Считают, что эти типы белков представляют собой комплексы типа липопротеинов. Вместе с тем имеется много быстро инактивирующихся при низких температурах ферментов, не являющихся липопротеинами. Поэтому в последнее время склонны считать, что быстрая гибель клеток при замораживании происходит вследствие денатурации тех белков, которые связаны с плазматической мембраной.

Таким образом, эффективная защита клеток и тканей от повреждающего действия низких температур становится возможной благодаря интенсивному изучению и внедрению в практику сравнительно новых классов соединений — криопротекторов, представляющих собой самые разнообразные соединения: многоатомные спирты, сахара, неорганические катионы, аминокислоты, биомакромолекулы, а также некоторые сульфоксиды и амиды. Почти все применяемые криопротекторы способны хорошо растворяться в воде и определенным образом влиять на структуру клеточной воды, вступать непосредственно во взаимодействие с гидратной оболочкой биологически активных макромолекул и воздействовать таким образом на их структуру. Очевидно, следует признать целесообразным дальнейший синтез криопротекторов нового типа, оказывающих влияние на структуру воды биологических мембран и гидратационную решетку биомакромолекул. В связи с этим необходимы более глубокие исследования роли и структуры воды, а также действия неэлектролитных растворов в биологических объектах.

Глава XI

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ ОРГАНОВ

Замораживание простых и сложных растворов, коллоидно-белковых систем или отдельных клеточных популяций показало, что охлаждение этих систем требует в каждом отдельном случае разработки индивидуальных скоростей замораживания и способов их криопротекции. Только в этом случае можно рассчитывать на успешное консервирование клеток при низких температурах. Иные проблемы возникают при замораживании многоклеточных систем и в частности органов. В связи с геометрическими особенностями органа, его массы и объема очень трудно определить скорости замораживания, отогрева и низкотемпературного хранения. При замораживании органа возникают значительные температурные градиенты, которые ограничивают скорость распространения температуры от слоя к слою ткани. Это ведет к тому, что клетки разных слоев органа попадают в весьма неодинаковые условия: клетки поверхностных слоев ткани оказываются уже закристаллизованными, в то время как более глубокие находятся лишь в переохлажденном состоянии. Дело осложняется также тем, что при замораживании цельного органа возникает проблема реакции сосудистой системы на понижение температуры. Эта реакция обусловлена в основном следующими факторами: а) эффектом проникновения и выведения осмотически активных криопротекторов; б) непосредственным влиянием низкой температуры на сосуды; в) изменениями, возникающими при восстановлении кровообращения. Поэтому попытки экстраполировать результаты, полученные на одноклеточных системах, при замораживании целых органов являются не всегда адекватными, и они имеют определенную ценность только в общетеоретическом плане.

Общие принципы замораживания органов. Подавляющее число экспериментов, посвященных консервированию органов низкими температурами, было проведено на почке. Поэтому именно на данном примере будут весьма кратко рассмотрены эти принципы.

В настоящее время довольно четко определено, что криопротекторы внеклеточного способа действия эффективны главным образом при быстром замораживании. Однако для замораживания целых органов требуются более медленные скорости замораживания, для чего необходимы соединения, обеспечивающие внутриклеточную защиту.

Использование меченого по C^{14} глицерина при консервировании органов показало, что в процессе его перфузии уже через 20 *мин* меченый материал распределяется в 80% клеток органа.

При использовании ДМСО время эквилибрации уменьшается. Проникновение глицерина происходит более медленно при температуре ниже —20°, в то время как поступление ДМСО в клетки не зависит существенно от окружающей температуры. На повреждение клеток почек во время их перфузии большое влияние может оказывать характер перфузионной жидкости. Глицерин, по всей вероятности, является наиболее эффективным криопротектором, поскольку было показано [523], что из 11 перфузируемых 15%-ным раствором глицерина почек собак 8 сохранило свою функцию, что было доказано в экспериментах после пересадки их глицеринизированных почек in vivo. Что касается эффективности ДМСО, то по этому вопросу существуют разногласия. В одних опытах обнаруживалось, что ни одно из 10 животных не выживало после удаления почки на противоположной стороне при пересадке аутологичной почки, перфузируемой 15%-ным ДМСО и сохраняемой в переохлажденном состоянии в течение 8 *ч*. Использование 13%-ного ДМСО также не давало положительных результатов [415]. Согласно другим данным, при перфузии почки 10%-ным раствором ДМСО начали функционировать только 4 из 7, а после использования 15%-ного ДМСО функционировала только одна из 5 почек [567]. Наряду с использованием криопротекторов для замораживания почки широко применяются в последнее время различные простые и сложные составы перфузатов в качестве предварительного этапа перед замораживанием. Испытаны самые разнообразные составы перфузатов, содержащие наборы органических и неорганических соединений. Анализ результатов этих исследований показал, что принципиально применяемый для насыщения органа перфузат должен содержать сбалансированный набор главнейших электролитов (особенно ионов калия), аминокислот, эффективных спазмолитиков и криопротекторов (глицерин, ДМСО, полиэтиленгликоли либо другие их комбинации). Весьма желательным является проведение перфузии в условиях относительной деаэрации, для чего используют различные инертные газы (неон, аргон). Важнейшим этапом в подготовке органа к перфузии и последующему замораживанию является расчет всех необходимых патофизиологических констант, определяющих скорость потока перфузата, давление, насыщение газом, время перфузии и проникновения в клетки криопротектора. Непосредственное замораживание должно осуществляться при определенных скоростях замораживания и отогрева в специальных контейнерах. Следовательно, замораживание органа представляет собой сложную медико-техническую задачу. Эта проблема еще далека от своего разрешения.

Неудачи посттрансфузионного замораживания прежде всего объясняются образованием отека органа в результате развития гипоксической аноксии в клетках после длительной перфузии и

экспозиции в глицерине. Кроме того, незначительные изменения в составе перфузата резко влияют на выживание органа после воздействия криопротекторов. Поэтому в дальнейшем необходимо обратить внимание на техническую сторону эксперимента и решить проблемы сосудистого спазма, наступающего в органе при замораживании и действии криопротекторов.

Использование различных концентраций криопротекторов тесно связано с вопросом об их элиминировании из органа. Удаление криопротектора из клеток органа довольно сложная технически задача. Было, в частности, показано, что удаление глицерина из органа путем ступенчатого снижения его концентрации путем отмывки уменьшает отечность тканей. Однако эта процедура длительная и клетки могут погибнуть от гипоксии. Кроме того, возникает целый ряд вопросов, связанных со стабилизацией мембран клеток и защитой их от кристаллизационных и рекристаллизационных процессов при замораживании. В связи с этим для более равномерного насыщения органа криофилактиком, предотвращения отека тканей и повреждающего действия кристаллов льда на клетки низкотемпературное замораживание органов производят в условиях повышенного давления. Хотя такие попытки и были предприняты, они дали отрицательные результаты. Перфузированные криопротекторами и замороженные до сверхнизких температур (—196°) почки собаки во всех случаях применения сверхвысоких давлений подвергались некрозу [415]. Как выяснилось в этих опытах, является весьма важным применить не только высокие давления, но и равномерное замораживание органа по всей его толщине.

В результате неравномерного промораживания ткани возникают очень резкие температурные и особенно осмотические градиенты, которые вызывают летальные изменения в клетках почки в момент ее отогрева. Не решены также вопросы отогрева органов, консервируемых при низких температурах, поскольку необходимо использовать также методы отогрева замороженной ткани, чтобы фазовые переходы лед — вода (и связанные с ним вредные воздействия) в клетке практически отсутствовали. В этом отношении предпринимаются попытки использовать СВЧ-энергию, ультразвук, ВЧ-поля и другие виды глубокого тепла. Однако положительных результатов по отогреву цельнозамороженных органов до настоящего времени еще не получено.

Проблема фазозых переходов. Весьма сложную проблему представляют вопросы регулирования температуры и фазовых переходов при замораживании органов. Если замораживать органы небольших размеров (например, почку крысы), то можно путем подбора скоростей замораживания и отогрева получить в некоторых случаях жизнеспособный орган, пригодный для трансплантации. После пересадки таких органов животные обычно выживают после удаления у них почки с противоположной стороны.

Если же размер органов значительно больший, то они могут быть успешно заморожены только при использовании регулируе-

мых скоростей замораживания (примерно в диапазоне от 1 до —20° в минуту под высоким давлением. С целью улучшения регуляции температуры применяют комбинированное охлаждение перфузируемой среды в сочетании с насыщением ее инертными газами для равномерного распределения охлаждения по всей толщине органа. Халац и его сотрудники [см. 415] использовали медленные скорости замораживания (до —20° в минуту) при охлаждении почки теленка. При этом им удалось сохранить функцию 2 из 14 почек после перфузии таких почек ДМСО в течение 20 *мин*. Эксперименты на 38 почках, замороженных после перфузии 20%-ным глицерином или 20%-ным пропиленгликолем, показали, что после их пересадки наблюдается очень низкий процент выживаемости: 4 животных после удаления у них почки с противоположной стороны выжили, хотя и у этих животных ни одна из них не функционировала нормально [415]. Осуществление регулирования температуры во время замораживания почек собаки, которые имеют небольшой вес (80 *г*), представляет не такую трудность, как в случае замораживания органов больших размеров. Это объясняется тем, что лед обладает высокой теплопроводностью и значительной величиной градиентов, которые можно создать, используя в качестве источников холода жидкий азот или гелий. Однако регулируемое и быстрое оттаивание путем погружения в теплую жидкость таких органов не может быть осуществлено, поскольку отогретые ткани на периферии начинают уже функционировать, в то время как центральные части органа остаются в замороженном состоянии, т. е. перепады температурных градиентов при таком способе отогрева остаются довольно высокими.

Поэтому одной из важных проблем является усовершенствование методики отогрева замороженных тканей и органов, причем решающее значение имеет скорость отогрева. Длительное пребывание замороженного органа в интервале температур, способствующих быстрой рекристаллизации (свыше —40° или —30°), вызывает значительные повреждения различных структур клеток. Поэтому весьма перспективным и целесообразным является, очевидно, использование комбинации перфузии органа растворами в присутствии газовой смеси, которая обеспечивает более оптимальные скорости отогрева и снижает интенсивность повреждения внутриклеточных компонентов. Как показали эксперименты, в этом отношении газообразный гелий более эффективен, чем кислород или азот, поскольку он обеспечивает более быстрое распространение тепловой энергии по органу [762]. В некоторых работах отмечалось, что при использовании такого метода можно у 2 из 8 почек полностью восстановить их функцию после замораживания в присутствии глицерина [762]. Орган должен отогреваться также комбинированным способом — погружением в теплую жидкость с одновременной газовой перфузией.

Исследование влияния высокочастотной энергии на отогрев замороженных тканей показало, что использование такого метода

обеспечивает лишь избирательное нагревание оттаявших участков органа, что приводит к резким перепадам градиентов осмотической природы в его тканях. Очевидно, перспективным методом отогрева замороженных органов может быть диэлектрическое прогревание органа (диаметрия), оно легко контролируется и быстро повышает скорость оттаивания. Вместе с тем регулировать температуру отогрева центральных частей органа при использовании любого источника, излучающего тепло, весьма трудно в связи с тем, что введенные внутрь органа термисторы облучают очень ограниченные области и в связи с этим в тканях органа возникают оттаявшие и находящиеся в закристаллизованном состоянии участки. Кроме того, такие методы отогрева мало перспективны, поскольку их нельзя использовать в течение длительного времени. Таким образом, причиной криолиза клеток замороженного органа являются многие причины: фазовые переходы в системе лед — вода при замораживании и отогреве, перфузия и насыщение органа криопротектором и т. д. Все эти вопросы подлежат тщательному изучению.

Использование высоких давлений при замораживании органов. Как уже упоминалось, для нивелирования вредного воздействия фазовых переходов и снижения точки замерзания растворов сейчас пытаются применить сверхвысокое давление. Эти методы впервые были использованы при переохлаждении сердца и почек собаки. Они показали, что клетки почки могут переносить давления 15 000 *атм* в течение 10 *мин* без явных структурных повреждений [415]. Метод сверхвысокого давления может быть использован также для быстрого отогрева, поскольку позволяет максимально сократить время пребывания клетки в зоне рекристаллизации. Очевидно, ткани почек достаточно устойчивы к довольно высокому давлению [415]. Высокое и сверхвысокое давление сейчас широко используют также для более быстрого оттаивания замороженных клеточных суспензий тканей и органов. Однако в больших по размеру органах таяние льда на поверхности и в глубине происходит неравномерно. На поверхности этот процесс протекает быстрее. Благодаря этому трудно быстро отогреть замороженные органы с постоянной скоростью переноса тепла. Поэтому с целью отогрева органов используют комбинированное применение — теплые жидкости и перфузию теплым газом, отогревание ультразвуком либо с помощью диатермии. Оттаивание на водяной бане в сочетании с методом газовой перфузии применяется в тех случаях, когда надо быстро и равномерно прогреть замороженный орган. Отогрев ультразвуком или с помощью диатермии трудно контролировать; при этом часть органа хорошо прогревается, в то время как другая его часть остается менее прогретой или даже замороженной.

Теоретически использование ультравысокого давления для оттаивания органов является перспективным методом, поскольку позволяет очень быстро перевести твердую фазу (лед) в жидкость в течение нескольких секунд без заметного подъема температуры.

Например, блок льда при —8° расплавляется мгновенно при использовании давления 4000 *атм/см²*, а такой же блок льда при —12° требует уже 8000 *атм/см²*. Более того, энергия в форме высокого давления одновременно и равномерно воздействует на замороженную массу и вызывает ее быстрое расплавление. Для замораживания органов под высоким давлением используют специально сконструированные камеры, в которые прибавляют эмульгаторы и, например, развивают давление до 12000 *атм/см²* в течение 60 *сек* с последующей декомпрессией в течение 5 *сек* [415]. В опытах Карова [415] камеру стерильного прибора наполняли 500 *мл* перфузата, включающего среду 199 с pH 7,4, антибиотики и 10 ед. инсулина, а затем охлаждали до +5 или +10°. В качестве криопротекторов использовали пропиленгликоль, этиленгликоль и глицерин в сочетании с пропиленгликолем. Камера в течение 2 *ч* насыщалась криопротекторами до конечной концентрации 1,0 М. Такое медленное добавление пропиленгликоля оказывает меньшее повреждение даже при перфузии при температуре +10°. После прекращения перфузии пластмассовый пакет с почкой наполняли жидкостью, заворачивали в алюминиевую фольгу и помещали в Дьюар с охлажденным ацетоном до температуры —10°. После этого почки охлаждали добавлением кусочков льда до температуры —50° в течение 3 *ч*. Пачку хранили при температуре —79° на протяжении 8—40 *ч* в ящике с сухим льдом.

Отогрев производили путем погружения органа на 10—15 *мин* в водяную баню при +40°. Когда температура внутренних слоев достигала —10°, органы помещали в аппараты высокого давления и подвергали атмосферному давлению. При этом оказалось, что полное оттаивание органа на водяной бане при +40° происходит за 30 *мин*, а в случае применения высоких давлений за 5 *мин*, т. е. в 6 раз скорее, чем при использовании водяной бани. После оттаивания почку подключали к перфузионному аппарату, с помощью которого удаляли криопротекторы (промывание средой 199 в течение 2 *ч*).

Результаты этих исследований показали, что существует обратная зависимость между величиной давления и временем оттаивания. Увеличение давления и укорочение времени оттаивания способствует повышению жизнеспособности тканей.

Основной причиной мгновенного таяния льда при ультравысоких давлениях, т. е. переход его в жидкую фазу, является повышение удельного веса льда с помощью компрессии, в результате чего его точка замерзания резко снижается. Если давление на твердое вещество распределяется равномерно во всех точках поверхности, то с увеличением давления таяние льда происходит мгновенно, независимо от размера органа. Процесс таяния под влиянием теплой жидкости характеризуется тем, что поверхность ткани нагревается быстро, однако эта оттаявшая ткань проводит теплоту в 10 раз медленнее, чем замороженная, в результате чего глубокие слои тканей изолируются и остаются в замороженном состоянии. При

еще большем объеме ткани проведение теплоты по всей массе возрастает во много раз.

Кроме того, высокое давление изменяет скорость биохимических реакций, в клетках сдвигается равновесие метаболических процессов, что и приводит к изменению pH тканей. Эксперименты свидетельствуют о том, что компрессия изолированных ферментов изменяет их общую форму и нарушает конфигурацию активных центров, приводя иногда к денатурации каталитических белков. Эти влияния заметно усиливаются при использовании низких температур.

В этом весьма кратком описании общих принципов низкотемпературного замораживания органов хотелось лишь показать какие большие медико-биологические и технические задачи необходимо решать при реализации на практике этого метода. Те все немногочисленные эксперименты с почками животных, которые замораживались с использованием высокого давления, окончились неудачей. Это, очевидно, связано прежде всего с недостаточными исследованиями тех тонких изменений, наступающих в структурах клеток замораживаемого органа под влиянием высокого давления и гипотермической перфузии. Очевидно, основное количество нарушений в органе наступает в момент замораживания под давлением и в результате оттаивания. Поэтому проблема низкотемпературного консервирования органов может быть успешно решена после разработки тонких методов тестирования ее жизнеспособности, выяснения этапов и скоростей охлаждения и хранения, подбора адекватных криопротекторов и степени давления, методов отогрева и других технических проблем, связанных с конструированием специальной криогенной и перфузионной аппаратуры. Вместе с тем, очевидно, все те попытки, которые уже были приняты в этом отношении, следует считать оправданными, поскольку они позволяют избежать ошибок и осложнений, возникающих при низкотемпературном консервировании органа.

Глава XII

КРИОГЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Для замораживания и длительного хранения различных биологических объектов при низких температурах используется разнообразная криогенная техника, которая позволяет применить для этих целей температуры порядка —100° и ниже вплоть до абсолютного нуля. В настоящее время выпускается очень большое число криогенных приборов, характеристика и описание которых не входит в задачу данной главы. В ней лишь сделаны попытки дать общие сведения по криогенной технике с тем, чтобы ввести читателя в суть проблемы.

Криогенная аппаратура, используемая для замораживания биоматериалов, условно может быть разделена на: а) установки производственного типа для замораживания больших объемов биоматериала (0,5 *л* и больше); б) аппаратура для экспериментальных целей, с помощью которой возможно замораживание сравнительно небольших объемов материала (от 1 до 10 *мл*); в) приборы для научно-исследовательских целей, представляющие собой главным образом различного рода низкотемпературные приставки к микроскопам, спектрофотометрической и другой исследовательской аппаратуре.

Установки производственного типа. В качестве типичного примера установки отечественного производства для низкотемпературного консервирования биоматериала может служить криогенный биокомплекс, созданный Физико-техническим институтом низких температур АН УССР (г. Харьков) в 1968 г. Он состоит из следующих компонентов (рис. 138): а) блока замораживания, который служит для программного охлаждения контейнеров с объектами. Блок имеет устройство для равномерного охлаждения контейнера, сосуд Дьюара с жидким азотом, в котором находится нагреватель, регулирующий подачу паров в охлаждающее устройство; б) блока отогрева, предназначенного для размораживания контейнеров в водяной бане при температуре от +30 — 50°. Блок снабжен теплоэлектронагревателями для подогрева воды, механической мешалкой, насосом для откачки воды и термометром для контроля за температурой воды; в) бункера с жидким азотом емкостью 250 *л* для хранения 30 *л* биоматериала в различных контейнерах. Внутри бункера имеются специальные металлические

кассеты для размещения контейнеров; г) пульта управления для регулировки скорости охлаждения, контроля за температурой непосредственно в биологическом объекте, количества воды в размораживателе. Пульт снабжен системой сигнализации о начале и окончании процесса замораживания, о количестве азота в сосуде Дьюара, о техническом и рабочем состоянии всех частей установки. В установке для низкотемпературного консервирования биообъектов указанной конструкции по сравнению с более последними моделями отсутствовал автоматический регулятор скоростей замораживания. В связи с этим в последнее время в Физико-техниче-

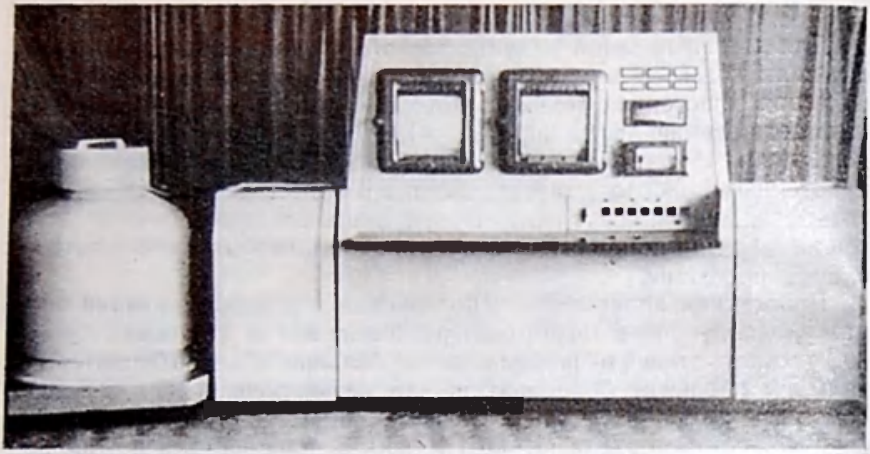


Рис. 138. Установка для замораживания биообъектов конструкции ФТИНТ АН УССР.
Объяснение в тексте.

ском институте низких температур разработаны и выпущены экспериментальные образцы низкотемпературной установки для замораживания больших объемов крови и костного мозга. Программный замораживатель для низкотемпературного консервирования биоматериала, сконструированный институтом в 1972 г., состоит из камеры замораживания, соединенной со 100-литровым сосудом Дьюара через специальный магнитный дроссельный клапан. Автоматический регулятор скорости замораживания позволяет создать до двух тысяч разнообразных программ охлаждения со скоростью от 1 до 100° в минуту. Выполнение программы контролируется с помощью медь-константановой термопары, помещенной в биообъект. Регистрирующим прибором служит специально отградуированный потенциометр ЭПП-09. Программный замораживатель снабжен электронной системой, регистрирующей уровень азота в сосуде Дьюара, начало и окончание процесса замораживания, техническое состояние узлов прибора. Криогенные установки, созданные ФТИНТ АН УССР, отличаются относительно простой конструк-

шей, которая вместе с тем позволяет использовать широкий диапазон скоростей замораживания и обеспечить надежность программного охлаждения.

Аппарат для программного замораживания биологических объектов с пневмоуправлением Московского завода кислородного машиностроения обеспечен системой автоматического регулирования температуры в камере путем подачи паров азота через диффузор. Установка позволяет консервировать одновременно до 7 *л* биоматериала в алюминиевых контейнерах емкостью 150 *см*³. Расход жидкого азота на один цикл замораживания составляет до 50 *кг*. Однако данная установка не обеспечивает надежности в работе,

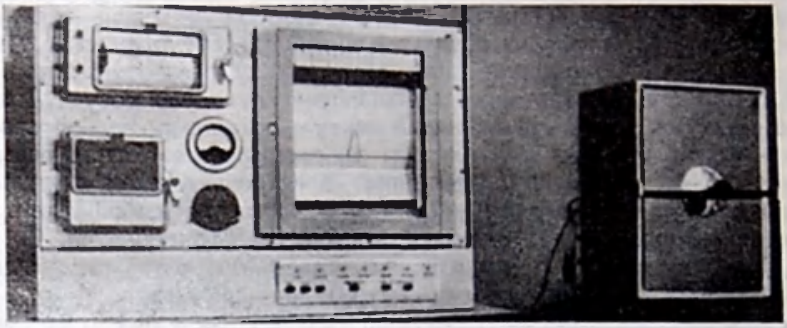


Рис. 139. Установка для низкотемпературной консервации биообъектов конструкции Института кибернетики АН ГрССР.
Объяснение в тексте.

так как не позволяет создавать равномерное низкотемпературное поле в камере, в результате чего темп и скорость охлаждения объекта в очень большой степени зависит от положения контейнера в камере.

В Ленинградском научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови совместно с Ленинградским научно-исследовательским институтом химического машиностроения сконструирован аппарат для замораживания костного мозга в производственных (клинических) и экспериментальных масштабах. Прибор состоит из сосуда для жидкого азота, морозильной камеры на 8 ячеек, испарителя, нагревателя, потенциометра ЭПП-09, а также пульта управления и контроля за скоростью замораживания и отогрева. Расход жидкого азота при замораживании 8 контейнеров емкостью 150 *см*³ составляет 15 *л*. Аппарат позволяет просто и надежно осуществлять плавное и достаточно точное управление процессом замораживания и отогрева в широких температурных интервалах.

Прибор для низкотемпературного консервирования биоматериала, созданный Институтом кибернетики АН ГрузССР в 1968 г. (рис. 139), состоит из небольшой камеры для охлаждения, смонти-

рованной непосредственно на 50-литровом сосуде Дьюара АСД-50. В камере одновременно можно замораживать до 0,5 *л* биоматериала. Камера соединена с пультом управления, который снабжен автоматическим регулятором скоростей замораживания. Контроль за исполнением программы охлаждения ведется с помощью медь-константановой термопары и потенциометра КСП-4. Преимуществом этого замораживателя является возможность регулирования процесса охлаждения в зависимости от температуры биологического объекта в момент замораживания [67, 68].

Используемая для замораживания и охлаждения объектов холодильная камера АХК-4, разработанная Куйбышевским авиаинститутом (1965 г.), имеет цилиндрическую рабочую камеру с теплоизоляцией из пенопласта, внутри которой помещен экран с поддоном для установки канистр с ампулами. Экран повышает эффективность циркуляции паров азота, создаваемую вентилятором. Жидкий азот подается в замораживающую камеру из сосуда Дьюара емкостью 15 *л* в специальный вентиль, откуда по трубопроводу стекает на лопасти вентилятора и распыляется. Эксплуатация вентиля регулируется реверсивным электродвигателем с пульта управления. Программный регулятор представляет собой реле времени селеноидного механизма и задающего потенциометра.

Трехдиапазонная программа позволяет получать следующие скорости охлаждения: первая — от 0 до —20° (скорость от 0,1 до 1° в минуту); вторая — от —10 до —60° (скорость от 1 до 3° в минуту); третья — от —40 до —80° (скорость от 4 до 10° в минуту). После окончания цикла замораживания система автоматического регулирования поддерживает температуру в камере —80°. К недостаткам установки относится ручное переключение диапазонов замораживания и относительно низкая температура в камере после окончания процесса охлаждения.

Аппарат для глубокого охлаждения биологического материала программным управлением КЗ-8, разработанный Московским НИИ хирургической аппаратуры и инструментария, имеет рабочую камеру, в которой уложены змеевики и пространство между которыми заполнено петролейным эфиром. Жидкость азота, находящаяся в змеевиках, охлаждает эфир с погруженными в него контейнерами. Регулировка режима замораживания осуществляется как вручную, так и автоматически с помощью позиционной регулятора электронного потенциометра. Скорость замораживания от 0 до 30° в минуту. Установка надежна в эксплуатации, однако содержит токсичный петролейный эфир, пары которого могут проникать в биоматериал. В аппаратуре программного замораживания с пневмоуправлением КВ-1 5010 000, разработанной Всесоюзным научно-исследовательским институтом криогенного машиностроения в 1964 г. и предназначенной для охлаждения различных объемов биоматериала, жидкий азот под давлением 2 *атм* поступает в замораживатель, где он разделяется на три потока. Первый поступает в балон и подогревается до температуры —15—

25°, а затем поступает в программный регулятор. Второй предназначен для поддерживания постоянной (около —100°) температуры в камеру. Третий служит для охлаждения камеры. В камере можно регулировать температуру от +20 до —196°. На один полный цикл замораживания в среднем расходуется 50 *л* азота. Контейнеры с биоматериалом размещены в камере на двух решетках и замораживаются в потоке газообразного азота, циркуляция которого осуществляется через камеру вентилятором. На дне камеры под нижней решеткой установлен электронагреватель для ускоренного отогрева контейнеров после завершения цикла замораживания. Из отечественных установок, в которых используется низкая температура холодильных машин (фреон, аммиак и др.) и которые предназначены для замораживания и длительного хранения семени сельскохозяйственных животных, следует отметить низкотемпературный генератор с программным управлением (НГП-1), разработанный Харьковским институтом животноводства и ОКБ «Укрторгоборудование». Установка смонтирована по двухкаскадной схеме на основе отечественных герметичных бессальниковых машин ФГ-1,8. Автоматика заданного замораживания осуществляется электронным программным регулятором ПРТЗ-2, который позволяет программировать температурный режим с помощью специальных шаблонов, предварительно вычерченных вручную. Температура замораживающей спиртовой ванны для хранения биообъектов составляет —75—80°. Недостатком установки является то, что при переносе контейнеров с замороженным биоматериалом для хранения в ожиженных газах они смерзаются из-за имеющихся на стенках остатков спирта [74].

Вполне удовлетворительные результаты были получены также при замораживании клеток костного мозга в установках, собранных на основе электрохолодильников ТКС-150 и низкотемпературных прилавков системы «Фрижера» (ЧССР) [69, 70]. Ведущими зарубежными фирмами выпускаются также разнообразные замораживатели для низкотемпературного консервирования биологических объектов. Сведения о некоторых из этих приборов представлены в табл. 53.

Аппаратура для замораживания экспериментального материала. Выпускаемая для экспериментальных целей криогенная аппаратура конструируется главным образом для испытания новых видов криопротекторов и выработки разнообразных оптимальных режимов замораживания. Данные о некоторых приборах такого типа представлены в табл. 54.

Прибор для программного охлаждения полиэтиленовых ампул небольшого размера, выпускаемой фирмой США «Юнион Карбид», состоит из небольшой камеры, соединенной трубопроводом с магнитным клапаном и со 100-литровым сосудом Дьюара. Последний снабжен уровнемером, а также устройством для поднятия давления паров азота в сосуде. Прибор снабжен электронным регулятором температуры.

Таблица 53

Характеристика замораживающих аппаратов некоторых зарубежных фирм

Назначение прибора	Управление прибором	Диапазон рабочих температур, °С	Фирма, страна
Замораживание различных объемов биоматериала	Вручную и автоматически	от +30 до —150°	Spemly Technical Products, LTD (Англия, 1969 г.)
Замораживание небольших объемов биоматериала	Автоматически с помощью электронного устройства	от + 50 до —196°, скорость от 0,5 до 30°	Cryosystems, LTD, модель Freezemaster (Англия, 1969 г.)
Замораживание различных объемов биоматериала	Вручную и автоматически с помощью электронного прибора С-20, который регулирует работу электромагнитного клапана	от +20 до —150°, скорость от 0,1 до 10° в минуту	L'airliavipe, тип СС-40 (Франция, 1969 г.)
Замораживание спермы животных	Автоматически с помощью программного устройства с пневмоуправлением	от +18 до —196°, скорость от 1 до 15° в минуту	Linde, модель 3005 и 3005А (США, 1969 г.)
Замораживание различных объемов биоматериала	Автоматически с помощью электронного прибора	от +25 до —150°, скорость от 0,5 до 30° в минуту	Union Carbide, Модель BF-4—1 и BF-4-2 (США, 1970 г.)
Замораживание крови (до 0,5 *л*)	Автоматическая регулировка, установка обеспечивает встряхивание и перемешивание крови	от +10 до —196°	Linde (США, 1967 г.)
Замораживание больших объемов костного мозга	Программная автоматическая установка	от +18 до —196°	Matburn Research, LTD (Англия, 1966 г.)
Замораживание различных объемов биоматериала	Автоматическая установка с программным электронным замораживанием	от +18 до —195°	Cryo-Diffusion (Франция, 1967 г.)

Таблица 54

Криогенные приборы для экспериментальных целей

Назначение прибора	Техническая характеристика	Температурный диапазон, °С
Замораживание костного мозга	Медный двойной сосуд, охлаждение — углекислота, имеется электронагревательный элемент, регуляция ручная	от 0 до —70°
Замораживание крови в виде гранул	Кровь распыляется из шприца с помощью электромагнитного распылителя	от 0 до —196°, скорость замораживания 0,1—100° в секунду
Замораживание запаянных ампул с биоматериалом	Охладитель — углекислота и этанол, управление автоматическое	от +50 до —15°, скорость замораживания 0,2—15° в минуту
Замораживание клеток крови объемом до 0,33 *см*³	Цилиндрическая конструкция, охлаждение — жидкий азот	от +18 до —196°, скорость замораживания от 0,2° в минуту до 60° в секунду, отогрева — от 0,2° до 500° в секунду
Замораживание различных биоматериалов	В сосуд Дьюара с сухим льдом и метанолом помещен полиэтиленовый сосуд емкостью 300 *см*³, в котором содержится раствор глицерина. В последний помещают пробу	от 0 до —70°, скорость замораживания от 1° до 15° в минуту
Замораживание ампул с биоматериалом	Полистероловая пробка с гнездами для ампул погружается в сосуд Дьюара	от 0 до —196°, скорость замораживания регулируется вручную
Замораживание ампул с биоматериалом	Цилиндрический сосуд с подвешенными ампулами из стекла пирекс погружается в жидкий воздух	от 0 до —100°, скорость замораживания 1° в минуту

В 1963 г. фирмы «Linde» и «Cryogenik» (США) создали лабораторные жидкоазотные аппараты (BF-3 и BF-5) с программным управлением, позволяющие замораживать ампулы с биоматериалом объемом от 2 до 20 *мл*.

Приборы для научно-исследовательских целей. Криогенная аппаратура этого назначения используется главным образом для визуального анализа процессов замораживания и изучения особенностей криоповреждения ядросодержащих клеток крови. К ней прежде всего относятся различные криомикроскопы, а также низкотемпературные приставки к спектрофотометрической аппаратуре.

Созданный в Физико-техническом институте низких температур АН УССР аппарат для микроскопического исследования замороженных препаратов состоит из скругленного экраном сосуда, в который поступает жидкий азот. Нижняя часть камеры для замораживания с зеркально-отполированной поверхностью погружена в жидкий азот. Температура в камере поддерживается нагревательным элементом и измеряется потенциометром ЭПП-09 с медь-константановыми термопарами [34].

Для микроскопирования замороженных объектов используют также камеры, описанные Л. К. Лозина-Лозинским [59] и Г. А. Козловым [46]. Первая камера имеет форму цилиндра и состоит из трех сосудов, вставленных один в другой. Наружный является теплоизоляцией, средний предназначен для сжиженного газа, верхний — для хладоносителя (спирта). Через специальную втулку к камере подсоединяется микроскоп и зажимается в препаратоводителе. Второй тип камеры позволяет микроскопировать объекты в диапазоне температур от +100° до —50°. Установка собрана на основе ультратермостата типа И-8. Хладоагентами служат этанол и твердая углекислота. Подсоединительные коммуникации выполнены из сополимера этилена в смеси с пропиленом среднего давления. Через резиновую прокладку к камере присоединяется микроскоп МБИ-8 или МБР-1. Для предотвращения запотевания используется обдув воздухом.

Для наблюдения за процессами кристаллообразования при замораживании клеток крови и костного мозга Смит [94, 95] использовала медную пластинку, концы которой погружались в азот, сверху укладывали предметное стекло, на котором фиксировали объект исследования. Для предотвращения запотевания покровное стекло смачивали глицерином или пропиленгликолем.

В Физико-техническом институте низких температур АН УССР создано низкотемпературное устройство для рентгеноструктурных исследований процессов кристаллообразования, которое состоит из медного стержня, погруженного в жидкий азот, на выступающем конце которого фиксируют исследуемый образец [108]. Для таких целей используют специальную камеру в виде трубки из органического стекла, через которую продуваются пары азота. В верхнюю ее часть помещают исследуемый образец толщиной 0,3 *мм* в направлении прохождения рентгеновских лучей (см. рис. 89).



Рис. 140. Металлический бункер на 250 л жидкого азота для хранения биоматериала конструкции ФТИНТ АН УССР (г. Харьков).

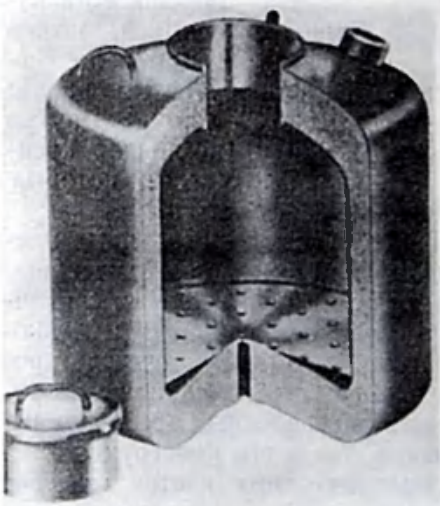


Рис. 141. Схема металлического бункера на 250 л жидкого азота конструкции «Юнион Карбид» (США).



Рис. 142. Металлический бункер на 100 л жидкого азота для хранения биоматериала конструкции фирмы «Юнион Карбид» (США).

Средства для хранения биоматериалов при низких температурах. Для хранения различных биообъектов при низких температурах используют разнообразные металлические бункеры. Для их производства используется нержавеющая сталь с малым содержанием углерода, а также сварка составных элементов вольфрам-ториевыми электродами под струей чистого аргона, чем достигается совершенная дегазированная супер-изоляция. Создаваемый при этом очень высокий межстенный вакуум порядка 10^{-5} *мм рт. ст.* благодаря использованию адсорбента высокого качества не вызывает никаких изменений в металле. На рис. 140 показан внешний вид отечественного бункера, рассчитанный на 250 *л* жидкого азота, который вмещает до 30 *л* биоматериала. На рис. 141 и 142 представлены металлические хранилища на 100 и 500 *л* жидкого азота фирмы «Юнион Карбид» (США). Принципиальная конструктивная схема металлического бункера показана на рис. 143. Как видно, межстенное пространство хранилища заполнено порошково-вакуумной изоляцией, позволяющей значительно сократить суточный расход жидкого азота. Внутри имеются гнезда для крепления кассет, в которых расположены контейнеры с биоматериалом.



Рис. 143. Металлический бункер на 500 *л* жидкого азота для хранения биоматериала конструкции фирмы «Юнион Карбид» (США).

В качестве тары для замораживания суспензий различных клеток используются различные ампулы из стекла, полиэтиленовые мешочки, алюминиевые контейнеры и др. Однако вопросы, связанные с разработкой специальной тары для замораживания и низкотемпературного хранения суспензий клеток, в первую очередь крови и костного мозга, до настоящего времени окончательно не разрешены, поскольку они должны отвечать определенным требованиям, касающимся как материала контейнера, так и его конструкции.

Материал, используемый для замораживания клеток взвесей, должен обладать максимальной биологической инертностью и коррозионной стойкостью, а также иметь большую теплопроводность и достаточную механическую прочность в условиях низких температур.

Конструкция контейнера должна обеспечить равномерное охлаждение всего объема (100—200 *мл*) биологического объекта, а также его герметичность. Не менее важными являются вопросы технологии и стоимости производства контейнеров, легкость его обработки, стерилизации и маркировки. Возможно изменение отдельных требований, если они направлены на улучшение качества контейнеров. В последнее время считают, что использование полимерных материалов (фторопласт) более всего обеспечивает требования биологической инертности контейнера [34, 87].

Используемые в настоящее время для низкотемпературного консервирования и хранения костного мозга алюминиевые контейнеры имеют ряд недостатков [101]. Сюда относится определенная биологическая активность алюминия, а также техническая сложность и дороговизна производства алюминиевых контейнеров. Эти контейнеры трудно отмываются от препаратов крови и костного мозга и поэтому отсутствует возможность контролировать качество отмывки.

Использование полиэтиленовых мешков с алюминиевыми платинами [85] бесперспективно вследствие ярко выраженных краевых эффектов при замораживании костномозговых взвесей, сложности в изготовлении и малой прочности этих конструкций при низких температурах. Вместе с тем разработка и изучение поведения платмассовой тары при низких и высоких температурах является одной из важных задач криобиологии. Внедрение в практику тары из фторопласта пока еще затруднено из-за сложности технологической обработки этого материала. Несмотря на это, разработкой тары из фторопластовой пленки для замораживания крови и костного мозга продолжают заниматься [76, 85]. Поэтому пока плоские алюминиевые и стальные контейнеры являются основной тарой для низкотемпературной консервации суспензий различных клеток.

На Харьковском заводе пластических масс создан контейнер из полимерных материалов для замораживания костного мозга [85]. В качестве материала был выбран нестабилизированный полиэтилен высокого давления, марок П-2020Т или П-2035П (МРТУ-05889265), пригодных для применения в медицинской практике. Исследования показали, что для изготовления тары целесообразно применять полиэтилен высокого давления с невысоким показателем текучести расплава.

Контейнер представляет собой плоскую тонкостенную емкость на 200 *мл* прямоугольной формы с утолщенным бортом и двумя резьбовыми штуцерами диаметром 10 *мм*, высотой 10 *мм*, толщиной стенки 0,4—0,6 *мм*, толщиной борта 6 *мм*. Для равномерного охлаждения всей массы жидкости, заключенной в контейнере, создана прямоугольная форма размером 100 × 240 *мм* и максимальной толщиной 10 *мм*. Для уменьшения термического сопротивления стенок контейнера последние изготавливают минимальной толщины — 0,4 *мм*.

Поскольку теплообмен осуществляется в основном через плоские стенки контейнера, выполненные в виде ребер, торцевые стороны контейнера для придания жесткости конструкции сделаны значительно толще (3 *мм*) (рис. 144). К достоинствам такого типа кон-



Рис. 144. Прямоугольный контейнер из полиэтилена высокого давления для замораживания и длительного хранения клеток костного мозга.

тейнеров относится их высокая биологическая инертность, а также простота изготовления, которая в сочетании с дешевизной сырья обусловливает малую стоимость тары из полиэтилена и возможность его однократного использования.

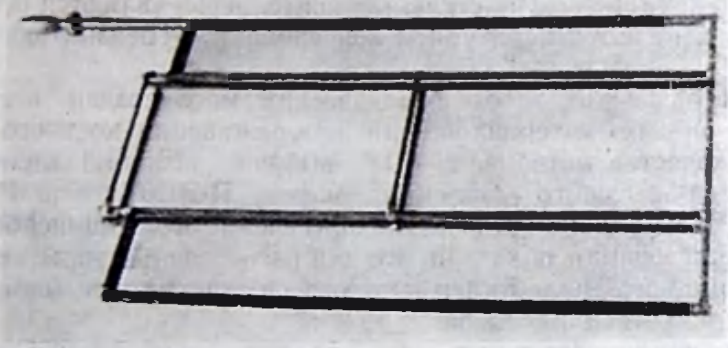


Рис. 145. Оправка для плоских контейнеров.

Главным недостатком контейнера из полиэтилена является их низкая механическая прочность в условиях азотных температур, ведущая к нарушению герметичности тары и стерильности замороженного объекта. Вторым недостатком контейнеров является низкая температура плавления полиэтилена, что исключает стерилизацию тары автоклавированием. В связи с этим для формирования

структуры полиэтилена применяют его радиационную модификацию облучением.

Таким образом, повышение теплостойкости полиолефинов может быть достигнуто благодаря радиационному воздействию, которое приводит к образованию новой пространственной структуры материала. Облученный полиэтилен при действии температур выше интеграла плавления кристаллической фазы не переходит в вязкотекучее состояние и сохраняет свою остаточную прочность при температуре до +200°. Как показали результаты предварительных

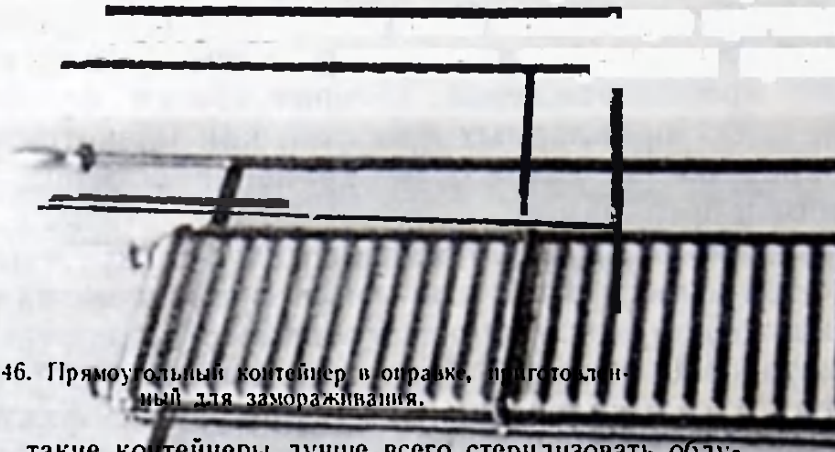


Рис. 146. Прямоугольный контейнер в оправке, приготовленный для замораживания.

исследований, такие контейнеры лучше всего стерилизовать облучением γ-лучами, предварительно поместив их в полиэтиленовые мешки [85].

Для использования прямоугольных контейнеров из полиэтилена высокого давления и металлических в существующих установках для программного замораживания костного мозга, предназначенных для круглых полиэтиленовых контейнеров, разработана специальная оправка (рис. 145, 146). Прямоугольный контейнер, вставленный в такую оправку, помещается в программную установку; при этом каких-либо конструктивных изменений в замораживателе не требуется. Разработка полиэтиленовых контейнеров для низкотемпературного замораживания и длительного хранения костного мозга и других клеточных взвесей является, очевидно, перспективным направлением в технической криобиологии и будет способствовать решению проблемы надежного хранения биообъектов при низких температурах.

* * *

Рассмотренные здесь в общих чертах материалы, касающиеся различных аспектов действия низких температур и криопротекторов на биологические объекты, свидетельствуют о значитель-

ных достижениях в области теоретической и прикладной криобиологии.

Вместе с тем необходимость дальнейшего развития и совершенствования методов низкотемпературного консервирования биологических объектов различного уровня организации требует более глубоких фундаментальных исследований процессов, происходящих в биологических системах под влиянием низких температур и криопротекторов. Очевидно, на этой основе можно будет получить более обоснованные предпосылки для создания общей теории криоповреждений, которая явится фундаментом для решения таких прикладных проблем, как низкотемпературное консервирование и длительное хранение биосред, клеток, тканей, органов и организмов.

Среди фундаментальных исследований следует отметить прежде всего изучение механизмов криоповреждений на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях с привлечением современных методов биофизики, биохимии и цитохимии. Выяснение особенностей взаимодействия температурных факторов и криопротекторов с компонентами клеток позволит подойти к решению проблемы низкотемпературного консервирования более сложных биологических систем, таких как ткани, органы и организмы.

Решение всех этих вопросов может быть осуществлено только на основе разработки, изучения механизма действия и внедрения в экспериментальную практику защитных веществ и сложных сред нового типа, позволяющих сохранять более высокий уровень жизнеспособности. Поэтому проблема криопротекторов является одной из важнейших в криобиологии.

Практическая реализация экспериментально-теоретических исследований и внедрение в клиническую практику консервированных клеток, тканей и органов весьма остро выдвигает проблему криоиммунологических исследований, перспективной целью которых является выяснение влияния низких температур на биологические свойства иммунокомпетентных систем, а также дальнейшее изучение реактивности организма при трансплантации консервированных тканей. С этой проблемой тесно связаны также вопросы криохирургии и криотерапии, которые призваны разработать принципиально новые методы лечения больных.

Решение всех перечисленных выше проблем в большой степени зависит от технической оснастки лаборатории и низкотемпературных банков тканей и органов современным криогенным оборудованием. Поэтому разработка современного и более совершенного криогенного оборудования и средств хранения биологических объектов явится решающим фактором прогресса в области криобиологии и криомедицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абальмасова Е. А. Пересадка консервированных низкими температурами костных гомотрансплантатов в эксперименте. Автореф. канд. дис. М., 1956.
2. Андроникашвили Э. Л. и др.— ДАН СССР, 1966, 171, 1198.
3. Арцимович Н. Г.— В кн.: Трансплантация органов и тканей.— В кн.: Мат-лы IV Всесоюзн. конф. М., 1966, 461.
4. Багдасаров А. А., Дульцин М. С.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1960, 6, 2, 3.
5. Бахметьев П. И. — Природа, 1912, 1, 5, 606.
6. Бахметьев П. И.— Изв. Акад. наук, 1902, 17, 4.
7. Белоус А. М., Лемешко В. В.— В кн.: Материалы международного конгресса по биофизике, 16. М., 1971, 746.
8. Белоус А. М., Лемешко В. В.— В кн.: Актуальные вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, 114.
9. Белоус А. М., Лемешко В. В.— В кн.: Актуальные вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, 123.
10. Богданов Ф. Р., Крамаров И. А.— В кн.: Труды IV съезда ортопедов-травматологов. К., 1960, 112.
11. Боровягин В. Л.— Биофизика, 1971, 16, 746.
12. Вдовенко В. М. и др.— Журн. структ. химии, 1967, 8, 403.
13. Веркин Б. И. и др.— Probl. Transf. u. Haematol., 1973, 1, 3, 117.
14. Виноград-Финкель Ф. Р. и др.— В кн.: 37-й Пленум ученого совета Центр. ин-та гематол. и перелив. крови. Тез. докл. М., 1958, 6.
15. Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г., Федорова Л. И., Каухчишвили Э. И.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1958, 3, 1. 27.
16. Виноград-Финкель Ф. Р., Разумова Л. Л., Кудряшова С. Н.— Биофизика, 1969, 5, 2, 229.
17. Виноград-Финкель Ф. Р. и др.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1963, 8, 5, 3.
18. Виноград-Финкель Ф. Р., Киселев А. Е.— В кн.: Тезисы докл. XII Междунар. конгресса по перелив. крови. М., 1969, 6.
19. Виноград-Финкель Ф. Р., Киселев А. Е.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1970, 4, 3.
20. Волков М. В. и др. Ортопедия, травматология и протезирование, 1965, 9, 20.
21. Воротилин А. М. и др.— В кн.: Тезисы докл. XII Междунар. конгресса по перелив. крови. М., 1969, 49.
22. Глузман М. Х. и др.— В кн.: Высокомолекулярные соединения, 12, 1965, 18.
23. Глузман М. Х., Дашевская Б. И., Шраго М. И.— В кн.: Мат-лы научн. конф. по хронической и острой гипоксии. Харьков, 1970, 142.
24. Грин Д., Флейшер С.— В кн.: Горизонты биохимии. М., 1964, 245.
25. Грин Д., Гольберг Р. Молекулярные аспекты жизни. М., 1968, 152.
26. Гуриков Ю. В.— В кн.: Состояние и роль воды в биологических объектах, 5. М., 1967, 48.

27. Гуриков Ю. В.— Журн. структ. химии, 1969, 10, 583.
28. Гусейнов Ч. С.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1959, 4, 43.
29. Гусейнов Ч. С.— Успехи совр. биол., 1962, 53, 85.
30. Дашевская Б. И.— В кн.: Тр. Харьковск. н.-и. химикофарм. ин-та, 11. Харьков, 1957, 109.
31. Дерягин Б. В., Чураев Н. В. Новые свойства жидкостей. М., 1971.
32. Имамалиев А. С. Заготовка и консервация костей и суставов с применением их в пластике суставов. Баку, 1966.
33. Иткин Ю. А. Исследование некоторых физических процессов, происходящих при замораживании костного мозга. Автореф. канд. дис. Харьков, 1970.
34. Иткин Ю. А., Пушкарь Н.С. и др. — Пробл. гематол. и перелив. крови, 1968, 12, 53.
35 Калабухов Н. И. Спячка животных. Харьков. 1956.
36. Капичников М. М. и др.— В кн.: Мат-лы III Всесоюзн. конф. по пересадке тканей и органов. Ереван, 1963, 202.
37. Карташевский Н. Г. Трансплантация костного мозга в эксперименте и клинике. Л., 1966.
38. Кладченко Л. А. Некоторые показатели углеводного обмена кожи человека в процессе консервирования холодом. Автореф. канд. дис. Харьков, 1970.
39. Кирюхин И. Ф. Спектрополяриметрическое изучение γ-глобулинов яичного альбумина и желатины. Автореф. канд. дис. Харьков, 1965.
40. Киселев А. Е., Федотенков А. Г.— В кн.: Тез. докл. 43-го Пленума ученого совета ЦОЛИПК. М., 1967, 88.
41. Киселев А. Е., Подольский М. В., Смирнова Л. И. и др.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1971, 8, 52.
42. Киселев А. Е., Виноград-Финкель Ф. Р.— В кн.: Тез. докл. XII Междунар. конгрес. по перелив. крови. М., 1969, 6.
43. Коваленко П. П., Перепечай Л. Д.— Вестн. хирургии, 1963, 11, 79.
44. Когут Г. И.— В кн.: Тез. докл. XII Междунар. конф. по перелив. крови. М., 1969, 47.
45. Кондрашова М. Н.— В кн.: Митохондрии, структура и функции в норме и патологии. М., 1971, 25.
46. Козлов Г. А.— Цитология, 1969, 6, 700.
47. Красавцев О. А. Калориметрия растений при температурах ниже нуля. М., 1972.
48. Крупко И. Л.— Ортопедия, травматология и протезирование, 1964, 4, 3.
49. Крупко И. Л., Ткаченко С. С.— Ортопедия, травматология и протезирование, 1965, 12, 3.
50. Кудряшова С. Н.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1966, 9, 11.
51. Лаврик С. С.— Клин. хирургия, 1966, 1, 95.
52. Лаврик С. С.— В кн.: Тез. докл. 43-го Пленума ученого совета ЦО ЛИПК. М., 1967, 89.
53. Лаврик С. С., Полубояринова А. Г.— В кн.: Тез. докл. XII Междунар. конгр. по перелив. крови. М., 1969, 44.
54. Лемешко В. В., Белоус А. М.— В кн.: Актуальные вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, 147.
55. Лемешко В. В., Белоус А. М.— В кн.: Актуальные вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. Харьков, 1972, 143.
56. Леонтович В. А. и др.— В кн. Тез. докл. XII Междунар. конгр. по перелив. крови. М., 1969 47.
57. Лозина-Лозинский Л. К.— ДАН СССР, 1962, 147, 1247.
58. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии. Л., 1972.
59. Лозина-Лозинский Л. К.— Цитология, 1963, 5, 2, 220.
60. Лозина-Лозинский Л. К., Мороз П. Э.— Цитология, 1964, 6, 774.
61. Луговой В. И. и др. — Вопросы мед. химии, 1974, 12, 3.

62. Максимов Н. А.— Изв. СПб. лесного ин-та, вып. 25, 1913, 136.
63. Мамышева Т. К. и др.— В кн.: Актуальные вопр. гематологии и переливания крови. Сб. трудов ЛНИПК, 1963, 14, 491.
63. Манжелий В. Г. и др.— Биофизика, 1969, 14, 3, 575.
64. Манжелий В. Г.— Клин. хирургия, 1967, 4, 52.
65. Марголин В. А.— В кн.: Трансплантация органов и тканей. Мат-лы V Всесоюзн. научн. конф. по пересадке органов и тканей. Горький, 1970, 492.
66. Моин М. Л.— В кн.: Трансплантация органов и тканей. Мат-лы V Всесоюзн. научн. конф. по пересадке органов и тканей. Горький, 1970, 480.
67. Мгебришвили Н. Н., Махатабзе Н. К., Кахиани Ш. В. и др.— В кн.: Мат.-лы Всесоюзн. симпозиума по вопросам консервир., культивир. и типирования костного мозга. М., 1971, 57.
68. Мгебришвили Н. Н.— В кн.: Тез. докл. XII Междунар. конгр. по перелив. крови. М., 1969, 69.
69. Медведев П. М.— Холодильная техника, 1972, 9, 30.
70. Михайлов В. Г.— В кн.: Тез. докл. 43-го Пленума ученого совета ЦОЛИПК. М., 1967, 71.
71. Новикова М. Н. и др.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1968, 2, 16.
72. Новаченко Н. П., Корж А. А. Ортопедия, травматология и протезирование, 1966, 4, 10.
73. Останкова Л. В. Оценка жизнеспособности костного мозга при консервации под защитой полиэтиленоксида. Автореф. канд. дис. Харьков, 1972.
74. Осташко Ф. П. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. К., 1968.
75. Панова М. Н. Костная гомопластика в клинике травматологии и ортопедии. Автореф. докт. дис. М., 1965.
76. Подольский М. В., Иткин Ю. А.— Холодильная техника, 1970, 3, 38.
77. Петров Н. Р. и др.— В кн.: Тез. докл. 43-го Пленума ученого совета по проблемам переливания крови и костного мозга, 1. М., 1967, 93.
78. Привалов П. Л.— Биофизика, 1968, 13, 163.
79. Приоров Н. Н.— В кн.: Труды VI съезда травматологов и ортопедов Украины. К., 1960, 3.
80. Пучков В. В., Кисловский Л. Д.— В кн.: Структура и роль воды в живом организме, 3. Л., 1970, 45.
81. Пушкарь Н. С. Автореф. докт. дис. Харьков, 1968.
82. Пушкарь Н. С. и др.— В кн.: Мат-лы науч.-практ. конф. врачей Харьковской обл. Харьков, 1968, 215.
83. Пушкарь Н. С. и др.— Врач. дело, 1969, 2, 79.
84. Пушкарь Н. С. и др.— В кн.: Трансплантация органов и тканей. Мат-лы V Всесоюзн. науч. конф. по пересадке органов и тканей. Горький, 1970.
85. Пушкарь Н. С. Консервирование глубоким охлаждением (—196° С) костного мозга и его использование в клинических целях. Автореф. докт. дис. Харьков, 1968.
86. Пушкарь Н. С., Цуцаева А. А.— В кн.: Трансплантация органов и тканей. Рига, 1972, 495.
87. Пушкарь Н. С., Шейберг М. Г.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1972, 3, 30.
88. Рыжков С. В. Заготовка и использование эмбриональной крови и посмертных тканей. Л., 1966.
89. Рыжаков Д. Н.— В кн.: Тез. докл. 43-го пленума ученого совета ЦОЛИПК. М., 1967, 364.
90. Самойлов О. Я.— Журн. структ. химии, 1946, 20, 1411.
91. Самойлов О. Я. Структура водных растворов электролитов и гидратация ионов. М., 1957.
92. Самойлов О. Я., Носова Г. А.— Журн. структ. химии, 1965, 6, 798.
93. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М., 1969.
94. Смит А. Биологическое действие замораживания. М., 1963.

95. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения. М., 1969.
96. Тальшинскии Р. Р. и др.— Ортопедия, травматология и протезирование, 1971, 12, 16.
97. Тричер К. С. Биология и информация, М., 1964.
98. Туманов И. И. Физиологические основы зимостойкости культурных растений. М.— Л., 1970.
99. Умнова М. А. и др.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1967, 12, 44.
100. Умнова М. А., Пискунова Т. М.— В кн.: Сб. тр. Узб. н.-и ин-та гематологии и переливания крови, 3. Ташкент, 1969, 127.
101. Федотенков А. Г. и др.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1961, 2, 46.
102. Федотенков А. Г. и др.— В кн.: Тез. докл. XII Междунар. конгр. по перелив. крови. М., 1969, 246.
103. Хакимов Х. А., Давранова Н. Д.— В кн.: Тез. докл. 43-го Пленума ученого совета ЦОЛИПК. М., 1967, 91.
104. Черняк Н. Б., Скопина С. Б.— В кн.: Тезисы докл. XII Междунар. конгр. по перелив. крови. М., 1969, 10.
105. Шмидт П. Ю. Анабиоз, изд. IV. М.— Л., 1955.
106. Шраго М. Н.— Фармакология и токсикология, 1971, 34, 5, 590.
107. Шраго М. Н. О криозащитном действии полимеров окиси этилена на эритроциты человека при глубоком охлаждении. Автореф. докт. дис. Л., 1971.
108. Шраго М. Н., Булатова Р. Ф.— Биофизика, 1967, 1, 163.
109. Ageno M.— Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 1967, 57, 507.
110. Aggeler P. M.— Transfusion, 1961, 1, 71.
111. Albee F. H.— In: Papers on Orthopedic Surgery in the New York Postgraduate Medical School and Hospital N. Y., 1912, 263.
112. Albee F. H.— Amer. J. Surg, 1944, 63, 421.
113. Alberty R. A., Massey V. et al.— J. Amer. Chem. Soc., 1953, 56, 1485.
114. Alberty R. A., Massey V., Frieden C., Fahlbrigge A. R.— J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 2485.
115. Albright J. F., Makinodan T., Mazur P.— Proc. Soc. Exp. Biol., 1963, 144, 489.
116. Alburn H. E., Grant N. H.— J. Amer. Chem. Soc., 1965, 87, 4174.
117. Almand G. H., Anido H. et al.— Dis Chest, 1966, 50, 78.
118. Anderson N. G.— In: Physical Techniques in Biological Research. Ac. Press. N. Y., 1956, 299.
119. Anderson M. L., King F. J., Steinberg M. A.— J. Food. Sci., 1963, 28, 286.
120. Annear A. de — Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 1961, 39, 295.
121. Anstall H. B., Grove-Rasmussen M., Shaw R. S.— Transfusion, 1961, 1, 87.
122. Anstall H. B., Growerasmussen M.— Transfusion, 1961, 1, 94.
123. Araki T., Nei T.— Low Temper. Sci., Ser. B, 1962, 20, 57.
124. Archer G. T., Hirsch J. G.— J. Exp. Med., 1963, 118, 277.
125. Aronson N. N., Davidson E. A.— J. biol. Chem., 1965, 240, 3222.
126. Arpai J.— Biologia (Bratisl.), 1961, 16, 31.
127. Arpai J.— Appl. Microbiol., 1962, 10, 297.
128. Arpai J.— Folia microbiol., 1963, 8, 18.
129. Asahina E.— Contr. Inst. Low Tem. Sci., Horrikado, 1956, 10, 83.
130. Asahina E. Nature (London), 1961, 191, 1263.
131. Asachina E.— Nature (London) 1962, 196, 445.
132. Asachina E.— In: Cryobiology, Ac. Pres. N. Y.— London, 1966.
133. Ashwood-Smith M. J.— Nature (London), 1204, 190, 1961.
134. Avron M.— In: La Photosynthese. Colloques intern. du Centre Natl. Rech. Sci., 119. Paris, 1963, 543.
135. Axhausen G.— Deutsch. Z. Chir., 1908, 91, 388.
136. Axhausen G.— Arch. Klin. Chir., 1909, 88, 23.
137. Balcavage B. X., Beck J. C., Burk D. P., Greenwalt J. W.— Gryobiology, 1970, 6, 385.

138. Ballinger W. F., Weiss A. J., Jackson Z. G., Barr M. A.— J. Amer. med. Ass., 1962, 172, 156.
139. Barnes D. W. H., Loutit J. F.— J. Nat. Cancer Inst., 1955, 4, 901.
140. Basset C. A.— Transplant. Bull., 1957, 4, 162.
141. Basset C. A., Packard G. A.— Acta Orthop. Scand., 1959, 198.
142. Basset C. A.— Transplant. Bull., 1962, 29, 104.
143. Bateman J. B., Stevens C. L. et al.— J. Gen. Microbiol., 1962, 29, 207.
144. Becquerel P.— C. R. Acad. Sci. (Paris), 1950, 231, 261.
145. Bendall D. S., Duve C. de.— Biochem. J., 1960, 74, 444.
146. Bender M. A., Phan the Tran, Smith L. H.— J. appl. Physiol., 1960, 15, 520.
147. Benedict R. G., Sharpe E. E. et al.— Appl. Microbiol., 1961, 9, 256.
148. Bennun A., Avron M.— Biochim. et Biophys. Acta, 1965, 109, 117.
149. Berg L. van den.— Analyt. Chem., 1960, 32, 628.
150. Berg L. van den.— Food. Tech. Champaiyn, 1961, 15, 434.
151. Berg L. van den.— J. Dairy Sci., 1961, 44, 26.
152. Berendsen H. I. C., Migchelsen C.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 125, 365.
152. Berendsen H. I. C., Migchelson C.— Fed. Proc., 1966, 25, 998.
153. Bernal Y. D., Fowler R. H.— J. Chem. Phys., 1933, 1, 515.
154. Bernal J. D., Fankuchen G., Riley D. P.— Nature (London), 1938, 142, 1075.
155. Bernal J. D. The structure of water and its biolegical implications. The State and Movement of Water in Living Organisms (G. E. Fogg ed.). Cambridge Univ. Press, London, 1965.
156. Bernhard R. A., Niemann C.— J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 4085, 4091.
157. Bernhard R. A., Nimann C.— J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 4085.
158. Berthet J., Berthet L., Appelmans F., Duve C. de.— J. Biochem., 1951, 50, 182.
159. Berroche L. V. Eygonnet I. P., Fort V. et al.— Rev. int. Serv. Sante Armees, 1968, 41, 897.
160. Bickis I. S., Henderson I. W.— Cryobiology, 1966, 2, 314.
161. Billingham R. E., Lampkin G. H., Medawar P. B., Williams H. L.— Heredity, 1952, 6, 201.
162. Billingam R. E., Medawar P. B.— J. Exptl. Biol., 1952, 29, 454.
163. Bitensky L.— In: Lysosomes Ciba Fond. Symp. Brown. Boston, 1963, 362.
164. Blackman M., Lisgarten N. D.— Proc. Roy. Soc. A. (London), 1957, 239, 93.
165. Blackman M., Lisgarten N. D.— Phil. Mag., Suppl. 7, 1958, 189.
166. Blackman M., Lisgarten N. D.— Phib. Mag. Suppl. 8, 1958, 200.
167. Blackshaw A. W.— Austral. J. biol. Sci., 1954, 7, 566.
168. Blanchard K. O.— Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1940, 8, 1.
169. Blake C. C., Koenig D. F. et al.— Nature (London), 1965, 206, 757.
170. Bloom M. Z. Rinfret A. P., Witebsky.— In: Proc. VIII th Congr. Inter. Soc. Blood Transf. Karger, Basel — New York, 1962.
171. Bovarnick M. R., Miller L. C., Suyder J. C.— J. Bact. 1950, 59, 509.
172. Bower W. E.— In: Fourth Annual Meeting of the American Society of Cell Biology. Cleveland, 1964.
173. Boyer P. D., Lardy H. et al. The enzymes, Vol. 4 to 8. N. Y., 1963.
174. Bradley S. G.— In: Culture Collect ons: Perspectives and Problems. Proc. Spec. Confer. on Culture Collections. Canada, 1963, 46.
175. Bradlow E. A., Ellis B. C., Abrahams O. L.— Med. Proc., 1960, 6, 253.
176. Brakke M. K.— Advac. Virus Res., 1960, 7, 193.
177. Brandts J. F.— In: Termobiology, N. Y., 1966, 25.
178. Bretz H. W.— Canad. J. Microbiol., 1961, 7, 793.

179. Bretz H. W., Hartsell S. E.— Fd. Res., 1959, 24, 368.
180. Bridgmen P. W.— Proc. Amer. Acad. Sci., 1912, 47, 411.
181. Bricka M., Bessis M.— C. R. Soc. Biol. (Paris), 1955, 149, 875.
182. Bridgmen P. W., Conam J. B.— Proc. Nat. Acad. Sci., 1929, 15, 680.
183. Brinkhous K. M., Penick G. D., Langvell R. D., Wagner R. H., Granam G. B.— A. M. A. Arch. Path., 1956, 61, 1, 6.
184. Broek C. J. H.— Rep. Neth. Ass. Refrig. Tech. 1947. 92, 6.
185. Brown R. B., Huenagel C. A., Pate I. W., Strong W. R.— Surg. Gynec. and Obst., 1953, 97, 657.
186. Brown J. H., Schwarts N. Z.— Proc. Soc. Exper. biology and medicine. 1969, 131, 614.
187. Budtz-Olsen O. E. Clot retraction. Blakwell., Oxford. 1951.
188. Bull H. B., Neurath H.— J. Biol. Chem., 1937, 118, 163.
189. Bruice T. C., Butler A. R.— J. Amer. Soc., 1964, 86, 4104.
190. Bull H. B. Physical Biochemistry. Wollay, N. Y. 1943, 209.
191. Burmester B. R.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1952, 54, 992.
192. Bush X. F.— J. Bone Joint Surg., 1947, 29, 620.
193. Buser P.— Arch. Klin. Chir., 1959, 290, 289.
194. Burwell R. Y., Gowland G. J.—J. Bone Joint Surg., 1962, 44 B, 131.
195. Bush L. F., Garier C. L.— JAMA, 1948, 137, 588.
196. Campbell J. D.— Biodynamica, 1943, 4, 65.
197. Campbell C. J. J.— J. Bone Joint Surg., 1953, 35A, 332.
198. Capella J. A., Kaufman E. H., Robbins J. E.— Cryobiology, 1965, 2, 116.
199. Carrel A.— JAMA, 1912, 59, 523.
200. Carter J. E., Schellpfeffer D. et al.— Cryobiology, 1970, 6, 533.
201. Cavins G. A., Scheer S., Thomas E. D., Ferrebee I. W.— Blood, 1964, 23, 38.
202. Chalmers J., Sissons H. A.— J. Bone Joint Surg., 1949, 41B, 209.
203. Chalmers J. J. — J. Bone Joint Surg., 1959, 41B, 160.
204. Chambeos R., Hale H. P.— Proc. R. Soc. (London), 1932, 110, 336.
205. Chang J. P., Hori S. H.— J. Histochem. Cytochem., 1962, 10, 592.
206. Chaplin H. Ir. Mollison P. Z.— Lancet, 1953, 1, 215.
207. Chaplin H. Ir., Veall N.— Lancet, 1953, 1, 218.
208. Chaplin H., Grawford H., Cutbush M., Mollison P. I.— Lancet, 1954, 1, 852.
209. Chaplin H. Jr., Grawford H., Cutbush M., Mollison P. L. — Clin. Sci. (London), 1956, 15, 1, 27.
210. Chaplin H. Jr., Schmidt P. I., Steinfeld I. Z.,— Clin. Sci. (London), 1957, 16, 4, 651.
211. Chaplin H., Grewpord H., Cutbush M. et al.— J. Clin. Invest., 1962, 41, 1249.
212. Chappell J. B., Greville G. D.—Biochem. Soc. Symp. 1963, 23, 31.
213. Charney J., Machlowitz R., Tytell A. A. et al.— Virology, 1961, 15, 269.
214. Chilson O. P., Costello L. A., Kaplan N. O.— Fed. Proc., 1965, 24, 55.
215. Chormley J. A.— J. Chim. Phys., 1956, 25, 699.
216. Clement M. T.— Canad. J. Microbiol., 1961, 7, 99.
217. Collins G. M., Bravo-Shugarman M., Terasaki P. I.— Lancet, 1969, 2, 7632, 1219.
218. Cohen P., Pringle S. C., Gardner F. H.— Clin. Res., 1958, 6, 199.
219. Cohen S. I.— Blood, 1959, 14, 1345.
220. Cohen Y., Stoclet I. C.— CR. Soc. Biol., 1961, 154, 2023.
221. Cohen P., Gardner F. H.— J. Clin. Invest., 1962, 41, 10.
222. Cohen F., Rowe A. W.— Transfusion, 1963, 3, 427.
223. Cohen F., Rowe A. W.— Vox Sang., 1965, 10, 543.
224. Cohn Z. A., Hirsh J. G.— J. Exp. Med., 1960, 112, 983.
225. Cohn Z. A.— Wiener E.— J. Exp. Med., 1963, 118, 1009.
226. Connell J. J.— J. Sci. Fd. Agric., 1960, 11, 24.

227. Connell J. J.— Biochem. J., 1961, 80, 503.
228. Cooper P.— Advanc. Virus Res., 1961, 8, 319.
229. Cooperstein S. J.— Biochim. Biophys. Acta, 1963, 73, 343.
230. Curtis W. G., Smith W. H. et al.— Bibl. Haematol. (Basel), 1958, 7, 240.
231. Croowfoot D., Shmidt G. M.— Nature (London), 1945, 155, 504.
232. Davies J. D., Ridal E. K. Interlacial Phemomena. Press, N. Y., 1961.
233. Davies J. D., Coulson A. S., Smith A. F.— Cryobiology, 1966, 2, 263.
234. Davis D. F.— Cryobiology, 1961, 5, 70.
235. Davis C. M., Litovitz T. A.— J. Chem. Phys., 1965, 42, 2563.
236. Davson H., Danielli J. F. The Permeability of Natural Membranes. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1952.
237. Dayian G., Rowe A. W.— Cryobiology, 1970, 6, 579.
238. Devik O., Ulrich J. A. — In: Hormel Institute of the University of Minnesota. Annual Rep., 1948—1949, 40.
239. Devik O. Ph. D. Thesis of Univerisity of Minnesota, 1949, 345.
240. Diamend L. W.— Cryobiology, 1964, 1, 95.
241. Dickinson D. B., Misch M. J., Drury R. E.— Science, 1967, 156, 1738.
242. Dilley R. A., Vernon L. P.—Arch. Biochem. Biophys., 1965, 111, 375.
243. Dixon M., Webb E. C. The enzymes. Acad. Press, N. Y., 1964.
244. Djerassi S., Roy A.— Life Sci., 1962, 7, 327.
245. Djerassi S., Roy A.— Blood, 1963, 22, 703.
246. Dolin M. J., Jacobson K. B.— Biochem. Biophys. Res. Communs., 1963, 11, 102.
247. Doebbler G. F., Greco R. E., Rinfret A. P.— Fed. Proc., 1960, 19, 67.
248. Doebbler G. F., Buchheit R. G. et al.— Nature, 1961 191, 1405.
249. Doebbler C. F., Rinfret A. P.— Biochim. et Biophys. Acta, 1962, 58, 449.
250. Doebbler G. F., Rinfret A. P.— J. Bact., 1963, 85, 485.
251. Doebbler G. F., Rinfret A. P.— Gryobiology, 1965, 1, 205.
252. Doebbler G. F., Rowe A. W. et al.— In: Cryobiology Acad. Press, N. Y., 1966, 407.
253. Dorsey N. E.— Trans. Amer. Phil. Soc., 1948, 38, 247.
254. Dowell L. G., Moline S. W., Rinfret A. P.— Biochim. et Biophys. Acta, 1962, 59, 158.
255. Dowell L. G., Rinfret A. P.— Nature (London), 1960, 188, 1144.
256. Dowell L. C., Moline S. W., Rinfret A. P.— Biochim. et Biophys. Acta, 1962 59, 158.
257. Dowell L. G., Rinfret A. P.— Nature, 1969, 188, 1144.
258. Draz S., Minami R. et al., 1971, 70, 3, 446.
259. Drost-Hansen W.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 125, 471.
260. Dulbecco R., Vogt M.— J. Exp. Med., 1954, 99, 767.
261. Dulbecco R.— Proc. Nat. Acad. Sci., 1952, 38, 747.
262. Duve C., Pressman B., Cianetto R., Wattlaux R., Appelmans F.— J. Biochem., 1955, 60, 604.
263. Duve C.— In: Subcellular Particles. Ronald Press, N. Y., 1959, 128.
264. Duve C., Wattiaux R., Wibo M.— Biochem. Pharmac., 1962, 9, 97.
265. Dyer W. J.— Food Res., 1951, 16, 522.
266. Dyer W. J., Morton M. L.— J. Fish. Res. Bd. Can., 1956, 13, 129.
267. Dyer W. J., Morton M. L., Fraser D. I. et al.— J. Fish. Res. Bd. Can., 1956, 13, 569.
268. Dyer W. J., Fraser D. I., Ellis D. G. et al.— J. Fish. Res. Bd. Can., 1957, 14, 627.
269. Dyer W. J., Fraser D. I., McCollum W. A.— J. Fish. Res. Bd. Can., 1957, 14, 925.
270. Ehalt W.— Arch. Klin. Chir., 1954, 279, 44.

271. Ellinger F.— Radiology, 1945, 44, 17.
272. Elworthy P. H.— J. Chem. Soc., 1961, 5385.
273. Enders J. F., Weller T. H., Robbins F. C.— Science, 1949, 109, 85.
274. Ennis R. S., Granda J. L., Posner A. S.—Arthritis and Rheumatism, 1968, 11, 6.
275. Emmens C. W., Blachshan A. W.— Austral. Veterin. J., 1955, 31, 3.
276. Emmelot P., Bos S.— Biochim. et Biophys. Acta, 1968, 150.
277. Epstein H. T., Lauffer M. A.— Arch. Biochem. Biophys., 1952, 36, 371.
278. Falk M., Hartman K. A., Lord R. C.— J. Amer. Chem. Soc., 1962, 84, 3843.
279. Falk M., Hartman K. A. et al.— J. Amer. Chem. Soc., 1963, 85, 135.
280. Farber L., Wynne A. M.— J. Biochem., 1935, 29, 2323.
281. Farrant J.— Nature, 1965, 205, 1284.
282. Farrant J.— J. Pharm. Pharmac., 1964, 16, 472.
283. Farrant J.— Nature (London), 1965, 205, 1284.
284. Fasmann G. D., Niemann C. J.— Amer. Chem. Soc., 1951, 73, 1646.
285. Ferrebel J. W., Billen I. et al.— Blood, 1957, 12, 1096.
286. Fessee W. I.— Nature (London), 1963, 197, 1307.
287. Finn D. B.— Proc. Roy. Soc., 1932, B, 111, 396.
287a. Fishbein W. N., Stowell R. E.— Cryobiology, 1968, 4, 285.
288. Fishbein W. N., Stowell R. E.— Cryobiology, 1969, 6, 227.
289. Fishbein W. N.— Cryobiology, 1971, 8, 293.
290. Fisher M. W.— Biochim. et Biophys. Acta, 1965, 109, 544.
291. Fitzgerald P. R., Levine N. D.— J. Protozool., 1961, 8, 21.
292. Fletcher N. H. The Physics of Rain Clouds, Cambr. Univ. Press, Cambridge, 1962.
293. Florio L., Stewart M., Mugrage F. R.— J. Lab. clin. Med., 1943, 28, 1486.
294. Forsberg A.— Acta radiol. (Stockholm), 1941, 22, 252.
295. Francis T. Jr., Salk J. E.— Science, 1962, 96, 499.
296. Frank H. S., Evans M. V.— J. Chem. Phys., 1945, 13, 507.
297. Frank H. S., Wen Y. W.— Disc. Faraday Soc., 1957, 24, 133.
298. Frank H. S.— Proc. Roy. Soc. (London), 1958 (A), 247, 481.
299. Frankland M., Wynn C. H.— Biochem. J., 1962, 84, 20.
300. Freireich E. J., Levin R. H. et al.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 113, 1081.
301. Fry R. M.— In: Biological Applications of Freezing and Drying. Acad. Press, N. Y., 1954.
302. Gabrio B. W., Donohue D. H. et al.— J. Clin. Invest., 1955, 34, 10, 1509.
303. Gabrio B. W., Finch C. A. et al.— Blood (Balt.), 1956, 11, 2, 103.
304. Ganschow R., Paigen K.— Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1967, 58, 938.
305. Del Gatto L., Nichols A. V., Lindgren F. T.— Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1959, 101, 59.
306. Gehenio P. M.— Fed. Proc., 1958, 17, 52.
307. Gehenio P. M., Luyet B.— Biodynamica, 1959, 8, 81.
308. Gehenio P. M., Luyet B. J.— Biodynamica, 1963, 8, 81.
309. Gerchards E., Gibian H.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1957, 141, 65.
310. Glasstone S. Textbook of Physical Chemistry (2nd Ed.). N. Y., 1946, 348.
311. Glauser S. C., Talbot T. R.— Amer. J. med. Sci., 1956, 21, 75.
312. Gibbs J. W.— Trans. Conn. Acad. Arts Sci., 1889, 3, 108.
313. Gibbs M. B., McCord R. B., Collins W. S.— Transfusion, 1962, 2, 100.
314. Gikas P. W., Knorpp C. T., Thompson N. W., Merchant W. R.— In: Proc. Xth. Congr. Inter. Soc. Blood Transf. Stockholm, 1964, 714.

315. Gillissen G., Groeneveld H. B.— Naturwissenschaften, 1960, 47, 65.
316. Goodman I. W.— Blood, 1963, 21, 177.
317. Gorill R. H., McNeil C. M.— J. Gen. Microbiol., 1960, 22, 437.
318. Gorke H., Land W.— Vers. Sta., 1913, 65, 149.
319. Gottschalk A.— In: The Enzymes, 4. Acad. Press, N. Y., 1967, 472.
320. Gould E.— In: F. A. O. Symposium on the Significance of Fundamental Research in the Utilization of Fish, Husum, Germany 1964.
321. Grachame E. F., Pace M. M.— Cryobiology, 1967, 4, 75.
322. Grant N. H., Clark D. E. et al. J. Amer. Chem. Soc., 1961, 83, 4476.
323. Grant N. H., Alburn H. E.— Biochemistry, 1965, 4, 1913.
324. Grant N. H., Alburn H. E.— Science, 1965, 150, 1589.
324a. Grant N. H.— Discovery, 1966, 27, 26.
325. Greaves R. I. N.— In: Recent Research In Freezing and Drying. Blackwell, London, 1960.
326. Greaves R. I. N.— J. Hyg., 1942, 41, 489.
327. Greaves R. I. N.— Nature, 1944, 153, 485.
328. Green D. E., Fleischer S.— In: Metabolism and Physiological Significance of lipids. N.Y., 1965, 581.
329. Greiff D., Pinkerton H.— J. Exp. Med., 1954, 100, 81.
330. Greiff D., Myers M.— Biochim. et Biophys. Acta, 1961, 50, 233.
331. Greiff D., Myers M.— Nature (London), 1961, 190, 1202.
332. Greiff D., Rightsel N. A., Schuler E. E.— Nature (London), 1964, 202, 624.
333. Greiff D.— In: Cryobiology, Acad. Press, N. Y.— London, 1966.
334. Greiff D.— In: Recent Research in Freezing and Drying. Blackwell, Oxford, 1967.
335. Hagihara, Takeyoshi N. et al.— J. Biochem. (Tokyo), 1956, 43, 469.
336. Haines R. B.— Proc. R. Soc. (London), 1938, 124, 451.
337. Hall D. O., Palmer J. M.— Nature, 1969, 221, 717.
338. Ham A. W., Harris W. R.— In: Biochemistry and physiology of bone. Acad. Press, N. Y. 1956, 475.
339. Hammond B R., Gutfreund H. J.— J. Biochem., 1959, 72, 349.
340. Hamilton R., Holst H. I., Leh H. B.— Cryobiology, 1966, 2, 316.
341. Hanafusa N.— Low Temp. Sci., 1962, B. 20, 52.
342. Hanafusa N.— Low Temp. Sci., 1964, B. 22, 81.
343. Hanafusa N.— In.: Proc. Int Conf. Low. Temp. Sci., II. Sapporo, Japan, 1967, 33.
344. Hansen I. A., Nossal P. M.— Biochim. et Biophys. Acta, 1955, 16, 502.
345. Harris R. J. C.— In: Biological Applications of Freezing and Drying. Acad. Press, N. Y., 1954, 38.
346. Harris J. W.— Int. J. Radiat. Biol., 1966 11, 465.
347. Harrison A. P.— J. Bact., 1955, 70, 711.
348. Harrison A. P.— Leeuwenhock ned. Tijdschr., 1956, 22, 407.
349. Harrison A. P., Hansen P. A.— Leeuwenhock ned. Tijdschr., 1963, 29, 22.
350. Harrison A. P., Pelezar M. J.— J. Gen. Microbiol., 1963, 30, 385.
351. Harrison A. P., Frevelyan W. S.— Nature (London), 1963, 200, 1185.
352. Harrison A. P., Pelezar M. J.— J. Gen. Microbiol., 1963, 30, 395.
353. Hawkey C. M., Anstall H. B. et al.— Transfusion, 1962, 94.
354. Haynes L. L., Tullis J. L. et all.— JAMA, 1960, 173, 1657.
355. Hays R. M., Leaf A.— J. Gen. Physiol., 1962, 45, 905.
356. Hays R. M., Leaf A.— J. Gen. Physiol., 1962, 45, 933.
357. Heber U.— Protoplasma, 1959 2, 284.
358. Heber U., Santarius K. A.— Plant Physiol., 1964, 39, 712.
359. Heber U.— Plant Physiol., 1967, 42, 1349.

360. Heber U., Ernst R.— In: Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms. Internat. Confer. on Low Temp. Sci., 1966, Sapporo, Japan, 1967, 63, 79.
361. Heber U.— Cryobiology, 1968, 5, 188.
362. Heber U.— In: Cryobiology. N. Y.— London, 1966.
363. Hechter O.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 125, 625.
364. Hegarty C. P., Weeks O. B.— J. Bact., 1940, 39, 475.
365. Heines R. B.— Proc. R. Soc. (London), 1938, B, 124, 451.
366. Hempling H. G.— J. Gen. Physiol., 1960, 44, 365.
367. Henaff F.—In: Recent Research in freezing and drying. Blackwell. Oxford, 1962, 295.
368. Henderson W. D.— Cryobiology, 1970, 6, 581.
369. Hill B. R.— Cancer Res., 1954, 14, 513.
370. Hill B. R.— Cancer Res., 1956, 16, 460.
371. Hilling et al.—In: Cryobiology. Acad. Press. N. Y.—London, 1966, цит. по [541].
372. Hofstee B. H. J.— J. Amer. chem. Soc., 1960, 82, 5166.
373. Hogarty C. P., Weeks O. B.— J. Bact., 1940, 39, 475.
374. Hokin L. E., Hokin M. R.— Biochim. et Biophys. Acta, 1963, 67, 470.
375. Horsfall F. L.— J. Bact., 1940, 40, 559.
376. Hsu L., Tappel A. L.— J. Cell Biolog., 1964, 23, 233.
377. Huggins C. E.— Transfussion, 1963, 3, 483.
378. Huggins C. E.— Science, 1963, 139, 504.
379. Huggins C. E.— Ann. Surg., 1964, 160, 643.
380. Huggins C. E.— Fed. Proc., 1965, 24, Suppl. 15, 190.
381. Hultin E.—Acta Chem. Scand., 1955, 9, 1700.
382. Huntsman R. E., Hurn B. A. L., Lehmann H.— Brit. med. J. 1960 2, 118.
383. Huntsman R. G., Hurn B. A. L. et al.— Transfusion, 1964, 4, 354.
384. Hurn F. I.— In: Proc. 10 th Congr. Inter. Soc. Blood Transf. Stockholm, 1964, 347.
385. Hurn F. I.— In: Blood Storage, Chap. 3. N. Y.— London, 1966, 19.
386. Hutchisen J.— Brit. J. Surg., 1951, 39, 552.
387. Hyatt G. W.— Amer. Acad. Orthop. Surg. Instructional Course Lect., 1960, 17, 133.
388. Hyatt G. W., Turner T. C., Bassett C. A. L., Pate S. W., Sanyer P. N.—Postgrad. Med., 1952, 12, 239.
389. Hyatt G. W.— Transplant. Bull., 1954, 1, 159.
390. Hyatt G. W.— In: Recent Research in Freezing and Drying. 1959, 251.
391. Janas R. E. E., Tomlinson M.— J. Fish. Res. Bd. Can., 1962, 19, 733.
392. Jesmann et al.— In: Cryobiology. N. Y.— London, 1966, 23.
393. Jhon M. S., Oroch J. et al.— J. Chem. Phys., 1966, 44, 1465.
394. Jolly W., Harris R. A., Asai J. et al.— Arch. Biochem., 1969, 130, 191.
395. Jones N. C. H., Mollison P. L., Robinson N. A.— Proc. Roy. Soc., 1957, B, 147.
396. Jones F. I.— In: Cryobiology. Acad. Press, N. Y.— London, 1966, 245.
397. Jones N. R., Murray J.— Biochem. J., 1961, 80, 26.
398. Josling M. A.— J. Sci. Fd. Agric., 1951, 2, 218.
399. Jessiman A. G., Walter C. W.— Surg. Forum, 1950, 36, 529.
400. Juul P.— Clin. Chem., 1967, 13, 416.
401. Kanwisher J.— [Цит. по [567]].
402. Kaplan N. O.— In: Subunit structure of protein, Brookhaven Natl. Lab. Upton. N. Y., 1964, 532.
403. Kaplan N. O. Lactic dehydrogenase: Structure and function.— In: Subunit structure of Protein. Brookhaven Natl. La., Upton, N. Y., 1964, 131.
404. Khan A. W., Van den Berg L. et al.— J. Food Sci., 1963, 28, 425.
405. Kavanau J. L.— J. Gen. Physiol., 1950, 34, 133.

406. Kavanau J. L.— In: Water and Solute Water Interaction. San-Francisco Holden Day, 1964.
407. Kauzmann W.— In: The Mechanism of Enzyme Action. Baltimore Johns Hopkins Press. 1954 38.
408. Kauzmann W.— Advan. Protein Chem., 1959, 14, 1.
409. Kauzmann W. J.— Federat. Proc., 1965, 24, Suppl. 10, 15.
410. Karow A. M. Jr., Webb W. R., Stapp J. B.— Arch. Surg., Chicago. 1956, 91, 572.
411. Karow A. M., Webb W. R.— Cryobiology, 1965, 1, 270.
412. Karow A. M. J., Webb W. R.— Cryobiology, 1965, 2, 99.
413. Karow A. M., Carrier O. Jr., Clower B. R.— J. Pharm. Pharmac., 1968, 20, 297.
414. Karow A. M.— J. Pharm. Pharmac., 1969, 21, 209.
415. Karow A. M.— Gryobiology, 1969, 5, 429.
416. Kartha G., Bello J., Harker D.— Nature (London), 1967, 213, 862.
417. Keane J. F.— Biodynamica, 1953, 7, 157.
418. Kelly R., Greiff D., Anderson D.— J. Immunol., 1962, 89, 815.
419. Kendrew J. C.— Brookhaven Symp. Biol., 1962, 15, 216.
420. Ketchel M. M., Favour C. B., Sturgis S. H.— J. Exp. Med., 1958, 107, 2, 211.
421. Ketchel M. M., Tullis J. L., Gibbon I. G., Tinch R. I., Dritscoll S. G.— Bibl. haemat. Basel. 1958, 7, 320.
422. Kettenborg H. K., de Vries S. I., Pol E. T.— Rev. belge path. et med. exper., 1955, 24, 136.
423. Kingery W. D.— J. Appl. Physiol., 1960 31, 833.
424. Kingery W. D. et al.— J. Appl. Physiol., 1955, 26, 1205.
425. Kiehn C. L., Friedell H., Benson J., Berg M., Glover D. M.— Ann. Surg., 1950, 132, 427.
426. Kiehn C. L., Cebul F., Berg M., Gutentog J., Glover D. M. — Ann. Surg., 1952, 136, 404.
427. Klein E., Eridani S., Djerassi I., Resnick R.— Amer. J. Clin. Path., 1958, 29, 550.
428. King F. J.— Quick Froz. Fd., 1962, 25, 115.
429. King F. J., Anderson M. L., Steinberg M. A.— FAO Inter. Conf. Fish. Nutr. (Wachingtoon), 1961, C11, 2.
430. King F. J., Anderson M. L., Steinberg M. A.— J. Food Sci., 1962 27, 363.
431. Klotz L. M.— Science (N. Y.), 1958, 128, 115.
432. Klotz L. M.— Science (N. Y.), 1958 128, 815.
433. Klotz L. M.— In: Horizont in Biology. Brookhaeven Natl. Lab., Upton. N. Y., 1962, 532.
434. Klotz L. M., Stellwagen E. C. et al.— Biochim. Biophys. Acta, 1964 86, 122.
435. Klotz L. M.— Fed. Proc., 1965, 24, pt. III. Suppl. 15, 2.
436. Khan A. W., Davidkova E. et al.— Cryobiology, 1968 4, 184.
437. Koenig H., Gaines D. et al.— J. Neurochem., 1964 11, 729.
438. Koffler H.— In: Molecular mechanisms of temperature adaptation N. Y.— London, 1967, 203.
439. Kreutz W., Weber P.— Naturwissenschaften, 1966, 53, 11.
440. Kreutz F. P., Hyatt G. W., Turner T. C., Basset A. L.— J. Bone Joint Surg., 1951, 33A, 803.
441. Kreutz W., Menke W. Z.— Naturforsch., 1960, B. 15, 483.
442. Kreutzer H. H., Fennis W. H. S.— Clin. Chim. Acta. 1964, 9, 64.
443. Krull E. Effect of protective Substances and SH-reagents on frost hardines. Philadelphia, USA. 1966.
444. Kühn W.— Helv. chim. acta, 1956, 39, 1071.
445. Iossifides I. A., Gisler P. et al.— Blood, 1962, 20, 762.
446. Iossifides I. A., Gisler P. et al.— Transfusion, 1963, 3, 167.
447. Ilbery P. L. T., Meszaros S., Winn S. M.— J. Appl. Physiol., 1961, 16, 767.

448. Lasnitzky I.— In: Radiological Sympos. Acad. Press. N. Y.. 1955. 231.
449. Lauffer M. A.— J. Biol. Chem., 1942. 143; 99.
450. Lauffer M. A.— J. Amer. Chem. Soc., 1944. 66, 1188.
451. Lauffer M. A., Miller G. L.— J. Exp. Med., 1944. 80, 521.
452. Lauffer M. A., Taylor N. W., Wunder C. C.— Arch. Biochem. Biophys., 1952. 40, 453.
453. Lazaroni J. A., Maier E. C. et al.— Clin. Chem., 1958. 4, 379.
454. Lawrie R. A.— J. Sci. Fd. Agric., 1963. 14, 65.
455. Lea C. H., Hannan R. C. et al.— Biochem. J., 1950. 47, 626.
456. Lee D.— Biochim. et Biophis. Acta. 1971. 233, 3. 619.
457. Lehninger A. L.— Physiol. Rev., 1962. 42, 467.
458. Lehr H. B., Berggren R. B., Summers A. H. et al.—Cryobiology. 1964. 1, 194.
459. Leibo S. P., Jones R.— Arch. Biochem. Biophys., 1964. 106, 78.
460. Lenaz G.— Ital. J. Biochem., 1970. 19, 54.
461. Lennett E. H., Smith M. G.— J. Infect. Dis., 1939. 65. 252.
462. Lentz W.— Arch. Klin. Chir. 1954. 279, 52.
463. Lepine P., Sautter V.— Ann. Inst. Pasteur. 1941, 67, 371.
464. Lepine P., Levaditi J. C., Reinie L.— Ann. Inst. Pasteur, 1948, 74, 140.
465. Levitt J. The Hardness of Plants. Acad. Press, N.Y., 1956.
466. Levitt J.— In: Protoplasmatologia, VIII. Frost. Drought and Heat Resistance. Springer-Verlag. Wien. 1958. 87.
467. Levitt J.— J. Theoret. Biol., 1962. 3, 355.
468. Levitt — Gryobiology, 1966. 3, 243.
469. Levitt J.— In: Cryobiology. Acad. Press. N.Y.— London, 1966, 495.
470. Lejeune N., Thines-Sempoux D. G. et al.— Biochem. J., 1963. 86, 16.
471. Lewitt J. The Hardiness of Plants. Acad. Press. N. Y., 1956.
472. Lo Grippo G. A., Berger B.— J. Lab. clin. Med. 1952. 39, 970.
473. Linko R. R.— Kylteknisk Tidskr. 1962. 3, 50.
474. Linko R. R., Nikkilia O. E.— J. Fd. Sci., 1961. 26, 606.
475. Lindeberg G., Lobe A.— Canad. J. Microbiol. 1963. 9, 523.
476. Ling N.— Fed. Proc. 1965. 24, 103.
477. Lion M. B., Bergmann E. D.— J. Gen. Microbiol., 1961, 24, 191.
478. Lohman W., Fowler C. F., Moss A. J., Perkins W. J.— Experientia, 1964. 20, 290.
479. Lolli A. L. U. S. Patent. No 2689203. Sept. 14, 1954.
480. Loomis W. F.— Arch. Biochem. 1950. 26, 355.
481. Loran J.— In: Cryobiology. Acad. Press, N. Y.— London, 1966.
482. Lorant A., Lorant G. I., Angrist I. A., Korpmar R.— J. Clin. Invest., 1953. 32, 1005.
483. Lotke P., Schwarta S. J.— Surgery. 1970, 63, 488.
484. Love R. M.— Nature (London), 1956. 178, 988.
485. Love R. M.— J. Sci. Fd Agric., 1961. 12, 439.
486. Love R. M., Ironside J. I. M.— J. Sci. Fd. Agric., 1958. 9, 604.
487. Love R. M.— J. Food. Sci., 1962. 27, 544.
488. Love R. M., Olley J.— FAO Symp. Significance of Fundamental Research in the Utilization of Fish. Husum. Cermany. 1964. 315.
489. Love R. M., Elerian M. K.— J. Sci. Fd. Agric., 1964. 15, 805.
490. Love R. M., Aref M. M., Elerian M. K. et al.— J. Sci. Fd. Agric., 1965. 16, 259.
491. Love R. M.— In: Gryobiology, Acad. Press, N. Y., 1966. 398.
492. Lovelock J. E.— Biochim. et. Biophys. Acta. 1953. 10, 414.
493. Lovelock J. E.— Biochim. et Biophys. Acta, 1953 a, 11, 28.
494. Lovelock J. E.— In: Preservation and Transplantation of Normal Tissues. Boston, 1954.
495. Lovelock J. E.— Biochem. J., 1954, 56, 256.
496. Lovelock J. E.— Biochem. J., 1955, 60, 692.
497. Lovelock J. E.— Proc. Roy. Soc. (Biol.), 1957, 147, 427.

498. Lovelock J. E., Bishop W. H.— Nature, 1959, 183, 1394.
499. Lovelock J. E., Smith A. U.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1959, 80, 487.
500. Lovern J. A., Olley J.— J. Food Sci., 1962, 27, 551.
501. Luck H.— Biochem. Ztschr., 1957, 328, 411.
502. Lumry R.— In: The Enzymes. Acad. Press, N. Y., 1959, 207.
503. Lumper L., Zahn H.— Advance. Enzymol., 1965, 27, 199.
504. Lund A. J., Lundberg W. O.— In: Annual Report Hormel Inst. Univ. of Minnesota, 1949—1950, 47.
505. Lundberg A., Estwick N.— Cryobiology, 1970, 6, 579.
506. Lusena C. V., Cook W. H.— Arch. Biochem., 1953, 46, 232.
507. Lusena C. V.— Arch. Biochem. Biophys., 1955, 57, 277.
508. Lusena C. V., Rose D.— Arch. Biochem. Biophys., 1956, 65, 534.
509. Lusena E. V.— Canad. J. Biochem., 1965, 43, 1787.
510. Lusena C. V., Dass E. M.— Canad. J. Biochem., 1966, 44, 775.
511. Lusena C. V.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, 85, 541.
512. Luyet B. J., Hodapp E. L.— C. R. Soc. Biol. (Paris), 1938, 127, 786.
513. Luyet B.— J. Phys. Chem., 1939, 73, 881.
514. Luyet B. J., Gehenio P. M.— Biodynamica, 1940, 1, 341.
515. Luyet B. J.— In: Preservation of the Formed Elements and the Proteins of the Blood, 1949, 441.
516. Luyet B. J., Menz L.— Biodynamica, 1951, 7, 25.
517. Luyet B. J., Gehenio P. M.— Science, 1952, 116, 526.
518. Luyet B. J., Gehenio P. M.— Biodynamica, 1955, 7, 273.
519. Luyet B. J., Gehenio P. M.— Anat. Rec., 1956, 125, 615.
520. Luyet B. J., Rapatz G.— Biodynamica, 1958, 8, 1.
521. Luyet B. J., Tanner J., Parat J.— Biodynamica, 1962, 9, 21.
522. Luyet B. J., Rapatz G. L., Gehenio P. M.— Biodynamica, 1963, 9, 95.
523. Luyet B. J.— Fed. Proc., 1965, 24, 315.
524. Luyet B. J.— In: Cryobiology. Acad. Press, N. Y.—London, 1966, 135.
525. Lygmuht A.— Chir. Narodow Ruchu i Orthop. Polska, 1937, 10, 223.
526. McKenzie A., Luyet B.— Biodynamica, 1962, 9, 47.
527. McKenzie A. P., Luyet B. J.— Biodynamica, 1963, 9, 147.
528. McKenzie A., Luyet B.— In: Fifth International Congress for Electron Microscopy, 2. Acad. Press, N. Y., 1963., 206.
529. Maier V. P., Tappel A. L., Volman D. H.— J. Amer. Chem. Soc. 1955, 77, 1278.
530. Major C. P., McDougal J. D., Harrison A. P.— J. Bact., 1955, 69, 244.
531. Marcovich R., Latarjet R.— Adv. Biol. Med. Phys., 1958, 6, 75.
532. Markert C. L.— Science, 1963, 140, 1329.
533. Mason B. J. The Physiology of Clouds. Oxford Univ. Press, London, 1957.
534. Massey V., Hoffmann T. et al.— J. Biol. Chem., 1962, 237, 3820.
535. Mazur P., Weston W. H.— J. Bact., 1956, 71, 257.
536. Mazur P., Phian M. A., Mahlandt B. G.— Arch. Biochem. Biophys., 1957, 74, 247.
537. Mazur P.— Biophys. J., 1961, 1, 247.
538. Mazur P.— J. Bact., 1961, 82, 622.
539. Mazur P.— In: Culture Collections, Perspective and Problems. Univ. Press, Toronto, 1963, 59.
540. Mazur P.— Biophys. J., 1963, 3 323.
541. Mazur P.— In: Cryobiology. Acad. Press, N. Y.— London, 1966, 310.
542. Mazur P.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 125, 658.
543. Mazur P.— Cryobiology, 1966, 2, 181.
544. Mazur P.— Science, 1970, 168, 939.
545. McCarty R. E., Racker E.— In: Energy conversion by the photosynthetic apparatus. Brook haven Natl. Lab., Upton, N. Y., 1967, 202.
546. McGee H. A., Jr., Martin W.— Gryobiology, 1962, 2, 47.
547. McGee H. A., Martin W. J.— Gryogenics, 1962, 9, 47.
548. Medawar P. B.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1957, 68, 255.

549. Melcher A. H., Ireing J. T.— J. Bone Joint Surg., 1963, 45,B, 162.
550. Melnick J. L.— J. Infect. Dis., 1946, 79, 27.
551. Menz L., Luyet B.— Biodynamica, 1962, 9, 1.
551a. Menz L., Luyet B.— In: Abctracts of the Biophysical Soc. 7-th Annual Meeting, N. Y., 1963, 135.
552. Meryman H. T., Moore S. W.— J. Appl. Physiol., 1953, 6, 15.
553. Meryman H. T., Platt W. T.— Naval Med. Res. Inst., 1955, 13, 1.
554. Meryman H. T., Kafig E.— Naval. Med. Res. Inst., 1955, 131, 953.
555. Meryman H. T.— Science, 1956 124, 515.
556. Meryman H. T.— Milt. Med., 1957, 121, 261.
557. Meryman H. T.— Physiol. Rev., 1957 37, 233.
558. Meryman H. T.— Proc. R. Soc. Ser. B. Biol. Sci., 1957, 147 (929), 452.
559. Meryman H. T., Hollingsworth J. W.— Bibl. haemat., 1958, 7, 317.
560. Meryman H. T.— Biodynamica, 1958, 8, 69.
561. Meryman H. T.— In: Recent Research in Freezing and Drying. Blackwell, Oxford, 1960.
562. Meryman M., Kafig E. et al.— In: Presented at IX Congr. of Internat Soc. Blood Transfusion, Mexico 1962.
563. Meryman H. T. In: Freeze-drying of Foods. N. Y. Acad. Sci. Washington, 1962 225.
564. Meryman H. F.— Fed. Proc., 1963, 22, 81.
565. Meryman H. T.— Nature. 1968 218, 333.
566. Meryman H. T.— Gryobiology, 1971, 8, 382.
567. Meryman H. T.— In: Gryobiology, Acad.Press, N. Y.— London, 1966, 55.
568. Meryman H. T.— Gryobiology, 1971 8, 173.
569. Mitchell P., Moyle J.— Europ. J. Biochem., 1968 7, 471.
570. Meynell G. G.— J. Gen. Microbiol., 1958 19, 380.
571. Mills W. I., Whaley R., Fish W.— Alaska Med., 1961, 3, 28.
572. Mitchell P.— Nature, 1961 191, 144.
573. Mitchell P.— Biol. Rev., 1966, 41, 445.
574. Mider G. B., Morton J. J.— Amer. J. Cancer, 1939, 35, 502.
575. Miller W. S., Smith S. G.— Proc. Sos. Exp. Biol. Med., 1966, 122, 634.
576. Mollison P. Z., Sloviter H. A.— Lancet, 1951, 2, 862.
577. Mollison C. V., Rose D.— Arch. Biochem. Biophys., 1956, 65, 534.
578. Moor H., Muhlethaler R.— J. Cell Biol., 1963, 17, 609.
579. Morrison J. L.— Nature (London), 1963, 198, 84.
580. Moran T.— Food Manuf., 1934, 9, 193.
581. Moss C. W., Speck M. L.— Appl. Microbiol., 1963, 11, 326.
582. Mullin J. W. Grustalli z ation. London, 1961.
583. Mundcur B.— Exptl. Cell Res., 1960, 20, 28.
584. Myerhof O., Ohlmeyer P.— J. Biol. Chem., 1952, 195, 11.
585. Nagington J., Greaves R. I. N.— Nature, 1962, 194, 993.
586. Nash T.— J. Gen. Physiol., 1962, 46, 167.
587. Nash T., Postgate J. R., Hunter J. R.— Nature (London), 1963, 199, 1113.
588. Nei T.— In: Recent Research in Freezing and Drying. Blackwell, Oxford (London), 1960, 112.
589. Nei T.— J. Agric. chem. Soc. (Japan), 1954, 28, 91.
590. Nei T.— Low Temper. Sci. (Ser. B), 1962, 20, 109.
591. Nei T.— Exptl. Cell. Res., 1962, 28, 560.
592. Nemethy G., Scheraga H. A.— J. Phys. Chem., 1962, 66, 1773.
593. Nemethy G., Scheraga H. A.— J. Chem. Phys., 1964, 43, 680.
594. Nemethy G., Scheraga H. A.— J. Phys. Chem., 1962, 36, 3382.
595. Nesh T.— In: Cryobiology. Acad. Press, N.Y.— London, 1966, 179.
596. Neurath H., Cooper G. R., Sharp D. G., Taylor A. R., Beard D., Beard J. W.— J. Biol. Chem., 1941, 140, 293.
597. Newrath H., Cooper G. R., Erickson J. O.— J. Biol. Chem., 1942, 142, 249.

598. Nour-Eldin F.— Nature, 1963, 199, 187.
599. Novikoff A. B.— In: Lysosomes. Ciba fond. Symp. Little, Brown, 1963, 36.
600. Notevarp O., Heen E.— Fisk. Dir. skr. Ser. Teknol. Undersok. 1938, 1, (2), 1.
601. Nikkilia O. E., Linko R. R.— Food Res., 1956, 21, 42.
602. Nikkilia O. E., Linko R. R.— Food. Res., 1954, 19, 200.
603. Nikkilia O. E., Linko R. R.— Acta chem. fenn., 1954, B27, 37.
604. Nishimoto J.— Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ., 1962, 11, 41.
605. Numa S., Ringelman E.— Biochem. Z., 1965, 343, 258.
606. O'Brien T. G., Wathings E. Jr.— J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 1960, 40, 611.
607. O'Brien T. G., Haywss L. L., Hering A. C.— Surgery, 1961 49, 109.
608. Ogawa T.— Low. Temp. Sci. (Japan), 1953, 10, 175.
609. Olitsky P. K., Casals J., Walker D. L., Gingsberg H. S., Hosfall F. L.— J. Lab. clin. Med., 1949, 34, 1023.
610. Olitsky P. K., Yoger R. H., Murphy L. C.— U. S. Armed Forces med. J., 1957, 1, 415.
611. Olley J., Lovern J. A.— J. Sci. Fd. Agric., 1960, 11, 644.
612. Oncley J. L.— In: Harvey Lect. Lipoproteins of human plasma, 1954—1955, 50, 71.
613. Pacher E. L., Ingraham J. L., Scher S.— J. Bact., 1965, 89, 718.
614. Parkes A. S.— In: Freezing and Drying. Institute of Biology, London 1951.
615. Parkes A. S.— Proc. Roy. Soc., B, 1955, 144, 314.
616. Parker J. H., Matloon J. R.— Cryobiology, 1970, 6, 385.
617. Paricha P. C. The Protective action of thiols and other substances on the drought tolerance. University of Missouri, 1966.
618. Parhes A. S., Smith A. V.— Proc. Roy Soc., B, 1953, 140, 455.
619. Partmann W.— Food Res., 1957, 22, 51.
620. Partmann W., Gutschmidt J.— Kaltetechnik, 1963, 15, 170.
621. Partmann W.— J. Food Sci., 1963, 28, 15.
662. Partmann W.— Wissensch. Veroffentlich. Dt. Gesellschaft Ernahrung, 1964, 12, 12.
623. Pauling L. The Nature of Chemical Bond. N. Y., 1960.
624. Pegg D. E.— J. Appl. Physiol., 1964 19, 301.
625. Peer L. A.— In: Transplantation of tissues. I. Baltimore, 1955.
626. Perkins H. A., Rolfs M. R., Acra D. J.— Transfusion, 1962, 2, 313.
627. Perry V. P.— Feder. Proc., 1963, 22, 101.
628. Persidsky M. D., Luyet B. J.— Biodynamica, 1959, 8, 107.
629. Persidsky M. D., Richards V., Leef J.— Cryobiology, 1965 2, 674.
630. Persidsky M. D., Ellett M. H.— Cryobiology, 1969, 6, 280.
631. Persidsky M. D., Eliett M. H.— Cryobiology, 1970, 8, 345.
632. Persidsky M. D., Ellett M. H.— Cryobiology, 1971, 8, 345.
633. Pert J. H., Schork P. K., Moore R.— In: Proc. IX th Congr. Inter. Soc. Blood. Transf., Mexico, Basel — N. Y., 1964, 35.
634. Peterson W. D., Stulberg C. S.— Cryobiology, 1964, 1, 80.
635. Phan The Tran, Bender M. A.— Exp. Cell. Res., 1960, 20, 651.
636. Phan The Tran, Bender M. A.— Exp. Cell. Res., 1964, 20, 651.
637. Phan The Tran, Bender M. A.— Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1960. 104, 388.
638. Philipson L., Albertsson P. A. et al.— Virology, 1960, 11, 553.
639. Pichett B. W., Rall R. E., Lucas J. J., Gibson E. W.— J. Dairy Sci., 1964, 8.
640. Plank R.— Beih. Z. ges. Kalteind., 1941, 10, Ser. 3, 1.
641. Planterose D. N., Nishimura C. et al.— Virology, 1962, 18, 294.
642. Polge C., Smith A. V., Parker A. S.— Nature, 1949, 164, 666.

643. Pollard E. C.— In: The Physics of Viruses. Acad. Press, N. Y., 1953.
644. Polge C., Lovelock J. E.— Vet. Rec., 1952, 64, 396.
645. Polge C., Soltys M. A.— In: Recent Research in Freezing and Drying. Blackwell, Oxford, 1960.
646. Pool J. G., Robinson J.— Brit. J. Haemat., 1959, 5, 24.
647. Porter V. S., Denning N. P., Wright R. C., Scott E. M.— J. Biol. Chem., 1953, 205, 883.
648. Postgate J. R., Hunter J. R.— J. Gen. Microbiol., 1961, 26, 367.
649. Power B. A., Power R. F.— Nature, 1962, 194, 1170.
650. Prescott S. C., Tanner F. W.— Fd. Res., 1938, 3, 189.
651. Privitera C. A., Greiff D., Strengs D. R., Anglin M., Baherton H.— J. Biol. Chem., 1958, 233, 524.
652. Prydel. A., Jones G. O.— Nature (London), 1952, 170, 685.
653. Prusoff W. N.— Biochim. et Biophys. Acta, 1963, 68, 302.
654. Pullman M. E., Penefsky H. S. et al.— J. Biol. Chem., 1960, 235, 3322.
655. Putnam F. W., Neurath H.— J. Amer. chem. Soc., 1944, 66, 692.
656. Quicho F. A., Richard G. M.— Proc. Nat. Acad. Sci., 1964, 52, 833.
657. Raccuglia G., Zarafonetis C. J. D.— Pros. Soc. Exp. Biol., 1962, 110, 641.
658. Racker E.— In: Mechanisms in bioenergetics. Acad. Press., N. Y., 1965.
659. Racker E.— Fed. Proc., 1967, 26, 1335.
660. Rahm P.— Ztschr. Allgem. Physiol., 1922, 20, 1.
661. Rapatz G., Luyet B.— Biodynamica, 1960, 8, 121.
662. Rapatz G. Luyet B.— Biodynamica, 1961, 8, 295.
663. Rapatz G., Luyet B.— Biodynamica, 1963, 9, 125.
664. Rapatz G., Luyet B.— In: Abstracts of the Biophysical Society 7-th Annual Meeting. N. Y., 1963.
665. Rapport S., Gerischer-Monthes W.— Acta biol. med. Germanica, 1959, 2, 313
666. Rapoport S. I., Path M. G., Casey I. R.— Calif Med., 1960, 93, 208.
667. Reay G. A.— Rep. Fd. Invest. Bd. (London), 1930, 128.
668. Reay G. A.— J. Soc. chem. Ind. (London), 1933, 52, 265.
669. Rebhun L.— J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 9, 785.
670. Rebuck J. W.— Transfusion, 1963, 3, 1.
671. Record B. R., Taylor R.— J. Gen. Microbiol., 1953, 9, 475.
672. Reyes H. C., Harrison A. P.— Proc. Soc. exp. Biol., 1957, 95, 278.
673. Rey L. R.— Proc. Roy. Soc. (London), 1957B, 147, 460.
674. Rey L. R.— In: Recent Research in Freezing and Drying. Blackwell, Oxford, 1960.
675. Rey L. R.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, 85, 510.
676. Reynolds F. C., Oliver D. K., Ramsey R.— J. Bone Joint Surg., 1951, 33A, 873.
677. Richards E. M.— Ann. Rev. Biochem., 1963, 32, 269.
678. Richards V., Braverman M. et al.— Amer. J. Surg., 1964, 108, 313.
679. Rinfret A. P., Cowley C. W., Doebbler G. F., Schreiner H. F.— In: Proc. IX th Congr. Inter. Soc. Blood Transf. Mexico, 1962, 80.
680. Rinfret A. P.— In: Cryobiology. Akad. Press, N. Y., 1966, 444.
681. Rinfret A. P.— Ann. N. Y. Acad. Sci, 1960, 85, 576.
682. Rinfret A. P., Doebbler G. F.— Biodynamica, 1960, 8, 181.
683. Rinfret A. P.— Fed. Proc., 1963, 22, 94.
684. Ritland H. N., Kaesberg P., Beeman W. W.— J. Appl. Phys., 1950, 21, 838.
685. Robertson R. D., Jacob S. W.— Adv. Surg., 1968, 3, 75.
686. Rossi F., Zatti M.— Experientia, 1964, 20, 21.
687. Robson D. C.— Proc. Roy. Soc. Med., 1964, 57, 628.
688. Rouball A. M., Rammler D. H., Lafferoni A.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1967, 141, 13.

689. Rowe A. W., Rinfret A. P.— Blood, 1962, 20, 636.
690. Rowe A. W.— In: Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms. Sapporo, 1967, 21.
691. Roy A.— Veter. Rec., 1955, 67, 330.
692. Roy A. B.— Biochem. J., 1958, 68, 519.
693. Rupnelt W., Pfisterer H., Lani K. et al. — Cryobiology, 1970, 7, 47.
694. Salt R. W.— Sci. Agric., 1944, 25, 156.
695. Salt R. W.— Canad. J. Res., 1950, 28, 285.
696. Salt R. W.— Canad. Entomologist, 1953, 85, 261.
697. Salt R. W.— Canad. Entomologist, 1963, 95, 1190.
698. Salt R. W.— Ann. Rec. Ent., 1961, 6, 55.
699. Salt R W.— Canad. J. Zool., 1961, 39, 349.
700. Salt R. W.— In: Handbook of Physiology, Sect. 4, Chap. 2. Amer. Physiol. Soc. Washington. 1964.
701. Sakai A.— Nature (London), 1962, 193, 89.
702. Sakai A.— Low. Temp. Sci. Ser. B., 1961, 19, 1.
703. Sanderson E. S.— Science, 1957, 62, 377.
704. Saito T., Arai K.— Nature (London), 1957, 179, 820.
705. Santarius K. A.— Habil-Schrift Universitat. Bonn. 1966.
706. Santarius K. A., Heber U.— Planta, 1967, 73, 109.
707. Sato T.— Low Temp. Sci., Ser. B (Japan), 1954. 12, 39.
708. Sawant P. L., Desai G. D., Tappel A. L.— Arch. Biochem. Biophys., 1964, 105, 247.
709. Schaub M. C.— Helv. physiol. pharmac. Acta, 1964, 22, 271.
710. Schmidt P. J., Steinfeld J. L.— Clin. Sci., 1960, 19, 109.
711. Schmidt E., Schmidt F. W.— Enzymol. Biol. Clin., 1963, 3, 80.
712. Schmidt P. I., Stohlman F.— Bibl. Halmat., 1964, 19, 59.
713. Schmidt P. J., Stohlman F.— In: Proc. IX Congr. Int. Soc. Blood Transf. Stockholm, 1964.
714. Schmutz W., Sullivan C. Y. et al.— Plant Physiol., 1961, 36, 617.
715. Scholander P. F., Flagg N., Hock R. J. et al.— J. Cell. a. Compar. Physiol., 1953, 42, 11.
716. Scholtissek Ch.— Biochim. et Biophys. Acta, 1968, 155, 14.
717. Schreiner H. R., Nuermberger C. H. et al.—In: Abst. Proc. VI th. Ann. Meeting Biophys. Soc., 1962, 346.
718. Schwerdt C. E., Schaffer F. L.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1955, 61, 740.
719. Schwerdt C. E., Fogh J.— Virology, 1957, 4, 41.
720. Schwerdt C. E.— In: Cellular Biology Nucleic Acids and Viruses, 5, Acad. of Sci. N. Y., 1957, 157.
721. Scott W. J.— In: Proceedings of the Low Temperature. Microbiology Symposium. New Jersey, 1961, 89.
722. Sedgwick B., Hubscher G.— Biochim. et Biophys. Acta, 1965, 106, 63.
723. Sellinger O. Z., Beanfay H. et al.— Biochem. J., 1960, 74, 450.
724. Serutton M. C., Utter M. F.— J. Biol. Chem., 1965, 240, 1.
725. Schachman J. K., Lauffer M. A.— J. Amer. Schem. Soc., 1969, 71, 536.
726. Sharp D. G., Taylor A. R., Beard D., Beard J. W.— Proc. Soc. exp. Biol., 1942, 50, 205.
727. Sharron A., Levitt J.— Cryobiology, 1967, 4, 85.
728. Sheraga H. A.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 125, 253.
729. Sherman J. K.— Cryobiology, 1967, 4, 137.
730. Sherman J. K.— Gryobiology, 1967, 3, 407.
731. Sherman J. K.— Cryobiology, 1969 3, 98.
732. Sherman J. K.— Cryobiology, 1970, 6, 581.
733. Sherman J. K.— Anat. Rec., 1962, 144, 171.
734. Sherman J. K.— J. Cell. Comp. Physiol., 1964, 61, 154.
735. Sherman J. K.— Anat. Rec., 1964, 149, 591.

736. Shibko S., Tappel A. L.— Biochem. et Biophys. Acta, 1963, 73.
737. Shikama K., Yamazaki B.— Nature, 1963, 190, 83.
738. Shikama K.— Sci. Rep. Tonoku Univ., Biol., 1963, 29, 91.
739. Shine H. J., Niemann C.— J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 4275.
740. Shine H. J., Niemann C.— J. Amer. Chem. Soc., 1956, 78, 1872.
741. Shuruya R., Schwert G.— J. Biol. Chem., 1960, 235, 1658.
742. Sieber E.— Arch. Klin. Chir., 1954, 279, 69.
743. Siegrist W. H., Enneking W. F.— Surg. Forum, 1959, 10, 823.
744. Siegrist W. H., Enneking W. F.— Transplant. Bull., 1960, 27, 437.
745. Siffert R. S.— J. Bone Joint Surg., 1955, 37A, 742.
746. Simidu U., Simidu W.— Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 1957, 23, 442.
747. Simidu U., Simidu W. — Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 1960, 26, 1099.
748. Simidu U., Simidu W., Terasima H.— Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 1958, 23, 700.
749. Sizer J. W., Josephson E. S.— Food Res., 1942, 7, 201.
750. Sloviter H. A.— Lancet, 1951, 1, 823.
751. Sloviter H. A.— Nature, 1952, 169, 1013.
752. Sloviter H. A.— Am. J. Med. Sci., 1956, 231, 437.
753. Sloviter H. A.— Nature (London), 1962, 193, 884.
754. Sloviter H. A., Ravdin R. G.—Nature (London), 1962, 196, 899.
755. Smith A. U.— Lancet, 1950, 2, 910.
756. Smith A. U., Polge C. et al.— J. Roy. Microscop. Soc., 1951, Ser. 3, 71, part 2, 186.
757. Smith A. U., Polge C. Smiles J.— I. R. micr. Soc., 1951, 71, 186.
758. Smith A. V., Siniles J. J.— Roy. Micr. Soc., 1953, 73, 134.
759. Smith A. U.— In: Biological Applications of Freezing and Drying. Acad. Fress, N. Y., 1954.
760. Smith A. V., Polge G., Siniles J.— J. Roy Micr. Soc., 1951, 71, 186.
761. Smith Z. H., Congdon C. C. Radiation protection and recovery. Oxford, London — N. Y. — Paris, 1960 242.
762. Smith A. U. Biological effects of freezing and supercooling. Baltimore, 1961, 440.
763. Smith A. U.— Cryobiology, 1968, 8, 173.
764. Snow J. M.— J. Fish. Res. Bd. Can., 1950, 7, 599.
765. Sonh-Brown H., Schwartz N. Z.— Proc. Soc. Exper. biol. Med., 1969. 131, 614.
766. Soulier S. P., Larrien M. I.— In: Etude de la correction in vitro de l'hemophilie (A et B) par differentes dilutions de plasma normal (modifications du temps de coagulation et de la consomnation de prothrombine). Semaine hop. Paris, 1954. 30, 3033.
767. Souzu H. J., Nei T. et al.— Low. Tempr. Sci., Ser. B, 1961, 19, 49.
768. Speck R. S., Jawetz E., Colmena V. R.— J. Bact., 1951, 61, 253.
769. Sproul M. T., Jago S., Crove-Rasmussen M., Pyle H. M.— In: Proc. X th. Congr. Inter. Soc. Blood Transf. Stokcholm, Basel— N. Y., 1964. 731.
770. Squires R. W., Hartsell S. E.— Appl. Microbiol., 1955, 3, 40.
771. Stanley W. M.— Science, 1935, 81, 644.
772. Starkweather W. H., Knorpp C. F. et al.— Cryobiology, 1968, 4, 256.
773. Stein W. D.— In: The movement of molecules across cell membranes. Acad. Press, N.Y.— London, 1967, 91.
774. Steinbuch M., Quentin M.— In: Recherches sur la congelation du globule rouge en milieu macromoleculaire. Vox. Sanguinis, 3, Basel, 1958, 123.
775. Stephenson J. L.— J. Biophys. Biochem. Cytol., 1956, Suppl. 2, 45.
776. Stockell A., Smith E. L.— J. Biol. Chem., 1957, 227, 1.
777. Straka R. P., Stokes J. L.— J. Bact., 1959, 78, 181.
778. Strange R. E., Dare F. A.— J. Gen. Microbiol., 1962, 29, 719.
779. Strange R. E., Ness A. G.— Nature (London), 1963, 197, 819.
780. Straus W.— J. Biol. Chem., 1954, 207, 745.
781. Straus W.— J. Biophys. biochem. Cytol., 1956, 2, 513.

782. Straus W.— In: Enzyme Cytology. Acad. Press, N. Y., 1967, 298.
783. Strumia M. M., McGraw I. J., Dolan M., Colwell L. S.— Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1950, 75, 675.
784. Ctrumia M. M., McGraw J. J., Heggestad G. E.— Am. J. Clin. Path., 1952, 22, 313.
785. Strumia M. M.— Blood, 1954, 9, 1105.
786. Strumia M. M., Colwell L. C. et al.— Science, 1958, 128, 1002.
787. Strumia M. M.— Bibl. haemat., 1958, 7, 478.
788. Strumia M. M., Colwell L. S. and Strumia P. V.— In: Proceedings of 8th. Congress of International Society of Blood Transfusion. Tokyo, 1962, 433.
789. Strumia M. M., Colwill L. S., Strumia P. V.— J. Lab. clin. Med., 1960, 56, 576.
790. Sturtevant J. M.— In: Physical Methods of Organic Chemistry Techniques of Organic Chemistry, 1, pt. 1. N.Y., Inter., 1959.
791. Sudnof H., Wötzel E.— Klin. Wschr., 1960, 38, 1165.
792. Sulliman M. B., Hammack W. I.— In: Proc. X th. Congr. Inter. Soc. Blood Transf. Stockholm, Basel — N. Y., 1964, 727.
793. Susena C. V.— Canad. J. Biochem., 1965, 43, 1787.
794. Sussman M. N., Chin L.— Science, 1966, 151, 324.
795. Swarz M. N., Kaplan N. O. et al.— In: Influence of temperature on biological systems.— Society of General Physiology, Washington, 1957, 61.
796. Szent-Gvorgyi A. G. Bioenergetics. Acad. Press, N. Y., 1955.
797. Tamann G., Buchner A.— Z. Anorg. Chem., 1935, 222, 371.
798. Tanaka K., Oizuka J.— Biochem. Pharmac., 1968, 17, 2023.
799. Tanford C., Lavrien R.— J. Amer. Chem. Soc., 1962, 84, 1892.
800. Tanner F. W., Wallace G. I.— Proc. Soc. exp. Biol., 1931, 29, 32.
801. Tappel A. L., Sawant P. et al.— In: Lysosomes (Ciba Foundation Symposium) Boston, 1963.
802. Tappel A. L.— In: Cryobiology. Acad. Press, N. Y., 1966, 142.
803. Taylor A. C.— Ann. New York Acad. Sci., 1960, 85, 595.
804. Thompson N. W., Knorpp C., Gikas P. et al.— In: Proc. X th. Congr. Inter. Soc. Blood Transf. Basel — N.Y., 1965.
805. Trump B. F., Young D. E., Arnols E. A., Stowell R. E.— Fed. Proc., 24, part III., Suppl. 15, 1965, 144.
806. Tomlinson N., Jonas R. E. E., Geiger S. F.— J. Fish. Res. Bd. Can., 1963, 20, 1145.
807. Tokunaga T., Nakamura M.— Bull. Hokkaido Reg. Fish., Res. Lab., 1961, 23, 61.
808. Toyokawa K., Hollander D. H.— Proc. Soc. exp. Biol., 1956, 92, 499.
809. Trueta G. A.— Acta Orthop. Scand., 1962, 32, 190.
810. Trump B. F., Young D. S. et al.— Fed. Proc., 1965, 24, 144.
811. Turner T. B.— J. Exp. Med., 1938, 67, 61.
812. Turner B. B. and Fleming W. L.— J. Exp. Med., 1939, 70, 629.
813. Turner M. D., Pitts H. A., Turner A. C.— Cryobiology, 1967, 4, 140.
814. Tucher E. J.— Surg. Gynec. Obstet., 1953, 96, 739.
815. Tullis J. L., Surgenor D. M. et al.— Science, 1956, 124, 792.
816. Tullis I. L.— Bibl. haemat. Basel., 1958, 7, 376.
817. Tullis J. L., Surgenor D. M., Baudanza.— Blood, 1959, 14, 456.
818. Tullis I. L.— New England Journal of medicine, 1958, 258, 569.
819. Tullis I. L., Haynes L. L., Pyle H. M.— Arch. Surg., 1960, 81, 151.
820. Turnball D.— J. Appl. Phys., 1950, 21, 1022.
821. Wagman J., Weneck E. J.— Appl. Microbiol., 1963, 11, 244.
822. Waldham D. G., Halverson H. O.— Appl. Microbiol., 1954, 2, 333.
823. Walton K. G., Kerwina M., Fleischer S., Dow D. S.— J. Bioenergetics, 1970, 1, 3.

824. Waravdekar V. S., Goldbatt P. J. et al.— J. Histochem. Cytochem., 1964, 12, 498.
824. Wallach S., Zemp J. W. et al.— Blood, 1962, 20, 344.
825. Wang A. G.— Nature (London), 1961, 190, 690.
826. Warner R. C., Levy M.— J. Amer. Soc., 1958, 80, 5735.
827. Webb S. J. Bond water in biological intergrity, 1965.
828. Webb W. R., Dodds R. P. et al.— Ann. Surg., 1966, 164, 343.
829. Weber P. L.— Naturforch., 1963, B, 18, 1105.
830. Weime R. J. Studies on ogar gel electrophoresis. Arscia, Brussels, 1959.
831. Weiser R. S., Osterud C. M.— J. Bact., 1945, 50, 413.
832. Weiser R. S., Hargiss C. O.— J. Bact., 1946, 52, 71.
833. Weiss P., Taylor A. C.— Anat. Rec., 1944, 88, 465.
834. Weiss A. J., Ballinger W. F.— Ann. Surg., 1958, 148, 360.
835. Weiss A. J., Ballinger W. F. et al. — Clin. Res., 1961, 9, 168.
836. Wheeler T. E., Thomas E. D., Malinin T.— Transplantation, 1964, 2, 534.
837. Whitaker J. R., Tappel A. L.— Biochim. et Biophys. Acta, 1962, 62, 210.
837a. Whitaker J. R., Wormser E.— Biochim. et Biophys. Acta, 1962, 62, 300.
838. Whitaker J. R., Tappel A. L., Wilgram G. F., Kennedy E. P.— J. Biol. Chem., 1963, 238, 2615.
839. Whitcher H. W.— Proc. Roy. Soc. Med., 1964, 57, 631.
840. Williams R. J., Meryman H. T.— Cryobiology, 1965, 1, 317.
841. Wilson H. A.— Phil. Mag., 1900, 50, 238.
842. Wilson P. D.— Ann. Surg., 1947, 126, 932.
843. Wilson P. D.— J. Bone Joint Surg., 1951, 33, B, 301.
844. Winocour E.— Virology, 1963, 19, 158.
845. Wodinsky I., Meaney K. F. et al.— Cryobiology, 1965, 1, 217.
846. Woodburn M. J., Strong D. H.— Appl. Microbiol., 1960, 8, 109.
847. Wood T. H., Rosenberg A. M.— Biochim. et Biophys. Acta, 1957, 25, 78.
848. Woodcock A. H., Thistle M. W., Cook W. H., Gibbons N. E.— Canad. J. Res., 1941, 19, D, 206.
849. Wood T. H., Taylor A. L.— Radiol. Pes., 1957, 7, 99.
850. Wormser E.— Biochim. et Biophys. Acta, 1962, 62, 300.
851. Wroblewski F., La-Due J. S.— Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1955, 90, 210.
852. Zieve P. O., Solomon H. M.— Am. J. Physiol., 1967, 213, 1275.
853. Zontag H. A.— Science, 1963, 142, 105.
854. Zontag H. A.— Science, 1963, 143, 965.
855. Ulrich H., Heber U.— Planta, 1958, 51, 399.
855a. Ulrich H., Heber U.— Planta, 1961, 57, 370.
856. Valeri G. R., Hunter F. R.— J. Amer. med. Ass., 1964, 188, 1125.
857. Vambatas V. K., Racker E.— J. Biol. Chem., 1965, 240, 2660.
858. Van den Berg L.— Arch. Biochem. Biophys., 1951, 81, 319.
859. Van den Heuval F. A.— Canad. J. Biochem. Physiol., 1962, 40, 1299.
860. Van der Berg L., Rose D.— Arch. Biochem. Biophys., 1959, 81, 319.
861. Van der Berg L.— Arch. Biochem. Biophys., 1959, 84, 305.
862. Van Hook A. Crystallization, Theory and Practice. A. C. S. Monograph. Series 152. N.Y., 1961.
863. Van Lyl J. J. W., Groenewald J. M.— Cryobiology, 1970, 6, 493.
864. Verdier C. H., Eriksson A. et al.— In: Proc. X th Inter. Congr. Blood Transf. Stockholm, Basel — N.Y., 1965.
865. Viala R., Ginetto R.— Can. J. Biochem. Physiol., 1955, 33, 839.
866. Villeger L.— Biochim. et Biophys. Acta, 1963, 75, 131.

В КНИГЕ ПРИНЯТЫ СЛЕДУЮЩИЕ СОКРАЩЕНИЯ:

ЯМР — ядерный магнитный резонанс
ИКС — инфракрасная спектроскопия
ПВП — поливинилпирролидон
ПЭО-400 — полиэтиленоксид (мол. вес 400)
ПЭГ — полиэтиленгликоль
ДМСО — диметилсульфоксид
АТФ — аденозинтрифосфат
ЛДГ — лактатдегидрогеназа
ГОТ — глутаминооксалаттрансаминаза
АХЭ — ацетилхолинэстераза
ПХЭ — псевдохолинэстераза
ГПТ — глутамикопируваттрансаминаза
ФГАД — фосфоглицеральдегиддегидрогеназа
ПАГ — парааминогиппурат
БСА — бычий сывороточный альбумин
ЭДТА — этилендиаминтетраацетат
РНП — рибонуклеопротеид

СОДЕРЖАНИЕ

Введение 3

Глава I. Структура и функция воды 6

Структурные модели воды 6
Вода в биологических системах 15
Лед — кристаллическое состояние воды 22

Глава II. Физико-химические особенности процессов замораживания 36

Особенности процессов кристаллизации 36
Эвтектика и теплофизика процессов замораживания 43

Глава III. Динамика процессов замораживания биологических объектов 54

Физико-химические процессы в клетках при субнулевых температурах 55
Физические аспекты замораживания. Влияние скоростей охлаждения и отогрева биологических объектов 75

Глава IV. Физико-химические факторы повреждения клеток и тканей при замораживании 86

Глава V. Действие низких температур на ферменты 100

Термодинамика и кинетика ферментативных реакции при субнулевых температурах 106
Криобиохимия сульфгидрильных групп 113
Криобиохимия ферментов крови 119
Исследование ферментативного спектра перфузатов 127
Криобиохимия ферментов мышечной ткани 130
Лизосомальные ферменты 135
Лед — катализатор ферментативных реакций 147

Глава VI. Структурно-функциональное состояние биологических мембран при низких температурах 149

Криобиохимия митохондрий 149
Криобиохимия митохондриальных ферментов 156
Механизм криоповреждения хлоропластов 160
Криопротекция мембран 165

Глава VII Проблемы замораживания крови и костного мозга 175

Низкотемпературное хранение крови 175
Низкотемпературное консервирование лейкоцитов, лимфоцитов и тромбоцитов 187
Консервирование плазмы, плазменных белков и факторов свертывания крови 195
Низкотемпературное замораживание клеток костного мозга 199

Глава VIII. Замораживание различных клеток и тканей 217

Замораживание половых клеток 217
Замораживание эндокринных желез 225

Консервирование эпителиальных и опорных тканей 226
Замораживание мышечной ткани рыб 232
Замораживание эмбриональных и других тканей 245

Глава IX. Сохранение микроорганизмов и вирусов при низких температурах 250

Консервирование микроорганизмов 251
Замораживание и низкотемпературная лиофилизация вирусов . . . 259

Глава X Криофилактики 270

Классификация и общая характеристика криопротекторов 274
Механизмы криопротекции 279
Криопротекторы эндоцеллюлярного действия 282
Криопротекторы экстрацеллюлярного действия 288
Криопротекторы смешанного действия 293
Другие низкомолекулярные криозащитные соединения 296

Глава XI. Низкотемпературное консервирование органов 300

Глава XII. Криогенное оборудование 307

Литература 321

Введение
Глава
Ст
Во
Ли
Глава
Ос
Эк
Глава
Фи
Фи
и
Глава
пр
Глава
Те
вь
Ки
Кр
Ис
Кр
Ли
Ле
Глава
бр
Кр
Кр
Ми
Кр
Глава
Не
Ни
и
Ко
кр
Ни
Глава
За
За

Николай Сидорович Пушкарь,
Аполлон Максимович Белоус

ВВЕДЕНИЕ В КРИОБИОЛОГИЮ

Печатается по постановлению ученого совета Института проблем криогенной биологии и медицины АН УССР

Редактор *З. Е. Янковская*
Художественный редактор *Р. И. Калыш*
Оформление художника *В. М. Флакса*
Технические редакторы *Б. А. Пиковская, И. Н. Лукашенко*
Корректор *З. П. Школьник*

Сдано в набор 6. VI. 1974 г. Подписано к печати 3. 1. 1975 г. БФ 02501. Зак. № 4—1427 Изд. № 243. Тираж 1750. Бумага № 1. 60×90¹/₁₆. Физических печ. листов 21,5+1 вкладка на мелованной бумаге. Усл. печ. листов 22,5. Учетно-изд. листов 22,95. Цена 2 руб. 56 коп.

Издательство «Наукова думка». Киев, Репина, 3.

Головное предприятие республиканского производственного объединения «Полиграфкнига» Госкомиздата УССР, г. Киев, ул. Довженко, 3.

2

1975г Томск Тюгун