



Основы криобиологии и криомедицины



Харьковская государственная зооветеринарная академия МОН Украины

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

*ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины»
НААН Украины*

Основы криобиологии и криомедицины

Под редакцией профессоров Г.Ф. Жегунова и О.А.Нардиды

Жегунов Г.Ф., О.А. Нардид и др. Основы криобиологии и криомедицины. Учебник для студентов – биологов и медиков – Харьков, 2019 – 614с.: 177 ил. 34 табл.

Внимание биологов и медиков к низким температурам обусловлено тем, что холод может быть, с одной стороны, очень опасным для жизни воздействием, но с другой стороны, он может использоваться как лечебный фактор. Кроме этого, низкие температуры могут обеспечивать глубокое торможение метаболизма, вплоть до обратимой остановки жизни, а контролируемые замораживание и гипотермия могут использоваться для криоконсервирования и длительного хранения биообъектов.

В последние десятилетия были заложены основы криобиологии и криомедицины – нового перспективного направления биомедицинской науки, биотехнологии и инженерии. Исследованы многие процессы, происходящие в клетках и тканях при низкотемпературном воздействии, изучено действие многих криопротекторов, разработаны десятки разных методик криоконсервирования биологических объектов, экспериментально обоснованы способы применения низких температур в медицинской практике, созданы многие приборы для использования низких температур для лечения человека. Накоплен обширный экспериментальный и клинический материал. Поэтому является актуальной его концентрация и обобщение в учебной литературе для использования уникальных знаний в практике, а также при подготовке специалистов в этой области.

В учебнике впервые собран и представлен всесторонний учебный материал по криобиологии и криомедицине. Причем в книге не только описываются многие эффекты, феномены и методики, связанные с использованием или действием низких температур, но и представлены многочисленные проблемы и задачи, требующие своего решения. Например, еще не решена проблема обеспечения глубокой гипотермии и гибернации человека, остаются пока неизвестными молекулярно-генетические

механизмы устойчивости к холоду пойкилотермных и гетеротермных животных, актуальным является экспериментальное обоснование и разработка способов криоконсервирования и трансплантации крупных органов и тканей.

Учебник рекомендуется для студентов, аспирантов и преподавателей биологических и медицинских специальностей, но будет интересен и доступен для понимания и многим другим читателям, интересующимся современной прикладной физикой, медициной и биологией.

Рекомендовано в печать Ученым Советом Харьковской государственной зооветеринарной академии МОН Украины, протокол № 12, от 12.10.2017; Ученым Советом Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, протокол № 6, от 27.05.2019; Ученым Советом ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» НААН Украины, протокол № 3, от 15.04.2019.

Верстка: Коваленко Игорь Федорович

Обложка: Пахомов Александр Витальевич, Жегунов Геннадий Федорович

Рецензенты:

В.А. Бондаренко – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии человека и животных Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина МОН Украины.

П.А. Бездетко – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой офтальмологии Харьковского национального медицинского университета МОН Украины.

УДК 57.043+615.832.9

ББК

ISBN

Авторский коллектив:

1. Жегунов Геннадий Федорович – доктор биологических наук, профессор, лауреат государственной премии Украины в области науки и техники. Академик Украинской Академии Наук. Заведующий кафедрой химии и биохимии Харьковской государственной зооветеринарной академии.
2. Нардид Олег Анатольевич – доктор биологических наук, профессор. Заместитель директора по научной работе Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, профессор кафедры физической и биомедицинской электроники и комплексных информационных технологий факультета радиофизики, биомедицинской электроники и компьютерных систем Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина.
3. Стегний Борис Тимофеевич – доктор ветеринарных наук, профессор. Академик НААН Украины, Заслуженный деятель науки и техники, Лауреат государственной премии Украины в области науки и техники, Лауреат премии кабинета министров Украины, директор ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» НААН Украины.
4. Розанов Леонид Федорович – доктор биологических наук, профессор. Заведующий лабораторией фитокриобиологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
5. Компаниец Антонина Михайловна – доктор медицинских наук, профессор. Заведующая лабораторией криопротекторов Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
6. Петрушко Марина Павловна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник. Заведующая отделом криобиологии систем репродукции Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
7. Гурина Татьяна Михайловна - доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела криомикробиологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
8. Высеканцев Игорь Павлович - кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник. Заведующий отделом криомикробиологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
9. Стегний Марина Юрьевна – кандидат биологических наук, доцент, Лауреат государственной премии Украины в области науки и техники. Заведующая лабораторией биотехнологии ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» НААН Украины.
10. Чиж Николай Алексеевич - кандидат медицинских наук, старший исследователь. И.о. зав. отдела экспериментальной криомедицины Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
11. Сушко Алексей Борисович – кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник. Заведующий отделом биотехнологии репродукции сельскохозяйственных животных Института животноводства НААН Украины.

12. Чижевский Виктор Васильевич - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. Заведующий сектором низкотемпературного банка биологических объектов Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
13. Пиняев Владимир Иванович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник. Старший научный сотрудник отдела криофизиологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
14. Ковалев Геннадий Александрович - кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник. Старший научный сотрудник отдела экспериментальной криомедицины Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
15. Пахомов Александр Витальевич - кандидат биологических наук, старший исследователь. Старший научный сотрудник отдела криоэндокринологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
16. Пахомова Юлия Сергеевна – кандидат биологических наук. Старший научный сотрудник лаборатории криопротекторов Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
17. Погожих Елена Геннадиевна - кандидат биологических наук. Старший научный сотрудник отдела клеточной терапии Института трансфузионной медицины Медицинского университета Ганновера. Научный сотрудник отдела криобиологии систем репродукции Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
18. Погожих Денис Николаевич - кандидат биологических наук. Старший научный сотрудник отдела клеточной терапии Института трансфузионной медицины Медицинского университета Ганновера. Научный сотрудник отдела криобиофизики Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
19. Денисова Ольга Николаевна – кандидат биологических наук, доцент. Доцент кафедры химии и биохимии Харьковской государственной зооветеринарной академии МОН Украины.
20. Кадникова Наталья Георгиевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. Старший научный сотрудник лаборатории фитокриобиологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
21. Шевченко Надежда Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фитокриобиологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
22. Коваленко Игорь Федорович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела низкотемпературного консервирования Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
23. Юрчук Таисия Александровна – кандидат биологических наук. Заведующая лабораторией криоконсервирования гамет и эмбрионов Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
24. Водопьянова Лариса Анатольевна - кандидат биологических наук, доцент. Доцент кафедры нормальной и патологической физиологии животных Харьковской государственной зооветеринарной академии МОН Украины.

Оглавление

Введение <i>Г.Ф.Жегунов</i>	9
Краткий словарь новых терминов <i>Г.Ф.Жегунов</i>	11
Список сокращений	28
 Раздел 1. Основы криобиологии	 29
Глава 1. Становление, развитие и достижения криобиологии и криомедицины <i>О.А. Нардид</i>	29
Глава 2. Природа живых тел <i>Г.Ф. Жегунов</i>	38
 Часть 1. Теоретические и экспериментальные основы криоконсервирования биологических объектов	 89
Глава 3. Основные подходы и этапы <i>Л.Ф.Розанов, И.Ф.Коваленко</i>	89
Глава 4. Роль воды в процессах замораживания-отогрева <i>О.А.Нардид</i>	101
Глава 5. Физико-химические факторы и механизмы криповреждений <i>О.А.Нардид, А.В. Пахомов</i>	120
Глава 6. Скоростные режимы и глубина замораживания <i>О.А. Нардид, О.Н. Денисова, Л.Ф Розанов</i>	143
Глава 7. Действие низких температур на макромолекулы и ферменты <i>О.А. Нардид</i>	165
Глава 8. Криповреждения клеток <i>Г.Ф. Жегунов</i>	182
Глава 9. Криопротекторы <i>А.М. Компаниец.</i>	199
Глава 10. Криоконсерванты <i>Ю.С. Пахомова</i>	214
Глава 11. Криоконсервирование эритроцитов и костного мозга животных <i>О.Н. Денисова, Л.А. Водопьянова, Г.Ф.Жегунов</i>	239

Глава 12. Криоконсервирование половых клеток и эмбрионов животных <i>Т. Юрчук., М.П. Петрушко, А.Б. Сушко</i>	258
Глава 13. Криоконсервирование микроорганизмов <i>И.П. Высеканцев</i>	273
Глава 14. Основы сублимационной сушки <i>Т.М. Гурина</i>	287
Глава 15. Криобанки <i>В.В. Чижевский, Б.Т. Стегний, М.Ю. Стегний</i>	306
Часть 2. Криобиология растений	333
Глава 16. Холодоустойчивость растений <i>Н.Г. Кадникова, Н.А. Шевченко</i>	333
Глава 17. Замораживание растительных тканей <i>Н.Г. Кадникова, Н.А. Шевченко</i>	343
Глава 18. Сохранение генофонда растений <i>Н.Г. Кадникова</i>	356
Часть 3. Адаптация и гипобиоз	365
Глава 19. Температурный гомеостаз и терморегуляция у животных <i>Г.Ф. Жегунов</i>	365
Глава 20. Приспособленность организмов к низким температурам <i>Л.Ф. Розанов, Г.Ф. Жегунов</i>	382
Глава 21. Адаптация животных к низкой температуре. Стратегии и механизмы <i>Г.Ф. Жегунов, Е.Г. Погужих</i>	399
Глава 22. Естественная и искусственная гипотермия <i>Г.Ф. Жегунов</i>	417
Глава 23. Гипометаболические состояния и скрытая жизнь <i>Г.Ф. Жегунов</i>	427
Раздел 2. Основы криомедицины	432
Глава 24. История развития и главные направления применения холода в лечебных целях <i>Розанов Л.Ф., Коваленко И.Ф.</i>	432
Часть 4. Криоконсервирование биообъектов в медицинских целях	440
Глава 25. Криоконсервирование тканей и органов <i>А.В. Пахомов</i>	440
Глава 26. Гипотермическое хранение тканей и органов <i>А.В. Пахомов, Г.Ф. Жегунов</i>	456

Глава 27. Криоконсервирование гамет и эмбрионов человека <i>М.П.Петрушко, В.И.Пиняев</i>	471
Глава 28. Криоконсервирование клеток крови человека <i>А.М.Компаниец, Ю.С.Пахомова</i>	482
Глава 29. Криоконсервирование стволовых клеток <i>Е.Г. Погожих, Д.Н. Погожих</i>	500
Глава 30. Криоконсервирование клеток костного мозга <i>Д.Н. Погожих, Е.Г. Погожих, Ю.С.Пахомова</i>	513
Часть 5. Действие низких температур на человека	521
Глава 31. Гипотермия <i>Г.Ф.Жегунов, Л.Ф.Розанов</i>	521
Глава 32. Острое охлаждение человека <i>Г.А.Ковалев, Г.Ф.Жегунов</i>	532
Глава 33. Отморожение <i>Г.А.Ковалев</i>	549
Глава 34. Криохирurgia <i>Н.А. Чиж</i>	567
Глава 35. Крионика <i>Ю.С. Пахомова</i>	607

Введение

Криология – наука, изучающая различные физические тела и процессы в условиях низких температур. Это комплексная наука, включающая в себя криофизику, криохимию и *криобиологию*. Приставка *крио* – происходит от греческого *криос* – ледяной холод, лютый мороз.

Понятие *низкие температуры* с точки зрения биологии и медицины – это температуры ниже требуемых для нормального функционирования тех или иных организмов. Для большинства теплокровных животных это температуры тела ниже 30⁰С, а для большинства холоднокровных животных – ниже 5⁰С. Если охлаждение биообъектов происходит до температур кристаллизации воды, то это обозначают термином *гипотермия*, а охлаждение объектов ниже температуры затвердевания воды – *замораживание*.

Интерес к низким температурам в биологии и медицине связан с несколькими аспектами действия холода на объекты живой материи.

- Холод может выступать в роли экстремального, опасного для жизни фактора.
- Замораживание и гипотермия могут использоваться для криоконсервирования и длительного хранения биообъектов.
- Холодовое воздействие может использоваться как лечебный фактор.
- Низкие температуры могут обеспечивать обратимую остановку жизни.

Криобиология – область биологии, изучающая действия низких температур и сопутствующих этому процессу факторов на биологические объекты. Это комплексная наука, включающая в себя различные аспекты и криофизики, и криохимии. Она является фундаментальной основой многих биологических и медицинских технологий.

Не менее важная дисциплина – *криомедицина*, которая активно развивается на основе фундаментальных достижений криобиологии. *Криомедицина* – область медицины, изучающая действие низких температур на человека и использующая их в лечебных целях.

В настоящее время разработано много биотехнологических методов на основе низких температур и решено немало медико-биологических задач. Например, холод используют для криоконсервирования клеток крови, репродуктивных клеток, эмбрионов, тканей, органов и частей тела. Созданы криобанки стволовых клеток, пуповинной и венозной крови, некоторых тканей и различных микроорганизмов. Криоинструменты применяют для деструкции патологических тканей при хирургических операциях.

Криобиология и криомедицина способствуют также познанию свойств и возможностей живых объектов, природы жизни, раскрывают механизмы устойчивости и приспособления, открывают пути разработкам новых методов лечения и биотехнологий. Однако до сих пор перед криобиологией и криомедициной стоит достаточное количество нерешенных задач.

Настоящее учебное пособие аккумулирует и систематизирует обширный материал о различных аспектах действия холода на разнообразные живые организмы, в том числе человека, и предназначено для студентов, аспирантов и преподавателей биологических и медицинских специальностей.

Краткий словарь новых терминов

Адаптация – способность организмов приспосабливаться, изменяться в направлении, повышающем их шансы на выживаемость и размножение в изменяющихся условиях среды.

Акклиматизация – приспособление организмов к нескольким новым факторам или к другому климату.

Акклимация – эволюционный или онтогенетический процесс, благодаря которому организмы адаптируются к какому-то одному новому фактору среды обитания.

Аденозинтрифосфат (АТФ) – нуклеотид, включающий аденин, рибозу и три остатка фосфорной кислоты, соединенных с помощью макроэргических связей. АТФ – универсальный переносчик и основной аккумулятор химической энергии практически у всех живых организмов. В этом виде энергия может использоваться клетками и организмами для совершения синтеза, транспорта, движения и др.

Аминокислота (АК) – мономер белков, органическое вещество, содержащее аминогруппу и карбоксильную группу, обладающее свойствами кислот и оснований.

Анабиоз – состояние обратимой остановки жизни биологических объектов такими факторами среды, как глубокое замораживание, глубокое обезвоживание или их сочетание.

Анаболизм – совокупность биохимических процессов, связанных с использованием малых, просто устроенных молекул для синтеза более сложных, а также образования и обновления клеточных структур.

Ангидробиоз – состояние глубокого и длительного обезвоживания биообъектов с сохранением способности неоднократно восстанавливать активную жизнедеятельность при обводнении. Условием восстановления жизненных процессов является сохранение неповрежденной структуры белков и молекул НК.

Апоптоз – генетически запрограммированная фрагментация и гибель клеток. Наблюдается при действии экзогенных или эндогенных факторов.

Необходимое явление в процессе эмбриогенеза и при функционировании взрослого организма.

Бактерии – домен живых организмов, объединяющий множество видов свободно живущих, просто устроенных одноклеточных и колониальных организмов, которые не имеют оформленного ядра, двумембранных органелл и цитоскелета. Генетический материал представлен одной кольцевой молекулой, а также многочисленными плазмидами. Бактерии – это очень маленькие организмы (0,3–30 мкм), разнообразной формы – округлые (кокки), спиралеобразные (бледная спирохета), палочковидные (туберкулезная палочка) и др. Многие из них окружены плотной оболочкой, некоторые имеют жгутики. Представители бактерий чрезвычайно широко распространены на нашей планете.

Белки – основные макромолекулы клетки, полимеры аминокислот. Известно несколько десятков тысяч разнообразных по структуре и функциям белков, которые составляют до 20% массы живых организмов и клеток. Регуляция их синтеза молекулой ДНК определяет все признаки клеток – их структуру, форму, размеры, функции. Белки служат инструментами молекулярного узнавания и катализа, являются основой всех структур клеток и организмов.

Биоз – состояние активной жизнедеятельности биологических объектов, при котором проявляются все свойства и характеристики живого: питание, дыхание, выделение, движение, размножение и др. Это состояние жизни характерно для большинства организмов, живущих в нормальных экологических условиях при температуре тела 5 – 40° С.

Биологические объекты (биообъекты) – живые тела любого уровня организации: споры, семена, органеллы, клетки, ткани, органы, многоклеточные организмы. Это могут быть представители любых систематических групп: прокариот, простейших, грибов, растений или животных.

Биосинтез – процесс синтеза разных органических макромолекул в клетках. Например, синтез белков из аминокислот, синтез НК из нуклеотидов и т.д.

Вид – эволюционно сложившаяся совокупность особей одного рода, имеющая единый генотип, близкие морфологические, физиологические, биохимические и другие свойства, но отличающиеся от других представителей рода. *Род* – совокупность видов, связанных генетическим родством. *Семейство* – совокупность родов, связанных генетическим родством.

Вирусы (вирионы) – сформированные вирусные частицы. Представители неклеточной формы жизни. Микротела, состоящие из молекулы нуклеиновой кислоты и белковой оболочки (капсида). Являются внутриклеточными паразитами. Проявляют признаки жизни только внутри клеток, используя их ресурсы для собственного размножения.

Витрификация – метод сверхбыстрого замораживания живых объектов, при котором криозащитный раствор, в котором находятся живые объекты, не кристаллизуется при охлаждении, а переходит в стекловидное состояние (затвердевание жидкости без изменения степени упорядоченности структуры).

Возгонка (сублимация, лиофилизация) – непосредственный переход молекул растворителя из твёрдого состояния в газообразное.

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) – медицинские технологии, методы лечения и процедуры, направленные на достижение беременности пациенткой, при которых отдельные или все этапы зачатия осуществляются вне организма будущей матери.

Выживаемость – способность биологических объектов восстанавливать структуру и функции после воздействия экстремальных факторов, в том числе и замораживания-отогрева.

Гаметы – зрелые половые клетки, содержащие гаплоидный набор хромосом. При половом размножении обеспечивают передачу наследственной информации из одного поколения в другое.

Гены – основные структурно-функциональные элементы генетического материала и информации генома. Это участки ДНК, структура которых предопределяет определенные функции: кодируют мономерное строение РНК и белков, усиливают или ослабляют действие других генов, регулируют работу генетических сетей, участвуют в перемещении нуклеотидных последовательностей и др. Гены обуславливают и контролируют развитие всех признаков и характеристик живых тел. Они являются также единицами наследственности и эволюции.

Генетический материал – совокупность сложноорганизованных макромолекулярных структур на основе нуклеиновых кислот, содержащих генетическую информацию. У эукариот он находится, главным образом, в ядрах клеток (менее 5% ДНК локализовано в митохондриях и хлоропластах).

Геном – 1. Информационный структурно-функциональный комплекс клеток, состоящий из определенных НК и белков. Г. руководит, контролирует и координирует все клеточные процессы, а также функционирование и поведение. Г. – это главным образом

высокоорганизованная система нуклеопротеидов ядра, митохондрий и хлоропластов у эукариотов; или нуклеоид и цитоплазматические ДНК у прокариотов 2. Совокупность всей генетической информации, находящейся во всех нуклеотидных последовательностях всех молекул ДНК определенного вида организмов. 3. Совокупность генов гаплоидного набора хромосом.

Гетеротермные животные – некоторые виды теплокровных животных, способные «принудительно» понижать или повышать температуру своего тела. Например, во время зимней спячки суслики, имея нормальную температур 38°C , в условиях холода, за 12 ч способны понижать температуру своего тела вплоть до $1-2^{\circ}\text{C}$, а спустя 15 дней восстанавливать свою нормальную температуру всего за 3-5 ч.

Гибель – процесс разрушения или уничтожения чего-либо. По законам физики гибель неизбежна для любых объектов природы, в том числе и живых тел. *Смерть* - частный случай явления гибели, это прекращение жизни и существования организма как обособленной живой системы в результате необратимого прекращения основных процессов и функций, поддерживающих жизнь.

Гибернация (зимняя спячка) – состояние оцепенения при пониженных температурах тела ($1-4^{\circ}\text{C}$) у некоторых млекопитающих в зимний период (суслики, хомяки, летучие мыши, ежи и др.). Характеризуется глубоким торможением метаболизма и функций. Позволяет длительное время обходиться без пищи и воды при неблагоприятных климатических условиях.

Гидрофильность – способность молекул смачиваться водой, взаимодействовать с ней и растворяться.

Гидрофобность – неспособность молекул смачиваться водой, взаимодействовать с ней и растворяться. Следует отличать от нерастворимости: многие нерастворимые вещества гидрофильные, т.к. способны смачиваться водой.

Гипобиоз – состояние пониженной активности биологических объектов, например, при гипотермии или зимней спячке.

Гипотермия (процесс) – процесс охлаждения биологических объектов ниже их физиологических температур, не сопровождающийся кристаллизацией внутренней и внешней воды, то есть охлаждение до момента сохранения воды в жидком состоянии. В медицине – процесс охлаждения органа, части тела или всего организма ниже физиологической нормы без изменения фазового состояния воды.

Гипотермия (состояние) – пребывание биологических объектов и человека при температурах тела ниже нормальных физиологических.

Гипотермическое воздействие – действие на биологические объекты температур ниже физиологических, но не ниже температуры замерзания воды (0°C).

Гипотермическое хранение (гипотермическая консервация) – процесс недолгосрочного хранения биообъектов при температурах гипотермии (не ниже 0°C). Состоит из нескольких этапов: подготовка объекта, помещение в консервирующий раствор и контейнер, помещение в холодильник, хранение в условиях гипотермии, использование.

Гомеостаз – состояние относительного динамического постоянства внутренней среды клеток или организма, что проявляется в поддержании химического состава, физических и биологических свойств, устойчивости метаболизма и физиологических функций. Гомеостаз обеспечивает относительную независимость организмов от внешней среды, относительно постоянный уровень активности, не зависящий от колебания условий внешней и внутренней среды.

Действие низких температур – действие на биологические объекты температур ниже физиологических.

Деление клеток – процесс, при котором родительская клетка делится на две дочерние клетки. Предварительно, обязательно удваивается генетический наследственный материал – происходит репликация ДНК. Этот процесс лежит в основе всех видов размножения, а также роста и развития многоклеточных организмов.

Денатурация – процесс нарушения правильной конформации (структуры) биологических макромолекул (белков и НК) агрессивными физико-химическими факторами (температура, облучение, кислота и др.). *Необратимая* – после возвращения в нормальные условия структура не восстанавливается. *Обратимая* – после возвращения в нормальные условия структура восстанавливается.

Дифференцировка — образование в процессе развития из однородных клеток раннего зародыша разнообразных по морфологическим признакам и функциям клеток, имеющих специализированные структуры, входящих в состав определенных тканей и органов.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) — макромолекула, носитель генетической информации всех клеток и организмов. Это две комплементарные полинуклеотидные цепи, соединенные между собой фосфодиэфирными связями и образующие двойную спираль. Каждая из

цепей состоит из последовательно соединенных сотен тысяч мономеров нуклеотидов. Азотистыми основаниями нуклеотидов являются аденин, тимин, гуанин и цитозин, моносахаридом – дезоксирибоза. Генетическая информация записана с помощью генетического кода – определенной системой чередования нуклеотидов.

Живое тело (организм, индивидуум) – *единица жизни; носитель и переносчик индивидуальной жизни*. Это физическое тело (клетка, одноклеточный или многоклеточный организм), представляющее собой сверхдинамичную биологическую систему, способную к преобразованию и целевому использованию информации, материи и энергии, созданию и поддержанию упорядоченности, а также непрерывному воспроизведению.

Жидкий азот – вещество азот в жидком агрегатном состоянии при температуре кипения минус 196°C.

Жизнедеятельность – проявление разносторонней биологической активности различных живых тел (дыхание, движение, метаболизм, размножение).

Жизнеспособность – способность клеток и тканей, сохранившихся после экстремального воздействия (замораживания-отогрева), выполнять основные функции (способность к жизнедеятельности). Этот показатель определяется путем изучения какого-либо ключевого метаболического процесса или какой-либо специальной функции, характерной для данного биообъекта. Например, жизнеспособность сперматозоидов после криоконсервирования можно легко оценить под световым микроскопом по их подвижности и оплодотворяющей способности.

Жизнь – одна из форм бытия организованной материи, обладающей специфическими биологическими свойствами. Это *планетарное явление*, которое проявляется бесчисленным множеством *автономных живых тел*, обладающих *индивидуальной жизнью*.

Жизнь тела (индивидуальная жизнь) – процесс его временного существования от момента зарождения и до неминуемой гибели. Характеризуется постоянным протеканием совокупности биологических процессов и функций, поддерживающих его жизнь. Индивидуальная жизнь передается через геном от одного тела другому, из поколения в поколение в процессе воспроизведения. **Смерть тела** – момент необратимого прекращения основных процессов и функций, поддерживающих индивидуальную жизнь. Смерть – это наследственное явление в жизни каждого организма и является естественным неотвратимым событием после определенного промежутка времени.

Закаливание – обратимые метаболические, структурные и

физиологические приспособления, вызывающие повышение резистентности биологических объектов (активная адаптация) к воздействию холода.

Замораживание – охлаждение биообъектов до температур ниже точки замерзания воды, что сопровождается кристаллизацией воды и образованием льда.

Зигота – одноклеточный эмбрион, диплоидная клетка, образующаяся в результате слияния яйцеклетки и сперматозоида, содержит полный набор генов, необходимый для развития нового организма. В процессе дробления зиготы генетическая информация передаётся всем дочерним клеткам.

Зимняя спячка (гибернация) – состояние естественной гипотермии некоторых млекопитающих (суслики, хомяки, летучие мыши и др.).

Зимостойкость – устойчивость растений к комплексному влиянию всех неблагоприятных факторов окружающей среды, возникающих в зимний период.

Индивидуум (особь, живое тело) — обособленный, самостоятельно существующий организм определенного вида, характеризующийся своими фенотипическими и генотипическими особенностями.

Информация – совокупность сведений и данных, которые могут генерироваться, передаваться, накапливаться, восприниматься и использоваться.

Катаболизм – совокупность биохимических процессов, направленных на разрушение органических веществ.

Катализ – явление избирательного ускорения химических реакций под действием определённых веществ (катализаторов), которые кратковременно и многократно принимают участие в этом процессе, но сами не меняются и не расходуются.

Клетки – структурно-функциональные единицы жизни, представляющие собой сложноорганизованные биологические системы, способные к созданию и поддержанию упорядоченности, преобразованию и целевому использованию материи, энергии и информации, а также непрерывному размножению. Это единицы строения и функций всего множества организмов.

Клонирование – процесс экспериментального воссоздания большого количества идентичных молекул ДНК, клеток или организмов. *Клон* – совокупность клеток или вирусов, полученных от одной особи.

Компартмент клетки – часть клетки, обособленная с помощью мембран. В ней сосредоточены специфические молекулы, белки, ферменты, которые обуславливают их структуру и специфические функции. Например, все мембранные органеллы являются компартментами.

Криоаппликатор - общее название технических устройств с сильно охлаждаемой рабочей поверхностью, контактирующей с тканями в процессе криовоздействия.

Криобанк – это коллекция тех или иных замороженных биообъектов, долгосрочно хранящихся при низких температурах и сохраняющих на протяжении всего периода хранения свои биологические свойства.

Криобиология – область биологии, изучающая действия низких температур и сопутствующих этому процессу факторов на биологические объекты.

Криодеструкция - криовоздействие, приводящее к некротизации охлаждаемых тканей.

Криозонд – инструмент, используемый в хирургии для локального охлаждения тканей на глубине.

Криоконсерванты – сложные растворы для криоконсервирования биологических объектов. Содержат криопротекторы, буферные системы, вещества, поддерживающие осмотическое давление, различные субстраты для поддержки метаболизма, необходимые анионы и катионы. Для каждого объекта обычно подбирается индивидуальный криоконсервант.

Криоконсервирование – процесс замораживания и долгосрочного хранения биологических объектов при температурах ниже 0°C. К. состоит из нескольких этапов: подготовка объекта, помещение в консервирующий раствор и добавление криопротектора, помещение в контейнер, замораживание, хранение, размораживание, удаление криопротектора.

Криология – это наука, изучающая различные тела и процессы в условиях низких температур.

Криомедицина – область клинической и теоретической медицины, посвященная изучению действия холода на органы, ткани и организм здорового и больного человека в целом, а также использованию холода с терапевтической целью.

Крионавт – криопациент, который был полностью заморожен до температуры минус 79 или минус 196°C.

Крионевролиз – блокада нервных путей путем замораживания их определенных участков.

Крионика – технология замораживания и хранения умерших людей при ультранизких температурах в надежде на восстановление их жизни в будущем.

Криоорошение – охлаждение чего-либо (поверхности кожи, слизистой оболочки, органа) парожидкостной струей азота.

Криопациент – умерший человек, проходящий подготовительные процедуры для крионирования.

Криоповреждения – нарушения структуры и функции биологических объектов после замораживания-отогрева или криоконсервирования.

Криопротекторы – вещества, защищающие биообъекты от действия повреждающих факторов замораживания-отогрева при криоконсервировании.

Криорезекция – удаление части органа или ткани с помощью криоскальпеля (криоаппликатора).

Криостаз – консервация целых организмов путем их замораживания до криогенных температур.

Криотерапия – использование низких температур для лечения или профилактики некоторых заболеваний у человека

Криоустойчивость – способность некоторых биологических объектов переносить замораживание-отогрев и возвращаться к нормальной жизнедеятельности.

Криофизика (физика низких температур) – область физики, изучающая физические явления и процессы при сверхнизких температурах. Это температуры сжиженных и отвердевших газов: жидкий азот – 77K (минус 196⁰C), жидкий гелий – 20K (минус 253⁰C), твердая углекислота – 191K (минус 79⁰C).

Криофилия – склонность некоторых живых тел обитать в условиях устойчиво низких температур. К таким организмам относятся многие арктические и антарктические микроорганизмы, обитатели полярных вод (иглокожие, рыбы, моллюски), холодных рек и ручьёв. Это также организмы (одноклеточные водоросли, некоторые черви и насекомые), обитающие на поверхности льда и снега, в воде, пропитывающей лед. При понижении температуры криофилы могут даже вмерзать в лед.

Криохимия – область химии, изучающая химические процессы и явления в условиях низких температур.

Криохирургия – раздел хирургии, использующий низкие температуры с целью разрушения или удаления патологически измененных тканей.

Криохранилище – помещение криобанка, в котором располагается оборудование для длительного хранения биообъектов в замороженном состоянии.

Криптобиоз – состояние физиологического покоя, в основе которого лежат приспособления, способствующие переживанию неблагоприятных факторов среды. В состоянии криптобиоза практически не проявляются никакие признаки жизни, однако сохраняется невысокий уровень метаболических процессов. Активная жизнь многих организмов чередуется с состоянием покоя. К криптобиозу относятся такие формы жизни, как споры и цисты микроорганизмов, водорослей, грибов, семена и выводковые почки растений, гаметы животных, диапауза членистоногих и др.

Культивирование (культура клеток) – содержание и размножение изолированных соматических клеток или микроорганизмов в искусственных условиях.

Макромолекулы — крупные органические молекулы (полимеры), построенные из большого числа повторяющихся единиц (мономеров). К ним относятся белки (полимеры аминокислот), нуклеиновые кислоты (полимеры нуклеотидов) и полисахариды (полимеры моносахаридов). Макромолекулы составляют до 90 % сухой массы клеток.

Мембраны – сложные высокоупорядоченные молекулярные системы, построенные из двойного слоя фосфолипидов и встроенных белков. Образуют гидрофобные оболочки клеток и органелл.

Метаболизм – совокупность биофизических и биохимических процессов, протекающих в клетках и обеспечивающих их энергией и веществами. Продукты метаболизма называются метаболитами.

Морозоустойчивость – генетически детерминированная способность того или иного вида растений переносить температуру ниже 0°C.

Мутагенные факторы (мутагены) – факторы, воздействие которыми на организм приводит к изменению генетического материала (мутациям). Физические – излучение, температура и др. Химические – азотистая кислота, формальдегид, гидроксилламин и др. Биологические – вирусы, плазмиды.

Мутация – внезапное стойкое изменение генетического материала клетки, которое приводит к модификации структуры генов и появлению новых признаков или новых вариантов признаков.

Некроз - патологическое явление, сопровождающееся постепенным разрушением клеточного содержимого вплоть до мономеров органических молекул ферментами лизосом после повреждений, старения и смерти клеток.

Низкие температуры – с точки зрения биологии и медицины, это температуры ниже требуемых для нормального функционирования тех или иных клеток или организмов.

Нуклеиновые кислоты (НК) – макромолекулы (ДНК и РНК), играющие ведущую роль в хранении, реализации и передаче генетической информации, а также в регуляции биосинтеза белков. Представляют собой полимеры, образованные множеством мономеров – нуклеотидов, каждый из которых, в свою очередь, состоит из гетероциклического азотистого основания, пятиуглеродного моносахарида и остатка ортофосфорной кислоты.

Нуклеоид – характерный для прокариотов централизованный комплекс, состоящий из ДНК и специальных белков, способствующих ее компактной укладке. Нуклеоид по функциям аналогичен ядру эукариот. Совместно с цитоплазматическими ДНК составляет геном прокариотической клетки.

Нуклеоплазма – внутреннее содержимое ядра за исключением хромосом. Концентрированный раствор ферментов и структурных белков, обслуживающих процессы репликации, транскрипции, процессинга и др.

Органеллы – обособленные дифференцированные участки цитоплазмы клетки, имеющие соответствующую форму и размер. Сложные системы макромолекул, образующие упорядоченную пространственную структуру, способные к выполнению специальных клеточных функций.

Организм (живое тело, индивидуум) – отдельное живое существо, ведущее самостоятельное существование. Является основной составной единицей вида или популяции. В более широком смысле – сложноорганизованное единство, любая биологическая система, состоящая из многих взаимосвязанных и взаимодействующих частей. В это понятие входят отдельные клетки (как свободно живущие, так и в составе многоклеточных тел), а также многоклеточные тела.

Отогрев – процесс повышения температуры до восстановления нормальной физиологической температуры биологических объектов после охлаждения.

Оттаивание – процесс возвращения замороженных объектов из твердого состояния в жидкое и восстановления биологической активности.

Охлаждение – процесс понижения температуры тела биообъектов.

Оцепенение – состояние резко пониженной активности и жизнедеятельности, наступающее у животных как приспособление к переживанию неблагоприятных условий внешней среды: недостатку тепла, влаги и пищи.

Переохлаждение – 1. Охлаждение жидкости ниже температуры кристаллизации (метастабильное состояние жидкой фазы ниже точки ее затвердевания). 2. Охлаждение пара ниже температуры его сублимации. 3. Чрезмерное понижение температуры тела человека или теплокровного животного. При этом температура тела может понижаться вплоть до 25-28°C, организм переходит в состояние *гипотермии*, что приводит к нарушению работы многих тканей и органов.

Плазмолиз – отделение протоплазмы от клеточной стенки под действием физико-химических факторов. Этот процесс возможен в клетках, имеющих плотную клеточную стенку, например, у растений, грибов, крупных бактерий.

Поверхностный аппарат – сложная структурно-функциональная система клеток, интегрирующая их во внешнюю среду. Может состоять из разных вариантов клеточной стенки, гликокаликса, биомембран, цитоскелета, каналов и ионных насосов, рецепторов, ферментов и др. Выполняет также функции защиты клеток, обмена веществ с внешней средой, а также взаимодействия с другими живыми телами.

Половые клетки животных – особая группа гаплоидных клеток, предназначением которых является объединение геномов двух особей с последующим созданием нового организма. *Яйцеклетка* – зрелая женская половая клетка. *Сперматозоид* – зрелая мужская половая клетка.

Прокариоты – огромная общность мельчайших одноклеточных организмов, не имеющих ядра, динамического цитоскелета и двумембранных органелл. Генетический материал, как правило, не заключен в оболочку и представлен одной кольцевой молекулой ДНК в виде нуклеоида. Характеризуются разнообразием способов питания и метаболизма. П. представлены двумя доменами органического мира: бактериями и археями.

Протисты (Простейшие) – группа низших, как правило, одноклеточных эукариотических организмов. Это – наиболее обширная и разнообразная часть мира эукариотов, представляющая собой совокупность из нескольких сотен генеалогических ветвей. Имеют ядро, где сосредоточен генетический материал, а также органеллы, многие из которых отсутствуют у растений, животных и грибов.

Регенерация – процесс восстановления утраченных или поврежденных частей организма. Репаративная регенерация — восстановление утраченных частей органов, тканей в случае их повреждения. Физиологическая регенерация – постоянное обновление «изношенных» макромолекул, органелл, клеток.

Рекристаллизация – процесс образования крупных кристаллов из более мелких.

Ренатурация – процесс восстановления нормальной структуры макромолекул после денатурации физико-химическими факторами.

Репарация – восстановление первичной структуры ДНК на основе принципа комплементарности, следующее после ее нарушения в результате мутаций. Процесс основан на том, что генетическая информация представлена в ДНК двумя копиями — по одной копии в каждой из двух цепей спирали ДНК. Благодаря этому поврежденный участок в одной из цепей может быть восстановлен в своем нормальном виде за счет информации, содержащейся в неповрежденной цепи.

Репликация ДНК – процесс удвоения молекулы ДНК с сохранением уникальной последовательности нуклеотидов. Репликация ДНК – важнейший молекулярный процесс, который лежит в основе всех разновидностей деления клеток, всех типов размножения, а значит, в основе обеспечения длительного существования отдельных индивидуумов и видов.

РНК (рибонуклеиновые кислоты) – представляет собой одноцепочечную полинуклеотидную цепь, состоящую из мономеров – рибонуклеотидов, которые соединены между собой фосфодиэфирными связями. Азотистыми основаниями РНК являются аденин, урацил, гуанин и цитозин, моносахаридом – рибоза. Информационная или матричная РНК (мРНК), транспортная РНК (тРНК) и рибосомальная РНК (рРНК) – макромолекулы-посредники в процессах реализации генетической информации и синтеза белков.

Смерть – генетически детерминированный процесс естественной гибели организма через определенный промежуток времени, на определенном этапе его индивидуального развития. Завершает онтогенез.

Преждевременная гибель может наступить в результате замораживания, травм, отравлений и др. посторонних причин.

Соматическая клетка – любая неполовая клетка многоклеточного организма. Каждая клетка организма содержит одинаковый набор хромосом и, следовательно, обладает одинаковой генетической информацией, при этом избирательная экспрессия генов приводит к дифференцировке клеток и приобретению ими различного фенотипа.

Сосуд Дьюара – крупный металлический сосуд, предназначенный для длительного хранения объектов при отрицательных температурах. Например, хранение жидкого азота при минус 196°С и биологических объектов в нем. Постоянная температура длительно поддерживается за счет специальной конструкции сосуда и его хорошей теплоизоляции.

Сохранность – это относительное количество выживших клеток после действия экстремальных факторов, по отношению к их исходному количеству, которое определяют, например, путем добавления к объекту красителя (например, трипанового синего). В целые, неповрежденные клетки молекулы красителя не проникают. Но в случае разрыва плазматической мембраны и повреждения внутреннего содержимого в клетки поступает трипановый синий, и ее цитоплазма окрашивается в интенсивный синий цвет. Погибшие клетки легко посчитать под световым микроскопом и вычислить процент сохранившихся клеток.

Стволовые клетки — недифференцированные клетки, способные неограниченно делиться и давать потомство, часть которого дифференцируется, а часть остается стволовыми. Являются основой развития, роста, регенерации и постоянного обновления тканей и органов.

Сублимация (возгонка) — переход веществ из твёрдого агрегатного состояния в газообразное, минуя жидкое.

Температура – с позиций молекулярной физики, это термодинамический параметр, характеризующий среднюю кинетическую энергию молекул системы, это физическая величина, характеризующая степень нагретости тел. Измеряется в абсолютных термодинамических единицах – градусах Кельвина (К) и в международных практических единицах – градусах Цельсия (С). Между ними существует следующая связь: $C = K - 273.15$.

Теплокровные животные (гомойотермные) – животные, имеющие постоянную температуру тела, обычно выше окружающей среды.

Теплота (тепло) – внутренняя энергия термодинамической системы, образуемая движением частиц тела (молекул, атомов и т. п.). Энергия может

изменяться двумя способами: посредством совершения работы и посредством теплообмена с окружающей средой.

Теплоизоляция – приспособления, уменьшающие процесс теплопередачи.

Термогенез – выработка внутреннего тепла у животных в процессе метаболизма.

Термопара – термометр, состоящий из двух разнородных металлических проводников со спаянными концами. На одном конце проводников поддерживается постоянная температура, например 0°C. Другой конец погружается в объект, температуру которого требуется измерить. При разнице температур на концах термопары возникает электродвижущая сила, которую измеряют милливольтметром и переводят в единицы измерения температуры.

Терморецепторы – специализированные нервные клетки, имеющие высокую чувствительность к изменениям температуры. Являются одним из элементов терморегуляции. У млекопитающих они расположены в различных частях тела: коже, скелетных мышцах, кровеносных сосудах, во внутренних органах и др.

Терморегуляция – способность организмов поддерживать температуру своего тела независимо от температуры внешней среды.

Термофилы – организмы, живущие при температурах свыше 45 °C.

Ткани – составные элементы организма, образованные группами сходных по происхождению, структуре и функциям клеток. Выполняют разнообразные функции. В различных комбинациях образуют органы.

Торпидность – состояние организма, характеризующееся вялостью, малоподвижностью, отсутствием адекватной реакции на раздражители.

Трансплантация – пересадка тканей, органов или частей тела с одного места на другое, а также в другой организм.

Ферменты – белковые молекулы, выполняющие роль биологических катализаторов. Они осуществляют реакции, невероятные при умеренных температурах, ускоряют скорость биохимических реакций в тысячи раз и обеспечивают избирательность нужных клетке процессов. В каждой клетке имеются тысячи разновидностей ферментов.

Хлоропласты – первичный функциональный тип пластид, ответственный за осуществление фотосинтеза у эукариотов. Содержат

хлорофилл, однако не всегда окрашены в зеленый цвет, т.к. всегда содержат вспомогательные пигменты. Имеют симбиотическое происхождение.

Холод – состояние относительно низкой температуры среды или тела по сравнению с обычными условиями.

Холоднокровные животные (пойкилотермные) – животные, у которых температура тела определяется температурой окружающей среды, например, насекомые, моллюски, рыбы, рептилии и амфибии. Температура их тела может меняться в определенных пределах в зависимости от повышения или понижения температуры внешней среды.

Холодовое воздействие – помещение биообъектов в условия холода.

Холодовой стресс (низкотемпературный шок) – комплекс ответных неспецифических и специфических реакций биообъектов в ответ на холодное воздействие.

Холодоустойчивость – способность биологических объектов жить при низких положительных и без серьезных повреждений переносить периодическое действие отрицательных температур.

Хроматин – нуклеопротеидный комплекс, состоящий из нитей ДНК, стабилизированных специальными белками, в первую очередь гистонами. В интерфазе хроматиновые нити находятся в слабоспирализованном состоянии. Перед делением хроматин концентрируется, образуя классические хромосомы.

Хромосомы – форма существования генетического материала в момент деления клеток. Хромосомы невидимы в интерфазном ядре, так как представлены в виде тонких длинных нитей хроматина. Но при митозе хроматин уплотняется так, что становится видимым в световом микроскопе в качестве палочковидных тел – хромосом. Х. отвечают за хранение и равномерное распределение наследственного материала между дочерними клетками.

Штамм – культура микроорганизмов одного вида, выделенная из одного источника (организма человека или животного, окружающей среды). Для обозначения штамма используют родовое или видовое название, дополненное или протокольным номером, или названием источника или местности, где был выделен микроорганизм (например: кишечная палочка *E.coli* M-17, вирус гриппа А/Москва/10/99/H₃N₂).

Цитозоль – основное содержимое цитоплазмы, за исключением ядра и органелл. Составляет ~55% общего объема клеток. Представляет собой

структурированный коллоид, состоящий из сложной смеси растворенных в воде органических макромолекул – белков, жиров, углеводов, малых органических молекул (аминокислоты, глюкоза, нуклеотиды, жирные кислоты и т. д.), а также неорганических веществ. Содержит до 10000 различных видов белков, главным образом ферментов.

Цитоплазма – все внутреннее содержимое клетки, за исключением ядра. Содержит 75-85% воды, 10-20% белков и много других веществ, но в меньших количествах. Это сложная, многокомпонентная, полифункциональная, высокоупорядоченная коллоидная система, содержащая множество органических молекул, органелл, ферментов, которые обеспечивают обмен веществ и метаболизм.

Эвритермия – приспособленность организмов к колебаниям температуры окружающей среды в широком диапазоне.

Экзоцитоз – процесс выведения внутриклеточного содержимого, при котором секреторные пузырьки сливаются с плазмолеммой и их содержимое освобождается из клетки.

Эмбрион – зародыш в начальный период развития.

Эндоцитоз – активный процесс поглощения клеткой крупных молекул, частиц, микроорганизмов (пиноцитоз, фагоцитоз).

Эстивация – оцепенение некоторых организмов во время достаточно высоких летних температур для переживания неблагоприятных условий.

Эукариоты – домен разнообразных живых организмов, появившихся на Земле примерно 2 млрд. лет тому назад. Обитают во всех биотопах нашей планеты, за исключением анаэробных зон. Клетки содержат оформленное ядро, геном содержит гистоны. Во время деления клеток из хроматина образуются хромосомы. В цитоплазме эукариотов имеются центриоли, динамичный цитоскелет, двумембранные органеллы (митохондрии, пластиды), эндоплазматическая сеть и др. К эукариотическим относятся клетки протистов, животных, растений и грибов. Формы клеток могут быть всевозможными, размеры клеток колеблются в пределах от 5 до 100 мкм.

Ядро – часть эукариотической клетки, в которой сосредоточен основной генетический материал, отделенный от цитоплазмы двойной мембранной оболочкой. В интерфазном ядре генетический материал представлен хроматином. Во время деления из хроматина формируются хромосомы.

Список сокращений

АК	— аминокислота
АДФ	— аденозиндифосфорная кислота
АТФ	— аденозинтрифосфорная кислота
ГЭК	— гидроксиэтилкрахмал
ГЛ	— глицерин
ГТФ	— гуанозинтрифосфат
Д	— дальтон
ДМАЦ	— диметилацетамид
ДМСО	— диметилсульфоксид
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ИПКиК	— Институт проблем криобиологии и криомедицины
кДа	— килоДальтон
М.м.	— молекулярная масса
НК	— нуклеиновая кислота
ПВП	— поливинилпирролидон
1,2-ПД	— 1,2 - пропандиол
ПЭГ 400	— полиэтиленгликоль с м.м. 400
ПЭО1500	— полиэтиленоксид с м.м. 1500
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
РНК	— рибонуклеиновая кислота
мРНК	— матричная РНК
рРНК	— рибосомная РНК
тРНК	— транспортная РНК
тпн	— тысяч пар нуклеотидов
ЭГ	— этиленгликоль
ЭПР	— электронный парамагнитный резонанс
ЯМР	— ядерный магнитный резонанс

Раздел 1. Основы криобиологии

Глава 1. Становление, развитие и достижения криобиологии и криомедицины

1.1. История возникновения и развития. Ученые – основатели криобиологии и криомедицины 1.2. Становление и развитие Института Проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии Наук Украины (ИПКиК). 1.3. Достижения и задачи криобиологии и криомедицины

1.1. История возникновения и развития. Ученые – основатели криобиологии и криомедицины

Криобиология и криомедицина как наука возникла сравнительно недавно. Как отдельное направление, объединившее все известные факты и результаты исследований, связанные с низкой температурой и ее влиянием на живые системы, она стала общепризнанной в середине прошлого столетия.

Одно из первых серьёзных научных исследований действия холода относится к середине XVII века. Английский физик Роберт Бойль обнаружил, что умеренное замораживание длительно сохраняет яйца, мясо, различные скоропортящиеся продукты, и после их отогрева они сохраняли свои полезные свойства, хотя их структура могла измениться.

В XVIII столетии подобные исследования приобрели определенный научный интерес благодаря появившемуся техническому оснащению, в частности использованию термометров, изобретенных Фаренгейтом (1714) и Реомюром (1734), который первый применил свое изобретение для исследований живых организмов. Им было выявлено, что насекомые могут погибать при температуре чуть ниже нуля, в то время как куколки бабочек переносили замораживание до минус 28°C.

В 1912 г. процесс вымораживания воды в живых организмах изучался русским физиком и энтомологом П.И. Бахметьевым, который обратил внимание на то, что в опытах по охлаждению живых организмов отсутствовали данные об измерении температуры тела самих животных. Это натолкнуло его на мысль исследовать температуру тела насекомых при

изучении температурных условий их существования. Для этого он использовал способ прямого измерения температуры тела экспериментальных животных с помощью термоэлектрического термометра и системы математической обработки экспериментальных данных, что позволило ему определить удельную теплоту тела и скрытую теплоту таяния замерзшей в нем жидкости. Поэтому именно исследования П.И. Бахметьева благодаря более совершенному подходу к изучаемой проблеме позволили расширить имеющиеся на то время сведения об обратимой остановке жизнедеятельности организма, вызванной действием низких температур, и положить начало изучению этого направления.

Важным событием в развитии криобиологических исследований XX века можно считать открытие и использование криозащитных веществ. Одним из основоположников учения о криозащитных веществах, способных предохранять биологические системы от губительного действия низких температур, можно считать Н.А. Максимова (1912), работы которого по изучению защитных свойств растворов неэлектролитов, неорганических солей и солей органических кислот внесли большой вклад в науку о защитных веществах. Опыты по замораживанию различных растений выявили защитное действие сахаров, в частности глюкозы и сахарозы, одноатомных и многоатомных спиртов, из числа которых с успехом был применен глицерин, хотя его защитное действие на растительные клетки оказалось слабее сахаров.

Значительный вклад в изучение процессов кристаллизации при охлаждении водных растворов, в том числе и содержащих биообъекты, внес Б. Люйе (1940-1960). Он детально исследовал микроструктуру кристаллов льда, образующихся при различных условиях замораживания воды, растворов NaCl, глюкозы, глицерина, яичного альбумина и желатины. Было показано, что форма кристаллов, образующихся при охлаждении, значительно варьировала в зависимости от концентрации растворенного вещества, способа приготовления раствора, скорости охлаждения. Б. Люйе выявил, что в зависимости от формы образующихся кристаллов льда, в частности, от наличия у них острых и напряженных граней, наблюдаются различные степени и характер повреждений биологических объектов, находящихся в замораживаемых растворах.

Было обнаружено, что при замораживании клеточных суспензий важным фактором, определяющим повреждение биологических структур клеток в условиях охлаждения, являются химические и физико-химические изменения, происходящие внутри и вне клетки. В начале 50-х г. Дж. Лавлок на основании опытов по замораживанию эритроцитов показал, что криоразрушение мембраны и гемолиз в клеточной суспензии происходят в результате увеличения концентрации солей при замораживании, что приводит к повышению в среде ионной силы, дестабилизирующей компоненты клеточной мембраны с выходом из ее состава фосфолипидов и холестерина. Дж. Лавлок установил, что лед образуется не в виде монолита, а состоит из отдельных кристаллических конгломератов, в промежутках между

которыми расположены микроканалы, содержащие концентрированный солевой раствор и вытесненные туда кристаллами льда клетки. При дальнейшем понижении температуры и дальнейшем росте кристаллов просвет между ними уменьшается, а концентрация солевого раствора уменьшившегося объема жидкой фазы повышается.

В дальнейшем П. Мейзур (1963-1969) показал, что для проявления липотропного эффекта гиперконцентрированного солевого раствора необходимо достаточно долгое экспонирование в нем клеток. К тому же такие явления наблюдаются в основном при достаточно медленном замораживании. Он же обратил внимание, что при высоких скоростях замораживания наблюдаются процессы внутриклеточной кристаллизации. П. Мейзур первым высказал мнение о необходимости оптимизации скоростей замораживания для минимизации отрицательного влияния двух описанных взаимоисключающих процессов. Это направление с привлечением математического моделирования и других прогностических подходов достаточно интенсивно развивается в криобиологии и в настоящее время.

В цикле работ Г. Меримена (1969-1974) было обнаружено, что клетки повреждаются не только повышенными концентрациями солевых растворов, но и несолевыми растворами при повышении их осмолярности до определенной критической величины. Он пришел к выводу, что концентрирование внутриклеточной жидкой фазы в процессе обезвоживания клеток при замораживании не может иметь решающего значения для повреждения клеток, которое является, прежде всего, следствием уменьшения их объема при вымораживании воды до критического значения. В связи с этим Г. Меримен выдвинул так называемую гипотезу минимального объема клетки при замораживании, которая позволила уточнить некоторые из возможных закономерностей устойчивости клеток к замораживанию.

Рассматривая историю возникновения и развития криобиологии, необходимо отметить существование определенной периодизации этой области естествознания. Так, для начального периода, вплоть до начала 50-х годов предыдущего столетия, характерно чисто эмпирическое объяснение роли низкотемпературных факторов в повреждении клеток и их защите. В дальнейшем же наблюдается переход к разработкам технологий криоконсервирования клеточных суспензий и биологических тканей на основе научно обоснованных данных с привлечением методов математического моделирования и предварительных теоретических расчетов.

Анализ данных по использованию низких температур как лечебного фактора показывает, что холод для этой цели использовался более 2500 лет тому назад, когда Гиппократ указывал на эффективность холода при лечении травм и травматических отеков. По-видимому, Авиценна одним из первых исследовал действие холода как анестетика. И в дальнейшем на протяжении сотен лет предпринимались попытки использовать охлаждение, в том числе и всего организма, с лечебной целью, в частности при травматическом шоке. Если до 1889 г. для лечения заболеваний и травм поверхностных покровов

тела применяли лед, то в последующем для этих же целей уже использовали и сжиженный воздух, затем – твердую углекислоту, а с 1905 г. – сжиженный азот. С этого времени метод лечения с использованием местного замораживания тканей стали называть криотерапией. В настоящее время это направление объединяет криомедицина – область медицины, изучающая и использующая низкие температуры в лечебных целях.

Со времени использования твердой углекислоты как анестетика предпринимались попытки использовать ее для деструкции папиллом и карцином. С 1922 г. Н. Сладковский с успехом применил этот холодагент при лечении дерматологических заболеваний, особенно при раковых поражениях кожи.

Изучение дозированных холодových локальных воздействий на биологические ткани, при которых достигалась деструкция тканей патологического очага с последующей стимуляцией репаративных процессов, стало теоретической и экспериментальной основой для применения методов криохирургии в клинической практике. Важным этапом в развитии метода криохирургии был 1961 г., когда американский нейрохирург А.С. Ли сумел с помощью криохирургической аппаратуры произвести деструкцию злокачественной и доброкачественной опухоли головного мозга. В дальнейшем были разработаны эндоскопические методы криохирургии для криодеструкции опухолевых образований пищевода, шейки матки, бронхов. Перспективным оказалось лечение низкими температурами в комбинации с облучением, что позволяет снизить дозу радиации, не уменьшая общей эффективности лечения. Эффективно устранять различного рода стрессовые синдромы, связанные с травмами головного мозга и острыми отравлениями, позволяет использование краниоцеребральной гипотермии.

В настоящее время криобиология и криомедицина находят все большее применение для успешного решения проблем практической медицины и сельского хозяйства, оставаясь по-прежнему одними из наиболее молодых областей науки.

1.2. Становление и развитие Института Проблем Криобиологии и Криомедицины Национальной Академии Наук Украины (ИПККиК).

Большую роль в развитии криобиологии и криомедицины стало создание в 1972 в г. Харькове Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины (Рис.1.1). Институт был создан по инициативе академика Б.И. Веркина и член-корреспондента Н.С. Пушкаря при активной поддержке Президента Академии наук Украины Б.Е. Патона и занял ведущее место среди других учреждений аналогичного профиля в мире по масштабу выполняемых исследований и актуальности научной тематики. Создание института именно в г. Харькове было обусловлено значительными достижениями харьковских ученых в области теоретической и прикладной

физики низких температур, низкотемпературного приборостроения, технической криогеники (Рис.34.3).



Рис.1.1. Президиум одного из заседаний Ученого совета ИПКиК в 1975 году. На фотографии присутствуют главные организаторы Института. Сидят, слева направо: доктор медицинских наук, профессор А.М.Белоус, доктор физико-математических наук, профессор В.А.Моисеев, доктор медицинских наук, профессор Н.С.Пушкарь (инициатор и первый директор с 1972 по 1983 год), кандидат технических наук Ю.А.Иткин. В дальнейшем в становлении и развитии института принимали активное участие, сидящие рядом, профессора А.А.Цуцаева и В.И. Митасов, а также отсутствующие на фотографии профессора Б.П.Сандомирский, М.И.Шраго, Т.Н. Юрченко, Е.Я. Панков и многие другие.

В настоящее время ИПКиК является единственным в Украине и на постсоветской территории научным учреждением, осуществляющим комплексные фундаментальные исследования и прикладные разработки в области криобиологии и криомедицины для их использования в биотехнологиях, медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, пищевой и микробиологической промышленности. Значительный вклад в развитие основных научных направлений института за время его существования внесли академики НАН Украины В.И. Грищенко, А.Н. Гольцев; член-корреспонденты НАН Украины Н.С. Пушкарь, А.М. Утевский, А.М. Белоус, Е.А. Гордиенко; профессора Г.А. Бабийчук, А.А. Цуцаева, В.И. Луговой, В.А. Моисеев, Т.Н. Юрченко, Б.П. Сандомирский, В.А. Бондаренко, Г.Ф. Жегунов, А.К. Гулевский, О.А. Нардид, А.Ю. Петренко и ряд других ученых (рис. 1.2).

ИПККиК был создан и развивается как комплексное научно-исследовательское учреждение, в котором работают биологи и медики в тесном сотрудничестве с физиками, химиками, математиками и инженерами. Более чем за 45 лет работы в результате проведенных исследований учеными института подробно изучались механизмы криоповреждений и возможной

криозащиты биологических систем разного уровня организации, процессы их репарации после холодовых повреждений, особенности холодовых разрушений и возможности последующей самосборки клеток на молекулярном уровне. В институте созданы эффективные криопротекторы и криозащитные среды для новых и усовершенствованных технологий низкотемпературного замораживания и длительного хранения биологических объектов различного происхождения. Сотрудниками института изучены механизмы устойчивости организмов к действию экстремальных факторов и механизмы их холодовой адаптации в естественных и искусственных условиях. Исследование учеными института особенностей перестройки метаболизма и физиологических функций пойкилотермных и гибернирующих животных позволило выявить новый класс биорегуляторов и приблизило к возможности индуцировать состояние гибернации у человека.



Рис. 1.2. Отдых на природе после рабочего дня на международном симпозиуме Cryo-2006 в Гамбурге. Директор ИПКиК с 1983 по 2012 год, академик НАН Украины В.И.Грищенко; директор ИПКиК с 2012 по настоящее время, академик НАН Украины А.Н.Гольцев и профессор Г.Ф.Жегунов.

В институте создан не имеющий аналогов в Украине низкотемпературный банк биологических объектов, который в соответствии с решением Кабинета министров Украины имеет статус «Национальное достояние» и может быть использован для долгосрочного хранения генофонда редких и исчезающих видов животных и растений.

При ИПКиК Украины работает Международная кафедра ЮНЕСКО. Основной целью работы кафедры является подготовка научных кадров, в том числе стажировка молодых научных сотрудников института в лучших лабораториях за рубежом. На кафедре работают ведущие ученые Украины, Великобритании, США, Канады, Японии. В институте функционирует единственный в Украине специализированный Ученый совет по защите диссертаций докторов философии и докторов наук по специальностям «криобиология» и «криомедицина».

В настоящее время в институте работают 233 сотрудника, среди которых академик НАН Украины, 24 доктора наук, 106 кандидатов наук. Сотрудниками ИПКиК НАН Украины издано более 3000 научных статей, 80 оригинальных монографий и учебников, часть которых издана за рубежом, получено более 360 авторских свидетельств и патентов Украины и 18 зарубежных патентов на изобретения. Сотрудники института являются лауреатами пяти Государственных премий СССР и Украины. Ведущие ученые ИПКиК НАН Украины пропагандируют свои знания, занимаясь преподавательской деятельностью в высших учебных заведениях Харькова.

1.3. Достижения и задачи криобиологии и криомедицины

Криобиология и криомедицина – область медико-биологической науки, занимающаяся исследованием действия холода на живые системы.

Криобиология, также как и криомедицина, охватывает фундаментальные и прикладные проблемы. К числу фундаментальных следует отнести выполненные исследования механизмов и закономерностей физико-химических и функциональных процессов, протекающих в биологических системах при охлаждении до 0°C и замораживании до более низких температур. На основании этих данных разработаны теория и практика естественной и искусственной криозащиты биологических объектов; созданы криозащитные и консервирующие среды, включая естественные биологические антифризы. С этой целью фундаментальная криобиология выясняет механизмы естественного и искусственного гипобиоза, а также анабиоза объектов растительного и животного происхождения.

К числу прикладных проблем, в которых криобиологией получены ощутимые результаты, относятся такие, как обоснование и изучение клинической эффективности применения гипотермического и низкотемпературного воздействий на организм в качестве лечебного фактора, экспериментальное обоснование и клиническое применение криоконсервированных тканей и препаратов, изучение иммунологических свойств криоконсервированных органов и тканей и иммунных реакций организма на их трансплантацию, создание методов и технологических процессов низкотемпературного консервирования и лиофилизации биологического материала в медицине и сельском хозяйстве.

Важным разделом практической криомедицины является применение холода как лечебного фактора. Значительных успехов в последнее время достигла экспериментальная и клиническая криомедицина в исследовании и использовании патофизиологических механизмов низкотемпературного воздействия на нормальные и патологически измененные органы и ткани. Создана новая эндоскопическая криоаппаратура для холодового лечения патологии полостных органов. Установлено, что холодовое воздействие оказывает не только деструктивное, но и стимулирующее действие на ткани, ускоряя процессы репарации в очаге острого и хронического воспаления.

Криомедицина решила научные и практические проблемы искусственного гипотермического охлаждения центральной нервной и сердечно-сосудистой систем, а также органов брюшной полости, при котором возникают сложные нейрогуморальные реакции, оказывающие общестимулирующее действие на функциональное состояние организма. Для целей медицинской практики разработаны методы криоконсервирования клеток крови и костного мозга, стволовых клеток из различных других источников, роговицы, репродуктивных клеток человека, эндокринных тканей, хрящей и сегментов костной ткани, кожи и некоторых других биологических тканей. Криоконсервированные клетки применяются не только в медицине, но и в сельском хозяйстве и микробиологической промышленности.

В задачи криобиологии и криомедицины на ближайшие годы входит:

- уточнение, с привлечением методов математического моделирования, механизмов повреждений биологических систем различного уровня организации при действии охлаждения и низких температур и выработка подходов к действенной криозащите этих объектов, обеспечивающие разработку способов и технологических процессов низкотемпературного консервирования и лиофилизации биологических материалов, используемых в медицине, биологии, животноводстве и других отраслях;

- создание и усовершенствование технологий криоконсервирования биологических объектов, которые используются в регенеративной медицине для лечения и профилактики наиболее распространенных заболеваний с целью улучшения качества жизни населения;

- использование криоконсервирования как фактора управления состоянием биологических объектов – направленное регулирование функцией разных типов клеток при выборе определенного режима действия холода;

- создание сети криобанков стратегических запасов клеток донорской и кордовой крови, гамет и эмбрионов людей, в частности тех, которые относятся к группам риска (военные, полиция, работники АЭС и т.п.).

Наконец, необходимо отметить как долгосрочную задачу криобиологии и криомедицины – крионику. Крионика объединяет криобиологию, криогенную инженерию и практику клинической медицины. Задача крионики – разработка и применение криостаза (то есть консервации целых организмов путем их замораживания до криогенных температур). Возможности разработки эффективных технологий замораживания и последующего отогрева целого организма с полным восстановлением его функций будет неоценимым успехом в плане временной приостановки жизни. Такие потенциальные возможности уже сейчас имеют огромный спрос с самыми разнообразными целями. Можно отметить, например, возможность приостановки жизни организмов с неизлечимыми на сегодняшний день болезнями с будущим оживлением, когда эта проблема будет разрешена.

Рекомендуемая литература:

1. Низкие температуры в медицине / Под ред. К.С. Тернового, Л.Г. Гассанова. – Киев.: Наук. Думка.–1988. – 279 с.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев.: Наук. Думка.– 1994. – 432 с.
3. Грищенко В. И. Достижения криобиологии и криомедицины во имя нации // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 3. – С. 269–274.
4. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. академика НАНУ А.Н. Гольцева. – Харьков.– 2012. – 768 с.

Глава 2. Природа живых тел

2.1. Физико-химическая основа. 2.2. Энергетическая основа. 2.3. Водная основа
2.4. Температурная основа. 2.5. Белковая основа. 2.6. Нуклеиновая основа.
2.7. Информационная основа. 2.8. Каталитическая основа. Ферменты.
2.9. Клеточная основа 2.10. Системная основа. 2.11. Гомеостаз и адаптация
2.12. Основные принципы и уровни организации.

Прежде чем излагать основы криобиологии, следует подробно охарактеризовать природу клеток и живых организмов. Это необходимо, чтобы реально представлять организацию, структуру и функции биологических объектов, подвергающихся воздействию низких и сверхнизких температур, а также процессов, которые могут происходить на разных этапах криоконсервации.

2.1. Физико-химическая основа

Жизнь – это форма бытия организованной материи, обладающей специфическими биологическими свойствами. Явление жизни обусловлено процессом существования отдельных *организмов (живых тел)*, обладающих определенными физическими и биологическими характеристиками.

Живые существа являются производными развивающейся природы, ее составной частью. Все биологические процессы и само существование живых организмов осуществляются в рамках ее законов.

Практически все элементы периодической системы Менделеева найдены у различных представителей живых организмов. Основными составляющими живых организмов являются углерод, водород, кислород, азот, сера и фосфор – элементы, не самые распространенные на планете, но наиболее соответствующие условиям живых систем. Именно эти элементы образуют характерные для живой природы разнообразные органические вещества и основные макромолекулы: *белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и липиды*. До 70-80% от массы живых тел составляет вода, а также разнообразные минеральные и органические соли. Таким образом, все живые организмы, как и неживые объекты, состоят из тех же атомов и молекул. Причем свойства конкретных соединений, составляющих клетки и организмы, не отличаются от свойств таких же молекул в неживых системах. Но специфически организованные и упорядоченные комплексы макромолекул в виде компартментов клеток обладают уже новыми – *биологическими свойствами*. Вследствие этого биологические объекты сильно отличаются от неживых тел, т. к. они имеют свойства, характерные только для них. Например, им присуще размножение, питание, дыхание и т. д. Это, по сути, обусловлено управляемым и упорядоченным

взаимодействием составляющих организм молекул и клеток.

Установлено, что организмы располагают множеством физических и химических характеристик. В частности, они обладают дискретностью и иерархичностью строения, взаимодействием и взаимозависимостью частей – целостностью. У них молекулярная основа строения, они преобразуют и используют энергию для совершения работы и др. Физико-химическая основа жизни позволяет изучать биообъекты современными мощными методами химии и физики, что привело к открытиям многих молекулярных и цитогенетических механизмов жизненных явлений.

Тысячи биохимических реакций протекают в организме на основе *законов химии*, например, сохранения массы и энергии. Почти все вещества находятся в растворенном в воде состоянии. Принципы поведения веществ в растворах не отличаются в клетке или в пробирке. Для протекания почти всех биохимических процессов требуются *ферменты*, которые функционируют на принципах *химического катализа*. Различные факторы, такие как свет, температура, давление оказывают на биохимические реакции такое же действие, как и на химические реакции вне биологических систем.

Гормоны и нейромедиаторы являются *химическими молекулами* определенной природы и структуры. Связываясь с молекулами–рецепторами на поверхности клеток, они передают определенные сигналы и информацию, зачастую изменяя физическое состояние мембран и других молекулярных комплексов. То есть клетки многоклеточных организмов взаимодействуют на *физико-химической основе*.

Химические взаимодействия различных молекул являются основой жизни. Признаки и свойства живых организмов записаны в молекулах ДНК, хранятся и передаются из поколения в поколение в ходе химических процессов. Суть большинства механизмов биологических процессов можно свести к биохимическим преобразованиям, то есть к трансформации молекул одних веществ в другие. Основой этих изменений являются процессы разрыва и образования химических связей.

Движение и взаимодействия молекул в живых системах основаны на таких физических процессах, как диффузия и осмос, в основе которых лежит *тепловое движение*. Многие молекулы и надмолекулярные структуры клеток обладают строго определенными функционально значимыми *физическими свойствами*, например, полярностью или гидрофобностью. Мембраны клеток обладают электрическим потенциалом, отростки нервных клеток проводят *электрический ток*. Движение крови по сосудам осуществляется по *законам реологии*. Суставы, кости скелета, мышцы действуют на основе *принципов механики*. Превращения энергии в живых организмах подчиняются *законам термодинамики*. Физические законы обуславливают явления зрения, слуха, движение, проведение нервного импульса, проницаемость различных веществ и многое другое.

Живые организмы, как и все материальное, существуют в определенном пространстве и времени. Они являются сложными системами, действующими на основе глобального свойства и способности всех

составляющих к *движению*. Основой всех видов движения в живых телах является тепловое движение молекул, возникшее одновременно с материей в момент Большого взрыва.

Таким образом, еще раз следует отметить, что живые тела обладают физико-химическими характеристиками, и все процессы в живых организмах подчиняются законам физики и химии.

Упорядоченная система взаимодействующих молекул лежит в основе *базовых молекулярно-биологических процессов*: метаболизма, а также обмена веществ, энергии и информации. Эти процессы, в свою очередь, лежат в основе *биологических свойств и характеристик живых тел*: питания, выделения, дыхания, роста и развития, раздражимости и возбудимости, подвижности, гомеостаза и адаптации, размножения, наследственности, изменчивости и эволюции.

Все перечисленные свойства генетически детерминированы, находятся под контролем нуклеиновых кислот и обеспечиваются специальными молекулярными процессами. Биологические свойства лежат в основе выживания и размножения организмов.

Таким образом, очевидно, что все живые организмы (в том числе и человек) не являются чем-то исключительным, а есть часть материального мира. Они имеют такую же атомарную и молекулярную природу, как и неживая материя. По своему химическому составу и принципам физико-химических взаимодействий они не отличаются от неживых тел. Их отличает, в первую очередь, значительная специфичность набора конкретных молекул, их концентрированная локализация в определенном пространстве. А главное – высочайшая, генетически программируемая упорядоченность этих молекул, их комплексов и взаимодействий, что и приводит к созданию *высокоорганизованных* биосистем и появлению качественно нового уровня существования материи – *жизни*. На этом уровне живые системы функционируют по более сложным биологическим законам, чем его отдельные составляющие.

Таким образом, в природе имеет место строгая интеграция биологического и физического мира. Живая материя является составной частью природы и соблюдает те же универсальные физические законы, что и неживая материя. *Поэтому все биологические тела, все их составные части и компоненты реагируют на действие замораживания в соответствии с едиными закономерностями природы.*

2.2. Энергетическая основа

Понятие работы приложимо к любому процессу в живых системах, начиная от молекулярного уровня и заканчивая уровнем цельного организма. Естественно, для выполнения любой работы необходима энергия. Энергия должна постоянно поступать в организм извне, преобразовываться, храниться и целенаправленно использоваться. Остановимся на особенностях этих процессов.

Поступление. Свободная энергия из внешней среды поступает в живые организмы в основном двумя путями:

1. *Хемотрофный путь.* Большинство бактерий, а также простейшие, грибы и животные, потребляющие энергию из окружающего пространства в виде энергии химических связей разнообразных органических веществ - *органотрофы*. Эти вещества потребляются разнообразными способами в процессе питания. Поглощенные органические макромолекулы (белки, полисахариды, липиды) перевариваются – дезинтегрируются до неспецифических мономеров: аминокислот, моносахаридов, карбоновых кислот и др., которые являются источниками энергии. Химическая энергия извлекается из них в процессе постепенного окисления и разрушения мономеров органических веществ до H_2O и CO_2 . Некоторые прокариоты, которые в качестве источника энергии могут использовать неорганические вещества, – *литотрофы*.

2. *Фототрофный путь.* Растения и некоторые бактерии потребляют энергию видимого света. Основным источником лучистой энергии является Солнце. Потребление и трансформация солнечной энергии биосферой происходит в результате сложного процесса - *фотосинтеза*. Растительные клетки имеют хлоропласты, которые содержат специальные молекулы, поглощающие фотоны – хлорофилл. Затем начинается каскад квантовых и молекулярных превращений, приводящих к преобразованию лучистой энергии в энергию химических связей АТФ.

Преобразование энергии. У животных существует несколько универсальных метаболических путей трансформации энергии пищи в энергию химических связей АТФ. Например, гликолиз – путь превращения глюкозы, являющейся ключевым источником энергии у многих организмов. Образовавшаяся из полисахаридов глюкоза подвергается поэтапному окислению. Этот процесс происходит в анаэробных условиях. Специальными ферментами от молекулы глюкозы один за другим отрываются молекулы водорода. Шестиуглеродная молекула глюкозы в метаболическом пути гликолиза сначала расщепляется на две трехуглеродные молекулы пировиноградной кислоты (при этом образуется 2 молекулы АТФ). Затем пируват преобразуется ферментами в 2-х углеродные молекулы Ацетил-КоА, который затем в метаболическом цикле Кребса полностью разрушается до молекул CO_2 и H^+ . Оторванные от глюкозы атомы водорода связываются специальными коферментами НАД и ФАД, которые переносят протоны и электроны на дыхательную цепь митохондрий. Энергия движущихся по цепи электронов используется для переноса протонов в межмембранное пространство митохондрий и создания мощного электрохимического потенциала. Энергия этого градиента употребляется для целенаправленной диффузии протонов через «молекулярные машины» – АТФ-синтазы. Этот самый сложный ферментативный комплекс, используя энергию электрического тока протонов, синтезирует значительное количество АТФ.

Только на последнем этапе разрушения органических веществ, в конце дыхательной цепи используется кислород. С помощью другого сложного

ферментативного комплекса – цитохромоксидазы, катализируется процесс соединения кислорода, протонов и электронов. В результате образуется вода, где водород имеет наивысшую степень окисления. Аналогичный путь превращения характерен и для других органических источников энергии в клетках.

В растительных клетках используется иной механизм аккумуляции и трансформации энергии. Главным процессом превращения энергии потока фотонов в энергию химических связей АТФ, а затем в химические связи органических веществ является *фотосинтез*. Сутью энергетических превращений при световой фазе фотосинтеза является поглощение квантов энергии света (электромагнитного излучения) и преобразование их через ряд этапов в энергию химических связей АТФ. Образовавшаяся АТФ используется в темновой фазе фотосинтеза для образования органических веществ.

Запасание и хранение энергии. Извлекаемая практически любыми способами энергия в конечном итоге в основном аккумулируется в мембранных потенциалах или макроэргических связях АТФ и других нуклеотидтрифосфатов. Так как в качестве энергетического аккумулятора используется главным образом АТФ, то в клетке достигается большая экономия в отношении количества действующих механизмов. Аденозинтрифосфорная кислота является нуклеотидом и состоит из аденина, рибозы и трех остатков фосфорной кислоты. На заключительных этапах трансформации энергии происходит образование АТФ за счет фосфорилирования АДФ. При этом энергия аккумулируется не столько в фосфатных связях, как в связях всей молекулы. Процесс синтеза АТФ происходит в митохондриях, где накапливается и хранится значительное ее количество. Затем эта небольшая универсальная молекула может распространяться по всей клетке и снабжать энергией множество разнообразных видов работы.

Целенаправленное использование энергии. АТФ играет ключевую метаболическую роль, так как является связующим звеном между процессами трансформации энергии и процессами, требующими затрат энергии. Специальные ферменты, обладающие АТФазной активностью, прицельно (где нужно и когда нужно) расщепляют АТФ и направляют энергию на выполнение конкретной работы. При гидролизе АТФ выделяется больше энергии, чем при гидролизе других внутриклеточных соединений. АТФ является главным сопрягающим звеном между экзергоническими и эндергоническими реакциями в клетках.

В первую очередь, с помощью АТФ производится работа по поддержанию упорядоченности и гомеостаза самих клеток. Для этого энергией снабжаются мембранные механизмы избирательного транспорта внутрь или наружу клеток (и мембранных клеточных органелл) разнообразных молекул. На это используется до 30% энергии АТФ. Много энергии, до 50-70%, используется для процессов синтеза необходимых для клетки молекул: аминокислот, пептидов, белков, нуклеотидов, РНК и ДНК,

жирных кислот, триглицеридов, фосфолипидов и т.д. Энергия необходима также и для изменения или поддержания формы и объема клеток, для движения частей клеток или их самих.

За счет перечисленных энергетических процессов обеспечиваются также процессы деления и дифференцировки клеток, это обуславливает процессы роста и развития органов, тканей и организма в целом.

Все физиологические процессы и функции тоже гарантируются затратами энергии АТФ. Например, мышечное сокращение, пищеварение и всасывание, транспорт веществ и движение крови, дыхание и мышление, а также многое другое.

Таким образом, любые организмы для поддержания жизни должны постоянно потреблять, управляемо преобразовывать, аккумулировать и целенаправленно использовать не только вещества, но и свободную энергию, поступающую из внешней среды. Если поступление энергии и материи (в виде пищи или света) в организм становится меньшим или прекращается, его структура начинает постепенно разрушаться, функции изменяются, и организм в конечном итоге погибает. *Охлаждение или замораживание может существенно отразиться на энергообеспечении биообъектов, что проявляется при отогреве нарушением структуры и функций и даже приводит к их гибели.*

2.3. Водная основа

Жидкая вода имеет абсолютное значение для жизни в условиях Земли (Рис. 2.1). Именно она обеспечивает внутреннюю подвижность и взаимодействия всех компонентов. Неизвестно ни одного живого организма, который бы мог обходиться без воды в *жидком состоянии*. Мало того, вода является основным веществом живых тел. В среднем H_2O составляет 70% общей массы живых организмов, и большинство внутриклеточных процессов протекает в жидкой среде. Подавляющее большинство веществ живых организмов, в клетках или вне клеток, находятся в *растворенном* состоянии. У животных вода содержится в клетках, вне клеток и в полостях тела. Внеклеточная вода составляет межклеточное пространство, кровь и лимфу. Внутриволокнистая вода содержится в спинномозговой, внутриглазной, перикардиальной жидкостях и др.

Молекулы воды полярны и связаны между собой водородными связями, образуют единую фазу, среду или своеобразный «универсальный эфир», в котором осуществляются все механизмы и процессы жизни.

Важность воды в обеспечении жизненных процессов обусловлена ее уникальными физико-химическими свойствами. В первую очередь, вода является очень эффективным растворителем, что обусловлено высокой полярностью ее молекул. Все органические и неорганические полярные молекулы (соли, газы, аминокислоты, белки, углеводы, нуклеиновые кислоты и т.д.) находятся в клетках в растворенном, ионизированном виде, даже нерастворимые вещества переходят в коллоидное или эмульгированное

состояние, позволяющее им взаимодействовать с водной фазой. Это значительно повышает их подвижность и реакционную способность, что очень важно для обеспечения метаболических и физиологических процессов.



Рис. 2.1. Температурные зоны воды в разных агрегатных состояниях. Жизнь проявляет свои свойства только в диапазоне жидкой воды от 0 до 100°C.

Вода способствует также *перемещению веществ* в клетки и из клеток в растворенном состоянии.

Вещества, смачиваемые водой, называют *гидрофильными* (к этой группе относятся как растворимые, так и нерастворимые, которые, однако, способны покрываться пленкой воды). Вещества, не смачиваемые водой и не способные не только раствориться, но даже образовать с нею равновесную смесь, называются *гидрофобными*. Третья группа соединений, амфифильные, содержат как гидрофильные, так и гидрофобные группы. К ним относятся фосфолипиды, ряд белков, некоторые аминокислоты и др. Такие соединения важны для создания в жидкой водной среде сложных структур, например, биомембран или рибосом, и поддержания их структуры и функций.

Теплоемкость воды превышает теплоемкость любого биологического вещества, поэтому она выступает как *регулятор теплового баланса клеток и организмов*. Вода может долго сохранять и распространять тепло по всему организму.

Вода обеспечивает *капиллярный эффект* – текучесть по очень тонким каналам в любом направлении, независимо от воздействия гравитации. Это очень важно для обеспечения питания и обмена веществ между клетками и кровеносными капиллярами, для движения межклеточной жидкости, для работы трофической и выделительной систем. Капиллярный эффект имеет большое значение в жизни растений. В частности, благодаря ему осуществляется подъем от корня к другим частям растения воды и растворенных в ней минеральных солей по сосудам. Транспорт продуктов фотосинтеза также происходит посредством перемещения по тонким ситовидным трубкам водных растворов органических веществ.

В водной среде обеспечивается высокая скорость *броуновского движения* молекул, что является одной из основ жизни. Именно в жидкой среде определяется оптимальное расстояние между непрерывно движущимися молекулами. Они двигаются с колоссальными скоростями во всех плоскостях и направлениях, что обуславливает всестороннюю диффузию молекул, их неизбежные взаимодействия, массу биохимических реакций метаболизма, лежащих в основе структуры и функций всего разнообразия клеток.

Вода как *субстрат* участвует во многих биохимических процессах, как *продукт* образуется при многих биохимических реакциях. Вода участвует в процессах ферментативного *гидролиза* — разрушении веществ с присоединением воды. Это, например, гидролиз жиров и белков при переваривании пищи, а при ферментативном гидролизе АТФ выделяется энергия, обеспечивающая метаболизм и функции клетки.

Вода и продукты ее ионизации – H^+ и OH^- , H_3O^+ *оказывают большое влияние на свойства многих компонентов клеток*. В частности, на структуру белков и нуклеиновых кислот, функции ферментов, на организацию биомембран из амфифилильных липидов и др.

Без фотолиза воды невозможен фотосинтез, а значит, существование растительного, а затем и животного мира. В результате фотолиза водород из состава воды переходит в состав органических веществ, а свободный кислород поступает в атмосферу.

Наконец, вода является средой обитания для миллионов видов живых организмов.

Без воды возможно лишь временное существование субстратов жизни (НК и белков), (состояние анабиоза, ангидробииоза) без ее визуальных проявлений.

Практически все метаболические и физиологические процессы протекают в водной среде. Причем для нормального функционирования необходима постоянная концентрация воды в клетках. Нарушение водного баланса приводит к патологическим изменениям и, в конечном счете, гибели всего организма. Поэтому в организмах существуют физиологические и биохимические механизмы регуляции водного баланса. Для этого существуют специальные барьеры, препятствующие свободному обмену воды. Например, кожные покровы у животных, кора у растений, клеточные

стенки у одноклеточных. У высших животных в гипоталамусе головного мозга есть центр жажды, регулирующий содержание воды в организме. У наземных животных выработались механизмы максимального удержания воды в организме, в частности, обратное всасывание в кишечнике и почках. На уровне клеток содержание воды регулируется цитоплазматической мембраной, где расположены специальные каналы для H_2O – *аквапорины*. Осмотическая активность воды крови и межклеточной жидкости регулируется количеством в них белков, синтезируемых клетками печени, а также солями.

Следует отметить, что воды в свободном виде (как, например, в стакане с чистой водой) в живых организмах нет. Практически вся вода в клетках находится в связанном квазикристаллическом состоянии. Молекулы белков, НК, углеводов, аминокислот, анионов, катионов солей и др. за счет полярных групп ($-OH$, $-NH_2$, $-COOH$ и др.) связывают и ориентируют на своей поверхности значительное количество молекул воды в несколько слоев.

Внутреннее содержимое клеток представляет собой коллоидный раствор (гель), состоящий главным образом из белков. Коллоидные растворы обладают существенными отличиями от истинных растворов. В частности, гели имеют внутреннюю организацию (структуру), обеспечиваемую упорядоченной ориентацией молекул воды вокруг организованной структуры взаимодействующих белковых молекул, образующих внутренний скелет клеток. За счет этого «жидкие» клетки приобретают свойства твердых тел: твердость, упругость, постоянную форму и структуру, но вместе с тем обладают высокой пластичностью. Жестко соединяясь между собой межклеточными структурами, клетки млекопитающих образуют практически твердые многоклеточные организмы, несмотря на содержание 70% воды.

Однако наличие свободной воды, а также способность связанной воды участвовать в химических и физических процессах, обуславливают практически беспрепятственное передвижение и взаимодействие субстратов и метаболитов. Мало того, внутриклеточная организация воды обуславливает формирование каналов, по которым целенаправленно перемещаются определенные молекулы. Кроме этого, имеются экспериментальные данные, указывающие на существование управляемых локальных фазовых переходов участков цитоплазмы из состояния «гель» в состояние «золь» и наоборот, что также целенаправленно перемещает вещества. То есть вода является *внутренним «эфиром»*, интегрирующим всё и вся в биосистемах.

Таким образом, физическая особенность внутриклеточной воды заключается в ее двойственности – упорядоченной жидкокристаллической структуре при одновременном сохранении свойств жидкой воды – низкого значения вязкости. Это свойство – являться одновременно и кристаллом, и жидкостью (переходить из одного состояния в другое) обуславливает точность и направленность перемещения и взаимодействия внутренних молекул, что обеспечивает взаимосвязанность непрерывных метаболических процессов. Фазовые переходы внутриклеточной воды могут создавать ту внутреннюю мобильность живой материи, которая, по-видимому, лежит в

основе всех свойств и механизмов живых тел. Считается, что именно таким образом в клетке обеспечивается целенаправленное перемещение разнообразных молекул (субстратов, продуктов, АТФ и др.).

Жизнь зародилась, развивалась и существует в водной среде, без воды не известно никаких жизненных проявлений. Но с другой стороны, *именно вода является основной мишенью действия замораживания*. Как только происходит затвердевание воды, вступают в силу различные факторы криоповреждений: кристаллизация, обезвоживание, концентрация солей, отсутствие подвижности молекул и их взаимодействий и др., что и обуславливает различные структурно-функциональные нарушения на уровне молекул, клеток и тканей.

2.4. Температурная основа

Тепловое движение – одна из форм существования и трансформации материи и энергии, особенно важное для живых тел. А температура – количественная мера такого вида движения. Диапазон температур Вселенной чрезвычайно широк. От абсолютного нуля (минус 273,15°С) до многих миллионов градусов Цельсия. На Земле эти рамки значительно уже и составляют от минус 88°С в Антарктике до 5000°С в ядре Земли (Рис. 2.2).

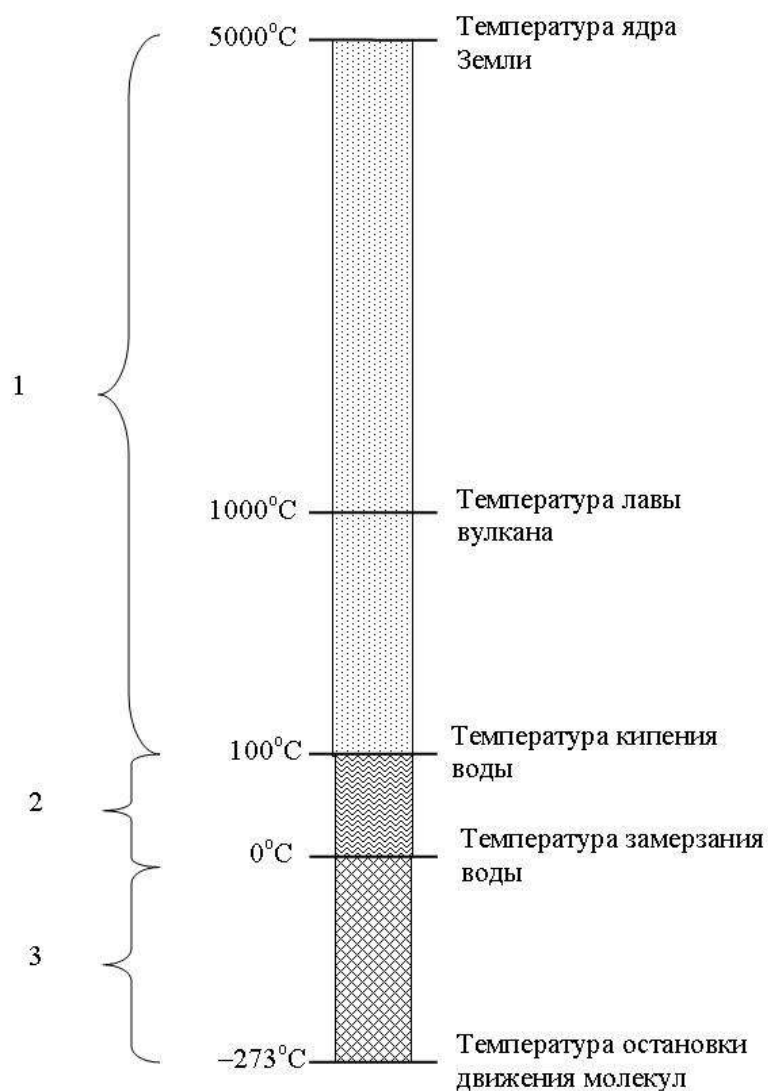


Рис. 2.2. Диапазон температур на Земле. 1 – газообразная вода, 2 – жидкая вода, пригодная для жизни, 3 – твердая вода.

Границы температур океанов, морей и рек, а также подземных вод ещё более ограничены и колеблются от нуля до десятков градусов Цельсия. Именно в этом диапазоне температур и существуют все живые тела.

Одноклеточные существа, примитивные многоклеточные, грибы, растения, а также пойкилотермные животные не могут поддерживать постоянную температуру тела, но способны проявлять жизнеспособность и активность в вышеотмеченных границах температур, так как их ферменты стабильно работают в указанном диапазоне. Птицы и млекопитающие способны автоматически поддерживать постоянную температуру тела в очень узких рамках, примерно от 32 до 42°C. В таких условиях биохимические и биофизические процессы в живых системах протекают стабильно, с постоянной скоростью и независимо от условий внешней среды, что дает этим типам животных колоссальные преимущества.

Температурный фактор имеет огромное значение для существования живых тел. Он подходит для активной жизни в очень узких рамках температур (за редким исключением) – от 0°C до 100°C – в диапазоне жидкого состояния воды. Субстраты жизни – НК и белки могут существовать

длительное время и в замороженном состоянии, при температурах вплоть до абсолютного нуля. В таких условиях они не проявляют своих биологических свойств и не обуславливают проявлений жизни, но сохраняют структуру и остаются способными к проявлению своего жизненного потенциала. В таком виде «семена жизни» могут путешествовать в космическом пространстве на обломках планет в течение сотен миллионов лет. При температурах выше 100°C явление жизни отсутствует, так как становится невозможным существование живых тел (хотя некоторые прокариоты способны выживать при экстремально высоких температурах) (Рис.2.3). В таких условиях разрушается большинство макромолекул клеток. А главное – происходит фазовый переход воды в газообразное состояние (при нормальном давлении), не свойственное явлению жизни.

Итак, следует еще раз подчеркнуть, что в основном жизнь проявляется в узких рамках температур (0 – 40°C), причем близких к нижней границе, возможных в природе (Рис. 2.2, 2.3). При столь низких биологических температурах химические связи стабильны, что обеспечивает существование сложных молекул, а многие химические реакции термодинамически невозможны или могут протекать с очень малыми скоростями, что не может гарантировать проявления жизни. Только наличие биокатализаторов, целенаправленно ослабляющих химические связи и ускоряющих реакции в тысячи раз, обеспечивает осуществление нужных биохимических процессов. Лишь благодаря биологическим катализаторам определяется мир биохимических реакций, обуславливающих жизнь. Ферменты посредством высоких скоростей и специфичности действия выделяют из неограниченного числа возможных реакций между бесчисленными молекулами только ограниченное множество. Следовательно, именно ферменты создают условия для протекания процессов, маловероятных при витальных температурах, обеспечивая жизненные явления.

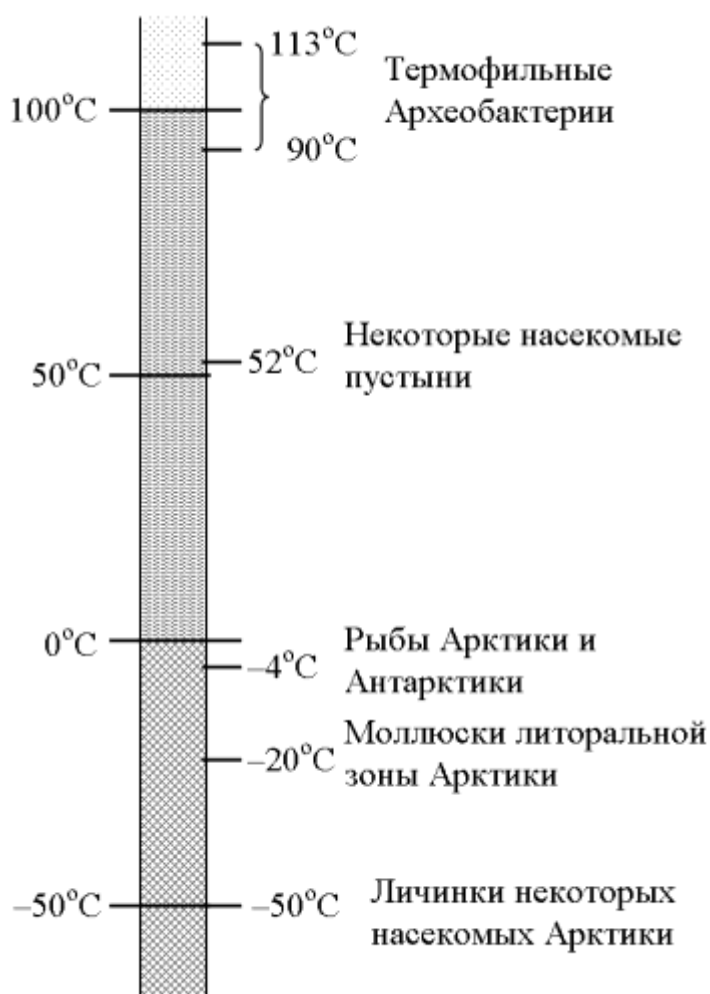


Рис. 2.3. Температурные пределы жизни.

Таким образом, относительно низкие физиологические температуры являются важнейшим условием возникновения и проявления жизни. Только на фоне «заторможенного» состояния окружающей среды, где вяло протекают превращения материи и энергии, специально сделанные и закономерно расположенные молекулы ферментов ярко выделяют ограниченный ряд взаимосвязанных биохимических реакций, обеспечивающих жизнь.

Однако понижение температуры ниже точки кристаллизации воды и изменение ее агрегатного состояния сразу же обуславливают отсутствие подвижности молекул и их взаимодействий, прекращение обмена веществ и метаболизма. Объекты переходят в состояние анабиоза, но с сохранением структуры и организации. Выживаемость биологических объектов в замороженном состоянии обуславливаются практически полной остановкой деструктивных процессов, прекращением повышения энтропии, но с сохранением энергетических, структурных и функциональных потенций после размораживания.

2.5. Белковая основа

Жизнь на Земле имеет белковую основу. Белки обеспечивают важнейшее: структуру и биокатализ. *Белки* – это крупные органические молекулы, состоящие из *аминокислот*, соединенных между собой пептидными связями в цепи. Они имеют сложную структурную и пространственную организацию. Эти молекулы являются основной составной частью любого организма. Например, на их долю приходится до 20% живой массы млекопитающих. Примерно 70% массы организмов составляет вода, а на долю остальных неорганических и органических веществ (аминокислот, нуклеотидов, моносахаридов, карбоновых кислот и др.), в том числе макромолекул (нуклеиновых кислот, липидов и полисахаридов), приходится лишь около 10%.

Это удивительные молекулы, имеющие чрезвычайные полномочия в клетках. Белки определяют структуру, форму и функции клеток; служат инструментами катализа и молекулярного узнавания; непосредственно участвуют в процессах обмена веществ, метаболизме и поддержании всех функций клетки. Известны десятки тысяч разновидностей белков. Отдельная клетка может содержать несколько тысяч разных протеинов, каждый из которых представлен в сотнях экземпляров. Именно особенности белкового состава обуславливают специфику структуры и функций данной клетки. То есть белки определяют весь комплекс признаков клеток и организмов.

Белки выполняют множество очень важных для жизни функций. Они определяют структуру и форму клетки, обуславливают все функции органелл и клеток, служат инструментами молекулярного узнавания; все ферменты имеют белковую природу, они непосредственно участвуют в процессах обмена веществ и поддержании всех функций любых организмов. Поэтому белки часто называются также *протеинами* (от греч. *proteos* – первый). В организмах млекопитающих насчитывается до 50 тыс. разнообразных белков. Индивидуальная и видовая специфичность набора белков в данном организме определяет особенности его строения и функций, а набор белков в дифференцированной клетке определенного организма определяет морфологические, метаболические и функциональные особенности каждого типа клеток. Все реакции метаболизма, все функции и все микро- и макроанатомические структуры любых живых организмов обусловлены, в первую очередь, белками.

Белки построены из 20 различных *аминокислот*, каждая из которых имеет ярко выраженную химическую индивидуальность за счет наличия специфического радикала (например $-H$ – у глицина, $-CH_3$ – у аланина, $-CH_2-SH$ – у цистеина и т.д.). Это разнообразие аминокислот и вариантов их соединений лежит в основе необычайного множества химических и физических свойств различных белков. Аминокислоты объединяются между собой *пептидными связями*. Карбоксильная группа одной кислоты взаимодействует с аминогруппой другой. В результате между собой объединяются в разном порядке разнообразные химические группировки

радикалов аминокислот, какие и обуславливают конформацию и свойства белков. Несколько аминокислот, объединенных между собой, называют *олигопептидами*. *Полипептиды* содержат более десяти аминокислот. Полипептиды высокой молекулярной массы образуют белки. Комбинации из 20 аминокислот могут образовывать бесчисленное множество различных по размерам, структуре и функциям белков. Линейная последовательность аминокислот в полипептиде уникальна для каждого индивидуального белка, информация о ней содержится в участке молекулы ДНК, который называется *геном*.

Простые белки образованы только аминокислотами. В состав *сложных белков* входят вещества иной природы, например, липиды (липопротеиды), углеводы (гликопротеиды), атомы металлов (Fe, Mn, Cu и др.). Многие *белки-ферменты* также содержат в активном центре вещества небелковой природы – *коферменты*, непосредственно участвующие в химических превращениях.

Уровни структурной организации белков представлены на рис. 2.4. К этому следует добавить наличие в белках *белковых доменов* – уникальных структур со специфической пространственной укладкой, образованных любой частью полипептидной цепи, способной независимо формировать устойчивый компактный микрокомплекс. Белковые домены могут содержать от 40 до 350 аминокислот и служить универсальными модулями, из которых собираются многие разновидности белков. Крупные протеины могут содержать десятки разных доменов, соединенных между собой короткими бесструктурными участками полипептидной цепи.

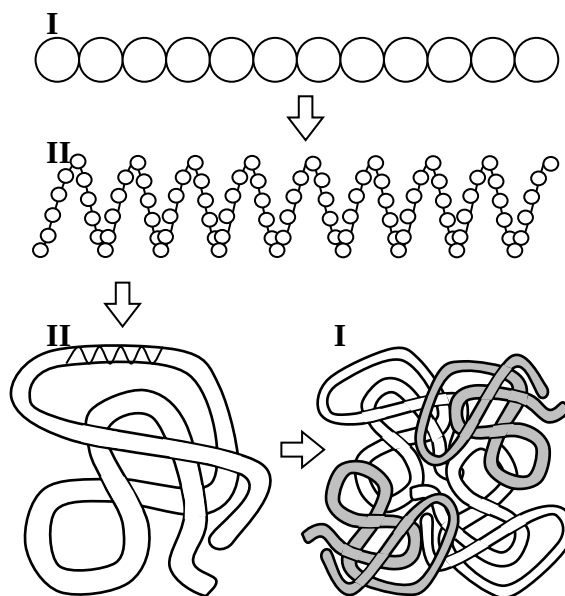


Рис. 2.4. Уровни структурной организации белков. *I – первичная структура – линейная последовательность аминокислот; II – вторичная структура – образование спирали или складчатой структуры из полипептидов; III – третичная структура – полная трехмерная организация полипептидной цепи из спиральных и складчатых участков; IV – четвертичная структура – образование белкового комплекса, состоящего из нескольких полипептидных цепей.*

Аминокислотная последовательность белковой молекулы определяет её пространственную структуру. Конкретная структура белка стабилизируется нековалентными взаимодействиями между частями её полипептидной цепи.

Последовательность аминокислот в белковой молекуле, особенности строения их радикалов определяют её *пространственную структуру*. Конкретная пространственная структура полипептидной цепи стабилизируется различными химическими связями между её участками. В зависимости от формы, белки могут быть фибриллярными и глобулярными. *Фибриллярные белки* имеют вид нити. Они довольно стабильны в физиологических условиях, плохо растворимы в воде. Примеры: коллаген, актин, миозин, кератин. У большинства белков *глобулярная* структура. Они имеют вид глобулы и хорошо растворимы в воде. Примеры: гемоглобин, альбумин, большинство ферментов.

Совокупность структурных и функциональных белков клеток определяется как *протеом*. Это полный набор десятков тысяч разнообразных белков, обеспечивающих десятки и сотни всевозможных метаболических процессов и функций. Качественный и количественный состав протеома определяется *генотипом* – совокупностью генов данного кариотипа. В зависимости от количества, состава и локализации белков, в зависимости от деталей их строения, физико-химических свойств поверхности и активного центра (у ферментов) определяется та или иная структура организма и его свойства. Определенные места на поверхности белков или внутри, образованные закономерно расположенными аминокислотными остатками, формируют центры специфического связывания других веществ и определяют функцию того или иного белка.

Десятки тысяч разнообразных протеинов представлены молекулярными массами от 5000 дальтон до миллионов дальтон. Крупные молекулы построены из нескольких полипептидных цепей, которые называют субъединицами. Например, гемоглобин состоит из двух субъединиц α -глобина и двух субъединиц β -глобина. Часто белки образуют очень сложные комплексы из десятков молекул, которые функционируют как крупные белковые машины. Например, бактериальная рибосома состоит из 55 различных белков и 3 молекул РНК.

Основные функции белков. Сотни функций белков определяются деталями их химического строения и физико-химическими свойствами внутренней структуры и поверхности. Специфические места на поверхности белков или внутри, образованные закономерно расположенными доменами и аминокислотными остатками, формируют центры специфического связывания других веществ и определяют функцию того или иного белка. Многие протеины имеют прочно связанные небольшие молекулы иной природы, которые придают им дополнительные функции. Например, большинство ферментов в своей структуре имеют коферменты небелковой природы, такие как биотин, пиридоксальфосфат, липоамид и др.

Белки могут выполнять многочисленные функции, многие из которых идут с обязательным потреблением энергии. Некоторые функции представлены в Табл.2.1. Клетки растений, грибов, бактерий содержат еще и множество свойственных только им белков, выполняющих специальные функции.

Таблица 2.1. Некоторые функции белков у животных

Класс белков	Примеры	Функция
Ферменты	Пептидилтрансфераза	Катализирует образование пептидной связи при синтезе белков.
	Трипсин	Катализирует гидролиз белков.
	ДНК-полимераза	Катализирует процесс удвоения ДНК (репликация).
	АТФ-синтетаза	Катализирует процесс образования АТФ.
Структурные белки	Актин	Входит в состав миофибрилл, участвует в образовании цитоскелета клетки.
	Миозин	Основной белок мышечного волокна.
	Гистоны	Участвуют в упаковке хроматина и образовании хромосом.
	Тубулин	Образует микротрубочки, которые являются основой цитоскелета клетки.
Гормоны	Инсулин	Активирует процесс утилизации глюкозы клетками.
	Глюкагон	Стимулирует выход глюкозы в кровь.
Защитные белки	Иммуноглобулины (антитела)	Участвуют в инактивации инородных белковых структур (антигенов).
	Фибриноген	Обеспечивает процесс свертывания крови.
Моторные белки	Миозин	Является структурной единицей подвижной нити саркомера миофибрилл.
	Кинезин	Передвигается по микротрубочкам
Токсины	Яд гадюки (липаза)	Разрушает оболочку эритроцитов.
Транспортные белки	Гемоглобин	Транспорт O_2 и CO_2 .
Рецепторные белки	Рецептор инсулина	Играет ключевую роль в регуляции гомеостаза глюкозы.

Некоторые белки сочетают сразу несколько функций, например, транспортные АТФазы объединяют гидролиз АТФ с переносом ионов через мембраны, а миозин обладает АТФазной и моторной активностью.

Конформация, степень активности и функции белков регулируются потреблением энергии и обратимым связыванием с другими молекулами, например, путем присоединения фосфатной группы. Обратимое

фосфорилирование в клетках эукариот обеспечивает управление активностью, структурой и размещением белков, что обуславливает многие стороны метаболизма и функций клеток. Кроме фосфата, в качестве регуляторов выступают ацетил, пальмитиновая кислота, убиквитин и другие молекулы.

Известно, что в клетках существует обширная сеть взаимодействий субкомпонентов и макромолекул. Важнейшими являются взаимодействия белок-белок, белок-липид и белок-НК. Каждый белок клеток животных может взаимодействовать с различными другими молекулами и комплексами, число которых может достигать десятка и более. Этим обеспечивается стабильное скоординированное существование и функционирование клетки как монолитного тела.

Таким образом, практически все структуры и функции клеток и организмов обусловлены белками и их свойствами. Без белков жизнь была бы невозможной. Однако все перечисленные свойства и функции белков возможны *только в жидкой водной среде*. Поэтому замораживание биообъектов полностью исключает все свойства и функции, но все-таки сохраняет структуру и организацию белков. *Относительная структурно-функциональная устойчивость белков при криоконсервировании обуславливает возможность обратимого замораживания, восстановления свойств и функций биообъектов и возвращения их к жизни.*

2.6. Нуклеиновая основа

Жизнь имеет нуклеиновую основу. НК обладают генетической информацией и обеспечивают основное свойство жизни – размножение и развитие. *Нуклеиновые кислоты (НК)* – биологические полимеры, мономером которых является нуклеотид. НК – уникальные молекулы, необходимые любому организму (от вирусов до человека) для хранения, использования и передачи генетической информации. Участки нуклеиновых кислот образуют гены, которые обуславливают и регулируют синтез белков, а те, в свою очередь, определяют характер обмена веществ, особенности метаболизма, закономерности роста и развития, различные функции и др.

В основе размножения всех организмов лежит механизм репликации ДНК и передачи её следующим поколениям. Потоки генетической и наследственной информации обуславливают упорядоченные процессы превращения органических веществ, организацию окружающего материального пространства, что лежит в основе жизненных явлений. НК являются основой геномов. Малейшие нарушения в структуре НК могут повлечь за собой неблагоприятные последствия для организма или его гибель.

Имеется две основные группы указанных соединений: ДНК и РНК (Рис. 2.5). Молекулы ДНК и РНК состоят из химически очень похожих нуклеотидов, образующих гигантские молекулы. Нуклеиновые кислоты представляют собой биополимеры, мономерами которых являются

нуклеотиды. Каждый нуклеотид состоит из молекулы фосфорной кислоты, моносахарида (рибозы у РНК или дезоксирибозы у ДНК) и одного из пяти азотистых оснований: аденин (А), гуанин (Г), цитозин (Ц) и тимин (Т) или урацил (У, только для РНК).

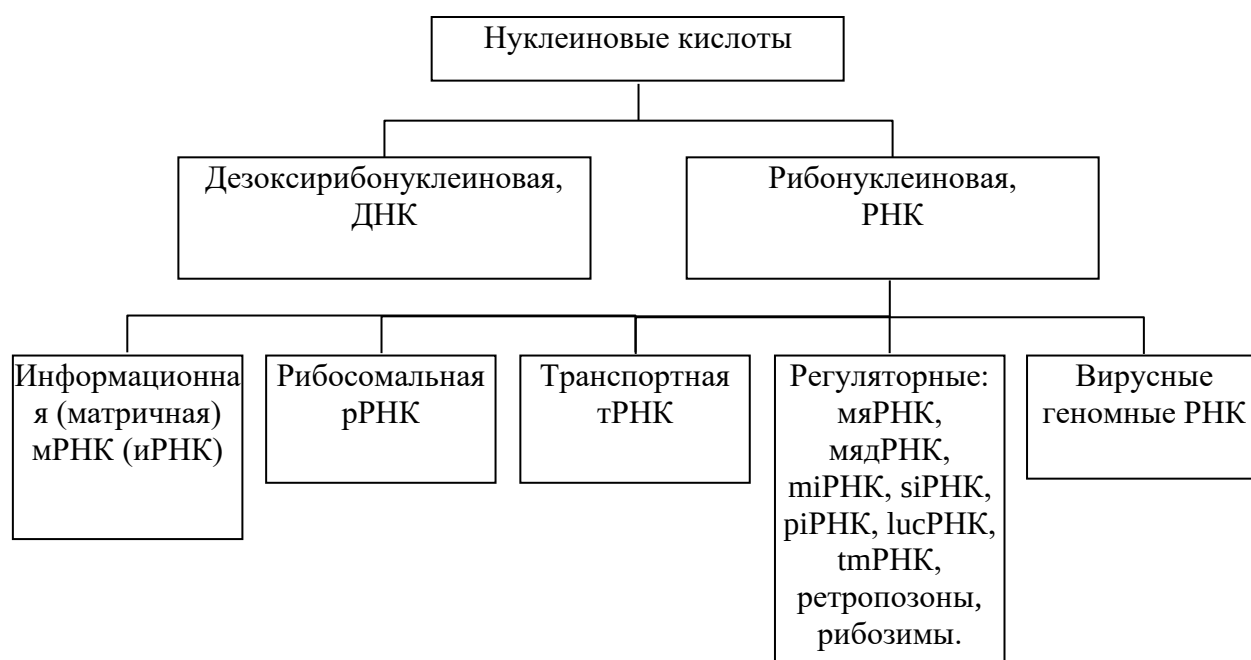


Рис. 2.5. Основные группы нуклеиновых кислот

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота. ДНК – это очень длинная, закрученная в спираль макромолекула, имеющая большую молекулярную массу (Рис. 2.6). Она является полимером, состоящим из сотен тысяч линейно соединенных между собой нуклеотидов, образующих цепи (Рис.2.7). Последовательностью нуклеотидов в ДНК (генетический код) записывается генетическая информация. ДНК выполняет следующие основные функции: а) хранение генетической информации на основе генетического кода; б) передача генетической информации следующим поколениям на основе репликации; в) контроль развития, метаболизма и функций на основе регуляции синтеза белков.

Структура ДНК довольно прочная и стабильная. По реакционной способности ДНК относится к группе химически неактивных веществ. Этим обеспечивается стабильность наследственной информации, постоянство генотипов и фенотипов живых организмов на протяжении тысячелетий. В молекуле ДНК можно выделить *первичную структуру* – последовательность нуклеотидов в цепи, *вторичную структуру* – две комплементарные антипараллельные цепи, соединенные водородными связями, и *третичную структуру* – двойную спираль. Следует учитывать, что: а) геометрия спирали ДНК зависит от последовательности нуклеотидов; б) большая часть ДНК не кодирует белков или РНК; в) каждый ген – это сложная функционально-активная единица, которая регулирует синтез РНК; г) в молекуле ДНК информация закодирована в *линейной* последовательности нуклеотидов. Она используется для образования такой же (комплементарной)

линейной последовательности РНК, а затем линейной последовательности аминокислот.

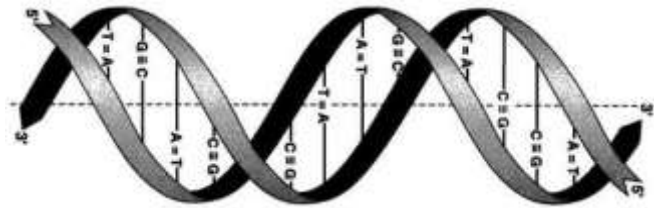


Рис. 2.6. Двойная спираль ДНК. Молекулы ДНК состоят из двух антипараллельных цепей с комплементарной последовательностью нуклеотидов. Цепи закручены относительно друг друга в правозакрученную спираль так, что на один виток приходится примерно 10 пар нуклеотидов.

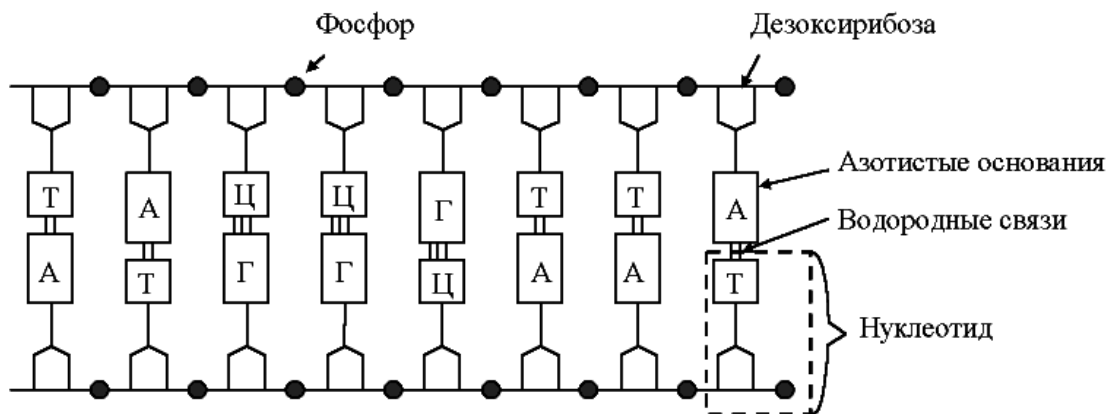


Рис. 2.7. Схематическое строение молекулы ДНК. Молекула ДНК состоит из двух длинных полимерных цепей, спаренных благодаря водородным связям между азотистыми основаниями нуклеотидов. Каждая цепь представляет собой полинуклеотид, состоящий из множества комбинаций четырех нуклеотидов А, Т, Г, Ц. Цепи ДНК соединены между собой на основе принципа комплементарности – последовательность нуклеотидов одной цепи строго соответствует другой. На этой основе осуществляются ключевые жизненные процессы – репликация, транскрипция, рекомбинация и репарация.

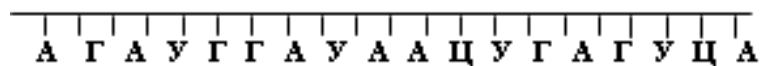
Молекула ДНК обладает уникальными свойствами: а) ДНК способна к удвоению. Этот процесс называется *репликацией*. У эукариотов он происходит во время S-периода интерфазы клеточного цикла. «Упакованные» копии ДНК в виде *хромосом* поровну распределяются в дочерние клетки в период митоза или мейоза. Это обеспечивает процесс размножения; б) ДНК реализует свою генетическую информацию в процессе *транскрипции*. При этом на генах ДНК образуются различные молекулы РНК, которые непосредственно участвуют в синтезе белков в процессе

трансляции. Эти процессы обеспечивают рост, развитие и метаболизм; в) время от времени ДНК способна к *мутации* – изменению структуры генов, что обеспечивает *изменчивость и эволюцию*; г) молекулы ДНК способны к *рекомбинации* состава генов, что обеспечивает разнообразие гамет и появление потомков с новыми признаками; д) в случае повреждения ДНК может восстановить себя. Этот процесс называется *репарацией*. Благодаря этому генетическая информация стабильно поддерживается на протяжении тысяч поколений; е) структура ДНК *очень прочная и стабильная*. Этим обеспечивается стабильность наследственной информации, постоянство генотипов и фенотипов живых организмов на протяжении тысячелетий.

РНК - *рибонуклеиновая кислота*. У прокариотических и эукариотических организмов генетическая информация закодирована в молекуле ДНК. Однако ДНК не принимает непосредственного участия в жизнедеятельности клеток. Роль *посредников* в передаче информации от ДНК к цитоплазме выполняют рибонуклеиновые кислоты. Передачу генетической информации, хранящейся в ДНК, через синтез РНК в полипептидные цепи белков можно представить в виде схемы: ДНК → РНК → белок. Одна из цепей ДНК служит *матрицей* для молекул мРНК, которые, в свою очередь, являются матрицами синтеза белков, либо входят в состав рибосом, либо переносят аминокислоты.

Молекулы РНК построены подобно одной из цепей ДНК, т.е. являются полимерами и состоят из нуклеотидов, последовательно связанных между собой. Молекулы РНК одноцепочечны, но могут в отдельных областях образовывать внутри себя комплементарные связи (Рис. 2.8).

1.



2.

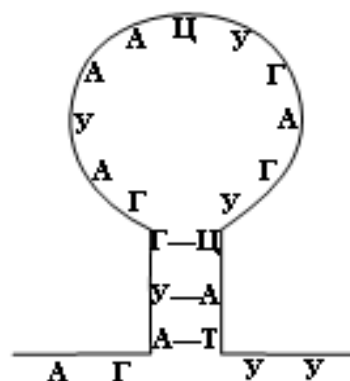


Рис. 2.8. Схема строения РНК. 1 – это молекулы, построенные из большого числа тех же нуклеотидов. Вместо Тимина (Т) в молекуле РНК используется Урацил (У). 2 – В результате комплементарного спаривания нуклеотидов у разных участков той же цепи могут образовываться различные двухцепочечные фрагменты РНК (шпильки), различные формы и пространственные структуры.

На основании молекулярной массы, структуры и функции различают 4 основных типа РНК: мРНК (матричная, или информационная), рРНК (рибосомальная), тРНК (транспортная), а также регуляторная РНК (Табл.1.2). Рибосомальные и транспортные РНК составляют около 98 % всех молекул РНК. Все виды РНК образуются на генах матрицы ДНК на основе генетического кода по принципу комплементарности. Все они являются посредниками передачи генетической информации от ДНК на белки (Табл. 2.2).

Таблица 2.2. Сравнительная характеристика основных типов нуклеиновых кислот

Название	Тип молекулы	Локализация в клетке	Функции
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	Макромолекула в форме двойной спирали со многими тысячами субъединиц (нуклеотидов)	В основном в ядре, а также в митохондриях и хлоропластах	Действует как хранилище закодированных инструкций для синтеза всех белков, необходимых клетке. Способна к репликации, транскрипции, мутации и репарации.
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота	Однонитевой линейный полимер с тысячами субъединиц	В ядре и цитоплазме, в особенности на рибосомах.	Образована по подобию одной из цепей ДНК, несет закодированные инструкции для синтеза одного или более белков
рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота	Однонитевой разветвленный полимер с тысячами субъединиц. Молекула тесно связана с белками рибосом.	Только в рибосомах	Совместно с белками образует рибосомы. Обеспечивает правильное расположение мРНК на поверхности рибосомы
тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота	Однонитевой полимер состоит из 70-90 нуклеотидов. Имеет форму клеверного листа	В нуклеоплазме и цитозоле	Все виды тРНК действуют как переносчики аминокислот
Регуляторные РНК	Однонитевые полимеры, часто образующие спаренные фрагменты. Состоят от 20 до нескольких тысяч нуклеотидов	Преимущественно в нуклеоплазме	Регулируют активность отдельных генов и транскриптов иРНК, удлиняют линейные хромосомы, блокируют участки генома

мРНК. Образуется как комплементарная цепь на структурных генах ДНК (мРНК генах). Переносит генетическую информацию из ядра в цитоплазму, где совместно с рибосомами образует белок-синтетический

комплекс. Ее называют также *информационная РНК*, т. к. она несет в себе генетическую информацию для построения полипептида. Молекулы матричной РНК содержат от 300 до 3000 нуклеотидов, строгая последовательность которых предопределяет генетический код. Код триплетен, т. к. последовательность 3-х нуклеотидов кодирует одну аминокислоту.

рРНК. Молекулы рибосомальной РНК являются наиболее крупными молекулами, содержащими до 5000 нуклеотидов. Они имеют линейную разветвленную структуру, а также петли различной формы за счет комплементарного спаривания оснований. Образуются рРНК на специфических участках ДНК – (рРНК генах), которые локализуются в ядрышке. рРНК входят в состав малой и большой субъединиц рибосом (совместно с белками). В цитоплазме субъединицы объединяются на цепи мРНК и образуют рибосомы.

тРНК. Образуется на специфических участках ДНК (тРНК генах). Одноцепочечная молекула образует структуру, похожую на клеверный лист. Основная функция – транспорт аминокислот к местам синтеза (рибосомам).

Регуляторные РНК участвуют в разнообразных процессах регуляции информационно-генетических процессов.

Кроме основных групп РНК обнаружены также молекулы, не участвующие непосредственно в синтезе белков. Их назвали *риборегуляторами*, так как они, обладая способностью к катализу, участвуют в регуляции транскрипции, сплайсинга, трансляции, модулирования функций белков и их пространственной конформации в клетке. К этой группе относятся: *малые ядерные РНК (мяРНК), малые ядрышковые РНК (мядРНК), микроРНК (miРНК), малые интерферирующие РНК (siРНК), пивиРНК (piwiРНК), длинные некодирующие РНК (lncРНК), транспортно-матричные РНК (tmРНК) и рибозимы*. Особое место занимают *вирусные геномные РНК*: они могут быть двухцепочечными, выполнять роль первичной матрицы, иметь не только линейную, но и кольцевую форму.

Молекулы РНК, обладающие каталитической активностью, называют *рибозимами*. Существование рибозимов указывает, что именно РНК могла быть основой для происхождения жизни, еще до появления ДНК и ферментов. В самом деле, рибозимы способны не только нести генетическую информацию, но и вдобавок к этому катализировать химические реакции и регулировать многие молекулярные процессы.

Таким образом, считается, что нуклеиновые кислоты являются основой жизни. Жизнь базируется на уникальных свойствах НК, в первую очередь, владеть и оперировать информацией в составе геномов. Главная молекула жизни ДНК является хранителем и поставщиком генетической информации. Благодаря ее использованию живые организмы и клетки размножаются, растут, дифференцируются и функционируют. По аналогии со стволовыми клетками, ДНК можно также назвать *стволовыми молекулами* (Рис. 2.9), так как они являются родоначальниками всех остальных триллионов органических молекул, из которых строится и благодаря которым

функционирует организм. Три основных вида РНК являются посредниками извлечения и использования этой информации, что реализуется через транскрипцию и синтез белков. Из белков строятся структуры клеток, органы, тела разнообразных живых организмов, белки также обеспечивают множество свойств и функций живых тел. В данном случае поток генетической информации переносится путем транскрипции с ДНК на РНК, а затем транслируется на белки и признаки организмов.

При размножении генетическая информация дублируется путем репликации ДНК, а затем, в результате митоза или мейоза, передается дочерним организмам, что обеспечивает процесс размножения. В данном случае генетическая информация становится *наследственной*. Это еще один поток информации, направленный от материнских ДНК к дочерним ДНК.

Отмеченные два потока генетической информации являются определяющими для существования живых организмов, а в их основе лежат свойства нуклеиновых кислот. Итак, молекулы нуклеиновых кислот являются субстратом жизни, материальной и информационной основой единства всего живого.

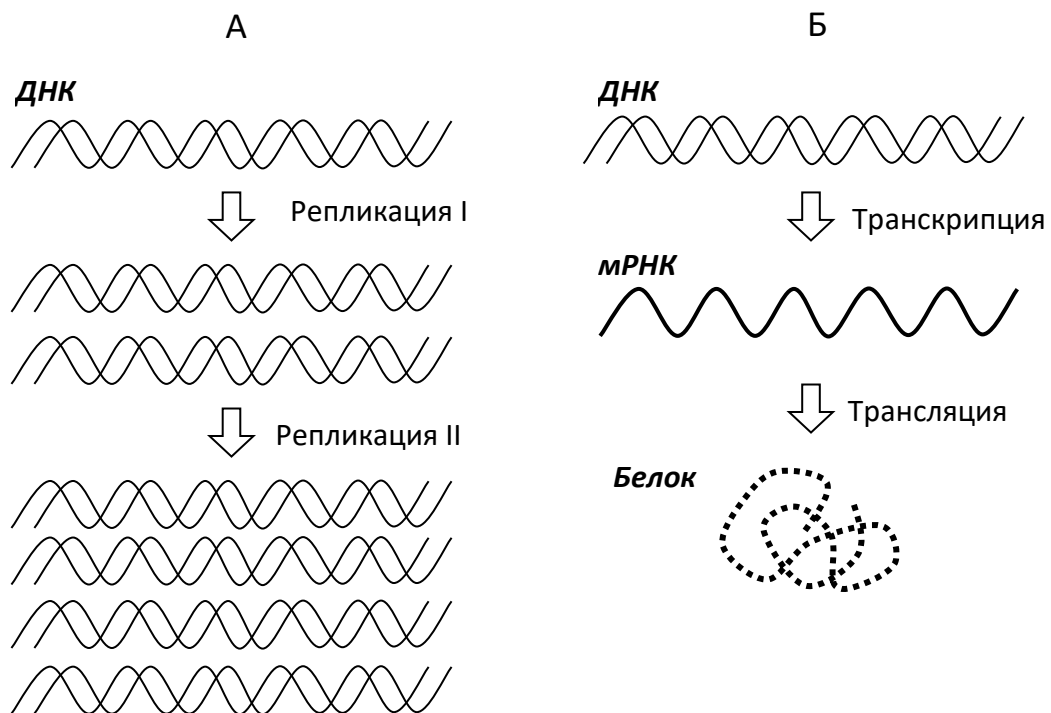


Рис. 2.9. Нуклеиновые кислоты – ствольные молекулы клеток.

А. Молекулы ДНК обладают уникальной способностью к неограниченному воспроизведению. На этой основе образуется «ствол размножения живых тел» (ствол репликации).

Б. Молекулы ДНК являются родоначальниками РНК и белков, посредством чего обуславливают появление всех необходимых молекул в клетках. Так образуется «ствол формирования живых тел» (ствол экспрессии).

Таким образом, нуклеиновые кислоты – уникальные молекулы, необходимые каждой клетке для хранения, трансформации и передачи генетической информации. НК лежат в основе размножения, обеспечивают процессы синтеза белков, а этим, в свою очередь, определяются характер метаболизма, закономерности роста и развития, явления наследственности и изменчивости. Но все перечисленные свойства и функции НК реализуются *только в жидкой водной среде*. Поэтому замораживание биообъектов полностью останавливает все процессы и функции генетического материала. Однако молекулы нуклеиновых кислот сами по себе являются довольно устойчивыми к действию замораживания и могут полностью восстанавливать свои функции после отогрева, возвращая к жизни криоконсервированные клетки или организмы.

2.7. Информационная основа

Живые организмы являются высокоорганизованными открытыми системами, существующими на основе обмена с внешней средой материей и энергией. Однако в последнее время исключительное значение для явления жизни придается роли информации, на основе которой организмы зарождаются, развиваются, выживают, совершенствуются и взаимодействуют с внешней средой. Отметим несколько основных потоков информации в биологических системах.

1. Потоки внешней информации.

Организмы и клетки существуют в океане информации внешнего материального мира. Абсолютно всё, окружающее нас, несет информацию, причем бездну информации. Например, это могут быть разнообразнейшие информационные ресурсы, такие как:

Corporation USB
DISK
%Ä 溫
ā耀 ∪ ÄŲPзк@□ё案□耀È獵業𪛗!?!††单*鏹𪛗†††††† ∪ ∞
°b
└踎盞# 𪛗□À招 倭 眇TELóH𪛗 卜𪛗𪛗𪛗𪛗 𪛗𪛗

Ä2 °埤2 й информации. Только та часть информации, которую могут воспринять, на которую обычно имеются специальные анализаторы или рецепторы, а также внутренняя система анализа и использования этой информации. Такую специфическую систему восприятия и анализа смысловой информации в живых системах можно называть *биотезаурус*. (Термин *тезаурус* употребляется в теории информации для обозначения совокупности всех сведений, которыми обладает субъект). Разные типы и виды организмов имеют особенности организации тезауруса, а значит, обладают и особенностями восприятия и обработки как качества, так и количества информации. Они приспособляются и живут в тех

информационных условиях, которые соответствуют их тезаурусу и обеспечивают их выживание. Воспринятую информацию организмы способны анализировать и адекватно на нее реагировать.

В основе восприятия и обработки информации лежит свойство *раздражимости и возбудимости*. Последующее приспособление обеспечивается физиологическими и поведенческими реакциями, изменением активности или образованием новых, нужных в данных условиях ферментов и других макромолекул. В итоге адекватная реакция на сигналы внешнего мира позволяет приспособиться и выжить в изменяющихся условиях среды.

2. Потоки внутренней информации.

а) *Генетическая информация*. Генетическая информация хранится в молекулах ДНК в виде генетического кода – строгой последовательности триплетов нуклеотидов. Эта информация используется для развития и стабильного длительного поддержания структурно-функциональной организации организмов и клеток как систем. Информация переписывается с ДНК на молекулы РНК, которые обеспечивают синтез необходимых структурных белков и ферментов. Образованные белки обуславливают проявление определенных свойств клеток. Иными словами, в данном случае поток информации в клетках направлен от ДНК к признаку: $ДНК \rightarrow РНК \rightarrow \text{белок} \rightarrow \text{признак}$. Преобразование и передача информации обеспечивается процессами репликации, транскрипции, трансляции и последующих этапов экспрессии. На основе генетической информации основываются главные жизненные процессы: размножение, рост, развитие, дифференцировка, метаболизм и функции.

а) *Молекулярная информация*. Внутриклеточные структуры как элементы сложной системы взаимосвязанно и синхронно функционируют благодаря регуляции разнообразными биологически активными молекулами. Они несут сигналы о включении или выключении метаболических путей и циклов, переносе веществ, активации или ингибировании ферментов. Например, имеется несколько специальных белковых факторов, регулирующих синтез белков, а конечные продукты биохимических циклов обычно являются аллостерическими регуляторами активности ключевых ферментов в метаболических цепях.

в) *Информация упорядоченности*. Очевидно, что сама упорядоченность внутреннего пространства клеток является сложной информационной системой. Заранее заданная и передающаяся по наследству при делении клеток, эта упорядоченность цитоплазмы структурно-информационно обуславливает физико-химические условия для протекания стандартных биохимических и биофизических процессов.

Потоки внутриклеточной информации организуют и обеспечивают слаженную работу комплексного содержимого тела клетки как *единого целого*.

3. Потоки межклеточной информации.

В многоклеточный организм млекопитающего входят сотни

разнообразных клеток. Они образуют разные специализированные, пространственно специфически расположенные группы. Эти клетки образуют ткани, органы и их функциональные компоненты. Огромное количество клеток многоклеточного организма нуждается в обмене информацией для координации разнообразных метаболических и физиологических процессов, процессов деления, роста и т.д.

Различают следующие способы межклеточной сигнализации:

а) дальняя сигнализация *через жидкости внутренней среды* с помощью секретируемых специальными клетками активных молекул. Ее носителями являются, в частности, гормоны. Они разносятся кровью и действуют на клетки, расположенные в различных частях организма. У растений аналогичные функции выполняют фитогормоны – соединения, синтезируемые не специализированными железами, а практически всеми тканями, но в строго определенных условиях;

б) контактная сигнализация расположенных рядом клеток *с помощью специальных сигнальных молекул*. В данном случае клетки выделяют локальные химические медиаторы (нейромедиаторы, иммуномодуляторы, интерлейкины, простагландины), которые поглощаются и разрушаются так быстро, что успевают подействовать только на ближнее окружение клетки-продуцента. Контактная сигнализация *через щелевые соединения* соседних клеток представлена в сердечной мышце, где все кардиомиоциты, благодаря этому, имеют тесный функциональный контакт. Это обеспечивает синхронность и определенную силу сокращения. Наконец, контактная химическая сигнализация лежит в основе функционирования *химических синапсов* – преобладающего типа межклеточных контактов нервной системы;

в) электрическая сигнализация функционирует в нервной системе, где прохождение сигнала в пределах единичной клетки (нейрона) регулируется электрическими механизмами, а передача возбуждения от клетки к клетке может происходить через химический, электрический или комбинированный синапс.

Во всех перечисленных случаях сигналом для клетки являются химические вещества. Это молекулы, имеющие определенные структуры. Даже для нервной ткани, генерирующей и проводящей электрические сигналы, характерно, что на заключительном этапе контакта с клеткой-мишенью электрический сигнал преобразуется в химический. Химические сигнальные молекулы после их секреции и эффекта обычно быстро разрушаются.

Не все клетки многоклеточных организмов реагируют на химические сигналы, а только те, которые имеют специальные *рецепторы*. Эти рецепторы связывают сигнальную молекулу и вызывают ответ.

Протоки межклеточной информации обеспечивают работу миллиардов отдельных клеток организма как единой системы.

4. *Потоки наследственной (генеалогической) информации.* Кроме внутриклеточного генетического потока информации, жизнь связана с хранением и использованием информации в сменяющихся поколениях

клеток и организмов. В данном случае генетическая информация становится наследственной. Таким образом, еще один информационный поток направлен от ДНК одной клетки к ДНК дочерней клетки, от одного организма – к другому организму. Этот поток информации связан с процессом размножения. Он обеспечивается *репликацией* молекул ДНК материнской клетки, образованием хромосом, процессом равномерного распределения наследственного материала между дочерними клетками:

$$\text{ДНК} \xrightarrow{\text{репликация}} \text{две дочерние ДНК} \xrightarrow{\text{митоз}} \text{два генома} \xrightarrow{\text{цитокинез}} \text{две дочерние клетки.}$$

Этот поток информации, направленный от ДНК к ДНК, обеспечивает воспроизводство и длительное существование популяций клеток, организмов и видов.

5. *Внутригеномные и межгеномные потоки информации.* Внутригеномный (имеется в виду диплоидный геном определенного вида организмов) перенос информации происходит во время размножения и связан с бесчисленным множеством вариантов объединения геномов отца и матери, бесчисленными вариантами рекомбинации ДНК во время мейоза, множеством вариантов расхождения хромосом. Кроме этого, различные подвижные генетические элементы способны переносить разнообразные нуклеотидные последовательности в пределах своего генома. Межгеномные потоки информации реализуются при горизонтальном переносе генов от одного вида организмов другому.

Первые три потока информации обеспечивают *жизнь биологических тел*, а четвертый и пятый потоки создают условия для непрерывности жизни, то есть обуславливают *жизнь как природное явление*. Таким образом, живые организмы построены на основе информации, существуют в плотном информационном окружении, а также живут и выживают на основе способности генерировать, воспринимать, анализировать и использовать информацию.

Все потоки внутренней информации основаны на движении молекул и протекают в живых телах, *имеющих жидкое агрегатное состояние*. Естественно, что замораживание приводит к их затвердеванию и прекращению всех вышеописанных процессов. То есть наряду с различными структурно-функциональными нарушениями самих биообъектов при криоконсервировании происходят существенные нарушения информационных процессов, которые могут неполностью восстанавливаться после отогрева. Настоящее означает нарушения процессов регуляции и координации тысяч реакций и сотен процессов в клетках и тканях. Это может быть одной из главных причин того, как при видимом восстановлении структуры неполностью возобновляются функции.

2.8. Каталитическая основа. Ферменты и биокатализ

Жизнь стала возможной и существует до сих пор только на основе биологического катализа. *Катализ* – это феномен увеличения скорости химических реакций веществами, которые кратковременно и многократно принимают участие в этом процессе, но сами не меняются и не расходуются. При этом катализатор облегчает и ускоряет химический процесс, производя внутримолекулярные и внутриатомные перестройки молекул субстратов, «расшатывая» их химические связи, образуя промежуточные нестойкие соединения.

Организмы существуют в довольно узком диапазоне низких температур - от 0 до 40° С. В этих условиях химические связи органических веществ очень устойчивы и многие биохимические реакции просто невозможны. Поэтому протекание всех нужных биохимических и физиологических процессов осуществляется при участии биокатализаторов – *ферментов*. Это белковые молекулы, которые ускоряют скорость биохимических реакций в тысячи раз, однако сами при этом не расходуются и не изменяются, а только испытывают обратимые структурные превращения. Появление биокатализаторов было революционным явлением в происхождении жизни. Вследствие этого в холодном море безмятежного химического хаоса именно ферменты обусловили появление участков быстрого и организованного превращения веществ и энергии, невозможных ни при каких других условиях. Появилась возможность избирательного проявления свойств химического котла планеты, возможность протекания невероятных в данных условиях реакций. Это стало основой организации направленных биологических процессов, образования организованного замкнутого пространства и упорядоченности клеток.

Ферменты – это обладающие специальной структурой белковые молекулы, которые обуславливают и ускоряют биохимические реакции в тысячи раз. Клетки буквально насыщены ферментами. Различают несколько тысяч их разновидностей, причем каждая из них может быть представлена в цитоплазме миллионами копий. Качественный и количественный состав ферментов в клетках контролируется дифференциальной экспрессией генома, что, в свою очередь, обуславливает бесчисленное множество разновидностей клеток, свойств и функций живых тел.

В роли биокатализаторов могут выступать и некоторые небелковые соединения. Например, некоторые типы РНК обладают способностью катализировать гидролиз фосфодиэфирных связей в нуклеиновых кислотах. Их называют *рибозимами*, их роль в биокатализе не столь изучена. Например, у некоторых простейших сплайсинг осуществляется без участия белков – самим РНК-транскриптом. Существование рибозимов дополнительно подтверждает теорию эволюции, так как показывает, что первые формы жизни могли основываться только на РНК, а ДНК, белки и ферменты появились позднее.

Среди бесчисленного множества возможных биохимических реакций в клетках, ферменты избирательно катализируют строго определенные реакции, преобразуют только конкретные вещества (*субстраты*) по

биологически полезному пути и только в нужные *продукты*. Это является принципом управления ферментами всех метаболических и физиологических процессов. Ферменты являются молекулярными инструментами, которые *избирательно* захватывают определенные молекулы из миллионов возможных, быстро и точно их обрабатывают, а затем высвобождают только нужные готовые изделия. Энзимы обычно в тысячи раз крупнее тех молекул, которые они превращают. При отсутствии ферментов биохимические реакции не могли бы осуществляться или протекали бы хаотично и слишком медленно, что не могло бы поддерживать целенаправленные жизненные процессы. Кроме этого, ферменты обуславливают образование и целевое использование энергии. Например, на перенос молекул через мембраны, на мышечное сокращение, на изменение конформации макромолекул, на синтез макромолекул и др. Некоторые ферменты имеют очень сложное строение и являются преобразователями энергии из одной формы в другую. Например, АТФсинтазы в процессе переноса протонов через мембрану преобразуют энергию электрохимического градиента в энергию химических связей АТФ (Рис. 2.10).

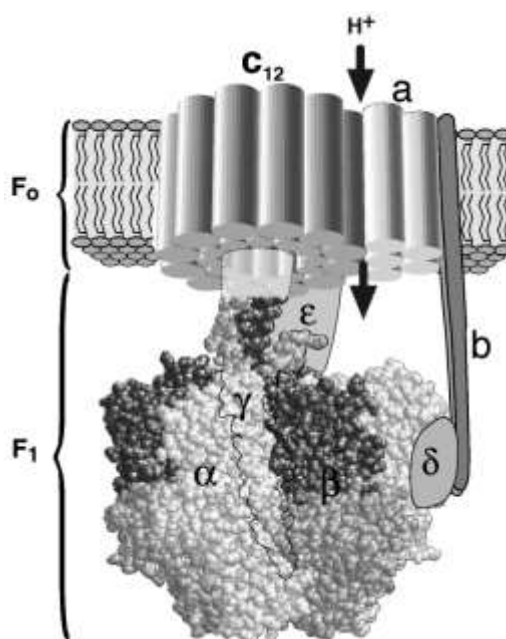


Рис. 2.10. Ферменты – это молекулярные машины, главные инструменты и механизмы живых систем (Н. Wang, G. Oster, 2008). На рис. представлена схема строения одного из сложнейших ключевых ферментов – АТФ-синтазы, непрерывно синтезирующего АТФ. H⁺-транслоцирующая АТФ-синтаза состоит из двух частей: встроенного в мембрану протонного канала (F₀), состоящего из 13 субъединиц и каталитической субъединицы (F₁), погруженной в матрикс митохондрии. «Головка» каталитической части образована тремя α- и тремя β-субъединицами, между которыми расположены три активных центра. Энергия движущихся протонов обеспечивает синтез АТФ. Каталитический цикл подразделяется на три фазы, каждая из которых проходит поочередно в трех активных центрах. Вначале идет присоединение субстратов - АДФ и

Ф к активному центру, затем образуется связь между ними, после чего освобождается конечный продукт реакции – АТФ. При каждом переносе протона через белковый канал F_0 из межмембранного пространства все три активных центра катализируют очередную стадию реакции. Все части сложнейшего нанотехнологического устройства работают согласованно, невероятно быстро, непрерывно и с математической точностью.

Ферменты могут быть *сопрягающими*, если катализируют две или несколько биохимических реакций, связанных таким образом, что общее изменение суммы их свободной энергии обеспечивает протекание процесса в благоприятном, с позиций термодинамики, направлении. В этом случае ферменты сопрягают термодинамически выгодные процессы с реакциями, энергетически не выгодными. Становятся возможными созидательные анаболические процессы. Такой принцип сопряжения биохимических реакций лежит в основе клеточного метаболизма – в основе существования живых тел.

В зависимости от типа катализируемой реакции, десятки тысяч разнообразных ферментов подразделяются на шесть различных классов.

1. *Оксидоредуктазы* – катализируют окислительно-восстановительные реакции.
2. *Трансферазы* – ускоряют перенос функциональных групп атомов между молекулами.
3. *Гидролазы* – катализируют реакции гидролиза.
4. *Лиазы* – катализируют присоединение атомов по двойным связям органических веществ.
5. *Изомеразы* – ускоряют реакции изомеризации.
6. *Лигазы* – катализируют образование двойных связей за счет энергии АТФ.

Каждый класс имеет сотни разновидностей, в зависимости от природы используемых субстратов и химических связей действия. Наблюдается как бы разделение труда среди молекулярных «машин». В каждой клетке есть тысячи разновидностей ферментов, катализирующих свои, строго специфические реакции. Причем разные типы клеток имеют *особенности своего ферментного состава*, что и обуславливает специфику их функционирования. В разных частях клеток локализуются различные ферменты, обеспечивая независимое протекание множества разнообразных биохимических процессов. В органеллах сосредоточены специфические ферменты, поэтому в них протекают только присущие им реакции.

Комплексы ферментов, катализирующих несколько последовательных реакций превращения исходного вещества, образуют полиферментные конвейеры – *метаболические цепи*. Например, это совокупность десятка ферментов гликолиза, совместно локализованных в определенных местах цитозоля, или совокупность восьми ферментов цикла Кребса, локализованных в матриксе митохондрий. Продукт работы первого фермента становится субстратом второго и т.д. За счет этого значительно ускоряются сложные биохимические процессы, не теряются субстраты,

экономится время на доставку необходимых молекул, и биохимические процессы направляются строго по определенным путям превращения, не производя ненужных продуктов. То есть поток материи и энергии направляется строго по определенным «дорогам», упорядоченно «вымощенными» глобулами ферментов. Особенности метаболизма разных клеток обусловлены их специальным ферментативным составом. В свою очередь, разный состав ферментов обусловлен дифференциальной экспрессией генов.

Скорость общего потока материи по метаболическому пути постоянна и контролируется ключевыми ферментами. Один-два ключевых фермента в цепи биохимических реакций регулируют интенсивность образования продуктов. Такие ферменты обычно контролируются со стороны клетки или организма. Другие группы ферментов регулируются количеством продукта по принципу отрицательной обратной связи – малые концентрации стимулируют энзим, а большие тормозят. Таким образом, достигается точная регуляция как скорости и количества, так и направленности химических процессов, а также массивность потоков материи и энергии в клетках.

Многие ферменты являются сложными белками, состоят из белковой глобулы и небелковой части – *кофермента*. Именно кофермент обеспечивает контакт между белком и субстратом катализа, «расшатывает» его химические связи, делает субстрат реакционноспособным. Многие *витамины и атомы металлов* могут служить коферментами. Обычно коферменты расположены в *активном центре* фермента – небольшом участке белковой молекулы, где происходит фиксация субстратов и их превращение в продукты реакции. Многие ферменты имеют также *регуляторный центр* – участок, обеспечивающий регуляцию ферментативной активности при помощи других молекул, например, продуктов реакции.

Появление возможности и увеличение скорости биохимических реакций происходит за счет повышения вероятности взаимодействия молекул, строгой их ориентации в активном центре, а также понижения энергетического барьера реакций. Снижение энергетического барьера происходит за счет: а) максимального сближения субстратов; б) действия на определенные атомы субстрата атомами активного центра; в) изменения энергии электронов.

Ферменты имеют следующие характеристики:

- а) практически все ферменты – глобулярные белки;
- б) они увеличивают вероятность и скорость реакции, но сами в этом процессе не расходуются, хотя в процессе катализа испытывают обратимые конформационные превращения;
- в) ферменты катализируют потенциально возможные реакции;
- г) ферменты обладают специфичностью, то есть конкретный фермент обычно катализирует только один тип реакции;

д) очень малое количество фермента вызывает превращение большого количества молекул субстрата. Один фермент может превратить в продукт миллионы молекул субстрата;

е) ферменты катализируют химические процессы в «мягких» условиях – при нормальном давлении, низкой температуре ($0...+40^{\circ}\text{C}$), нейтральной кислотности среды;

ж) активность ферментов регулируется клеткой и зависит от температуры, давления, кислотности среды, концентрации субстратов, концентрации продуктов;

з) скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна количеству фермента (при насыщении субстрата).

Очевидно, что ферменты выполняют *работу*, в частности, захватывают субстраты, фиксируют их, изменяют свою конформацию, перемещают участки молекул в активном центре и др. Естественно, для выполнения работы необходима энергия. Некоторые ферменты используют энергию фосфорилированных субстратов (например, глюкозо-6-фосфата), другие – энергию АТФ (например, АТФазы). Но вероятно, что многие ферменты являются уникальными белковыми молекулами, которые могут для своей работы использовать энергию теплового движения окружающих молекул, а также энергию тепловых колебаний и флуктуаций собственной молекулы. Молекулярные системы, реализующие этот принцип работы, называют «броуновскими машинами». Это микромеханические конструкции, части которых перемещаются относительно друг друга под влиянием тепловых флуктуаций. В силу структурных особенностей, способностью к перемещению обладают только определенные части макромолекул. Благодаря этому, видимо, и осуществляется избирательность флуктуаций частей молекул ферментов, например, только определенных сегментов активного центра, что обеспечивает работу по обработке субстратов. Таким образом, ферментами может использоваться тепловая энергия системы для быстрых и направленных превращений необходимых веществ.

Кроме этого, следует отметить, что ферменты в своей общественной работе следуют законам термодинамики. Известно, что катализаторы, в том числе и ферменты, – это объекты, которые помогают *самопроизвольным реакциям* протекать быстрее, обеспечивая им более легкий путь, или делая это с помощью механизмов снижения энергетического барьера. Самопроизвольные реакции осуществляются по законам термодинамики и направлены в сторону повышения энтропии, в сторону равновесия. В процессе работы ферменты не изменяют константу равновесия химической реакции, но *увеличивают скорость* ее достижения в данных условиях. Это и есть главное свойство катализаторов. Они лишь быстро приводят реакции к тому же состоянию равновесия, которое было бы достигнуто и без них, но очень медленно. Ферменты позволяют превратить медленные самопроизвольные реакции в быстрые, что, в конце концов, способствует диссипации, повышению энтропии и снижению свободной энергии в системе. То есть реакции общего потока термодинамического разрушения

биосистем подхватываются и ускоряются ферментами. Но в клетках все устроено так, что этот диссипативный материально-энергетический поток, идущий с рассеиванием энергии, одновременно может также значительно ускорять и усиливать процессы, идущие против разрушения. Это осуществляется за счет сопрягающих ферментов и процессов. В случае *сопряжения* достигается одновременное протекание термодинамически разнонаправленных реакций. При этом сопрягающие ферменты трансформируют потенциал самопроизвольных реакций в силу, необходимую для протекания идущих с потреблением энергии анаболических процессов, чем поддерживают упорядоченность и организацию клеток. Сопряжение достигается, главным образом, через посредничество АТФ. Именно таким путем многие ферменты препятствуют достижению термодинамического равновесия, а значит преждевременной гибели клеток и организмов.

Энзимы обладают грандиозными полномочиями и выполняют несколько *глобальных функций*.

1. *Делают возможными* реакции, невероятные при умеренных температурах, повышают вероятность их осуществления от долей процента до всех ста;
2. Обуславливают высочайшую *избирательность* протекания только нужных клетке химических реакций (из биллионов возможных);
3. Обеспечивают *высочайшую скорость и направленность биохимических процессов, регулируют метаболизм*.
4. Ферменты обуславливают появление и проявление всех *функций живых тел*: питания, дыхания, выделения, движения, размножения и т.д.
5. Обеспечивают *получение и целенаправленное, экономное использование веществ и энергии*;
6. *Участвуют в трансформации* одной формы энергии в другую, одного вещества в другое;
7. Являются инструментами и механизмами *трансформации генетической информации* в ее материальное воплощение – живое тело.
8. Обеспечивают энергетически невыгодные реакции синтеза и анаболизма путем их сопряжения с энергетически выгодными реакциями катаболизма, *являются основным инструментом борьбы с энтропией*.

На основе этих свойств ферментов в клетках создаются искусственные негэнтропийные условия, которые характеризуются: а) высокой вероятностью протекания маловероятных процессов; б) избирательным превращением лишь ограниченного количества универсальных молекул, и только в ограниченное количество продуктов; г) потоки материи и энергии направляются строго по функциональным путям. Благодаря этому создается и поддерживается упорядоченность, гомеостаз, функции клеток и организмов. Итак, ферменты – не только ускорители, но и организаторы, и сортировщики, и регуляторы, и снабженцы, и строители, и восстановители молекулярного мира клеток. Появление и существование до сих пор живых тел и Жизни как глобального явления на Земле стало возможно только на основе биологического катализа.

Итак, избирательный биологический катализ является *стратегическим механизмом* протекания практически всех жизненных процессов. Основная заслуга ферментов в проявлении жизни – обеспечение возможности и повышение вероятности осуществления строго определенного набора биохимических и биофизических процессов, необходимых для построения живых тел и их функционирования.

Таким образом, можно утверждать, что основой организации клеток является упорядоченное множество специальных белковых катализаторов, осуществляющих направленные превращения материи и энергии. Не существует ни одного живого тела без ферментов, и никакие проявления жизни невозможны без них. Ферменты – это именно те молекулярные машины, которые через механизм катализа осуществляют невероятные процессы.

Ферменты ускоряют химические реакции в десятки тысяч раз. Принимая во внимание, что повышение температуры на 10°C способствует ускорению скорости химических реакций в 2-4 раза (правило Вант-Гоффа), можно рассчитать, что для ускорения реакции в 10000 раз путем подогрева понадобится температура выше 50000°C ! Теперь можно понять, что фактически делают ферменты: они создают совершенно невероятные условия сверхбыстрого протекания химических процессов в условиях очень низких температур, близких к температуре затвердевания воды и совсем недалеко от абсолютного нуля. *То есть живые тела характеризуются неестественно высокими скоростями избранных реакций при сверхнизких температурах.*

Но следует заметить, что все процессы биокатализа *протекают только в жидкой водной среде*. Замораживание биологических объектов и затвердевание в них воды приводит к устранению условий, необходимых для работы ферментов. Прекращается Броуновское движение молекул, прекращаются их столкновения и взаимодействия, прекращается диффузия, субстраты не попадают в активный центр ферментов, а ферменты теряют способность изменять свою функциональную конформацию. Обрываются все биохимические реакции, останавливается метаболизм и функции. Однако многие ферменты могут восстанавливать свою активность после размораживания живых тел, что является одним из главных условий обратимого замораживания-отогрева.

Важно также отметить, что именно отсутствие жидкой воды является главным фактором полного торможения активности ферментов, а не само понижение температуры как таковой. Например, снижение температуры на 10°C по правилу Ван-Гоффа может лишь уменьшить скорость химической реакции в 2-4 раза, что по сравнению со способностью ферментов ускорять процессы в тысячи раз, не имеет принципиального значения. Главное, что ферменты при этом, если среда остается жидкой, сохраняют свои основные свойства: способность «включать» маловероятные реакции, обеспечивать их специфичность, направленность и регуляцию. Например, арктические рыбы могут благополучно обитать в переохлажденных водах Северного Ледовитого

океана при температурах тела минус 2-4⁰С.

2.9. Клеточная основа

Подавляющее число живых существ имеет клеточную основу строения и функции. С точки зрения структурно-функциональной организации, клетка является сложнейшей биологической системой макромолекул, обладающей высокой упорядоченностью, способной к развитию, поддержанию целостности и размножению. Это подвижная, устойчивая, неравновесная, открытая система, демонстрирующая глубокое единство структуры и функции. Содержимое клетки жидко и настолько динамично, что ее можно считать не столько телом, сколько *непрерывным процессом*. Основой жизни клеток является высочайшая упорядоченность подвижных макромолекул, образующих сложные надмолекулярные структуры (мембраны, органеллы), обладающие определенными функциями. Белковые молекулы являются основными макромолекулами, из которых построены клеточные структуры, ферменты являются основой метаболизма и всех функций. В свою очередь, количественный и качественный состав клетки контролируется и регулируется молекулами ДНК и РНК.

Однако отдельные нуклеиновые кислоты и белки не могут обусловить свойства жизни без специально организованной среды, в которой происходит трансформация информации, энергии и материи. То есть живыми являются не отдельные молекулы ДНК, РНК или белков, а только их система в целом, причем обязательно интегрированная в жидкоколлоидный высокоорганизованный матрикс цитоплазмы клетки. Такой матрикс обеспечивает и контролирует точные направленные перемещения веществ, энергии и информации по молекулярным каналам, а также их управляемое взаимодействие. А структурой и работой самой молекулярной матрицы опосредованно через белки руководит геном. Из вышепредставленного становится понятным, что минимальными составляющими живой системы клеток являются не только НК, белки и вода, но и водно-коллоидная высокоорганизованная жидкая цитоплазма.

Клетка является основой строения прокариотов, одноклеточных, грибов, растений и животных. Но, несмотря на особенности строения, метаболизма и функций клеток разных царств живого мира, все они *гомологичны* – имеют общее происхождение, единый принцип строения и организации (Рис.2.11). Для бактерий, простейших, некоторых водорослей и грибов понятия *клетка, организм и тело* совпадают, так как они являются одноклеточными существами. Огромное количество организмов грибов, растений и животных являются *многоклеточными*, т.к. состоят из тысяч, миллионов или даже триллионов клеток. Сходные по строению и функциям клетки образуют ткани, из тканей формируются органы. Работа триллионов клеток в составе млекопитающих координируется нервной, эндокринной и иммунной системами.

Величина, структура и форма клеток зависят от выполняемых ими

функций. Диаметр большинства клеток животных колеблется от 10 до 100 мкм. Средний диаметр типичной соматической клетки ~ 50 мкм. Минимальные размеры клеток определяются минимальным количеством генов и соответствующих белков. В частности, наименьшие размеры тела (0.3 мкм) у микоплазм, имеющих всего лишь примерно 300 – 500 разнообразных белков. Это, видимо, тот минимум, который необходим для создания и поддержания самой маленькой клетки. Максимальные размеры клеток (примерно 100 – 200 мкм) определяются возможным максимальным расстоянием между молекулами внутри системы, при котором все-таки обеспечивается необходимая вероятность взаимодействия молекул в процессе их перемещения по внутриклеточным каналам и диффузии. Частично эта проблема решается за счет компартментализации клетки – разделения ее на множество маленьких жидких отсеков, где вероятность взаимодействия между молекулами существенно повышается.

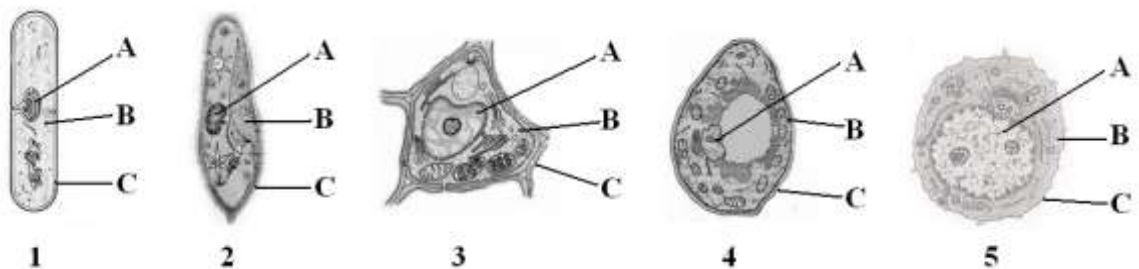


Рис. 2.11. Единый план строения и организации клеток.

1. Клетка бактерии. 2. Клетка простейшего. 3. Клетка растения. 4. Клетка гриба. 5. Клетка животного.

А) Геном (ядро или нуклеус). В) Цитоплазма (цитозоль и органеллы). С) Поверхностный аппарат (мембрана или клеточная стенка). Во всех случаях геном является центром управления жизнью, феном (цитоплазма) – исполнительной системой жизни, поверхностный аппарат – системой изоляции и связи с внешней средой.

Размеры клеток не связаны с величиной организма. Так, клетки печени человека, мышцы и слона имеют примерно одинаковую величину. То есть, величина органов и размеры целого организма животных зависят от числа клеток, а не от их размера. Число клеток, строящих организм, разнообразно: от одной (у одноклеточных) или нескольких сотен (у коловраток и некоторых круглых червей) до многих миллиардов, как у большинства млекопитающих.

В составе ткани или органа каждая клетка, в большей степени, живет своей жизнью, так как ее организация и метаболизм направлены, прежде всего, на поддержание своего гомеостаза. Это требует большей части всех энергетических затрат клетки, и значительно меньше энергии (в зависимости от специализации) клетки тратят на потребности органа или организма. Таким образом, многоклеточные организмы правомерно рассматривать как сложнейшие сообщества мельчайших живых тел, объединенных с целью взаимовыгодного существования. Это качественно новое состояние

существования клеток в составе огромной специализированной колонии. Все клетки действуют согласованно, подчиняются интересам организма, поддерживают его целостность и обеспечивают многообразные функции. Цельный организм и все его взаимосвязанные составляющие части и клетки регулируются и направляются генетическими программами его генома.

Внутреннее содержимое клеток разделено биомембранами на отдельные структурно-функциональные части (компарменты). Эти дифференцированные участки клетки имеют особое строение, молекулярный состав, выполняют специальные функции и называются *органеллами* (Табл. 2.3).

Таблица 2.3. Основные клеточные органеллы и их функции

Клеточная структура	Описание	Основные функции
Ядро	Большая сферическая структура, окруженная двойной мембраной, содержит нуклеоплазму, хроматин и ядрышко.	Хранение генетической информации в виде ДНК; передача наследственной информации потомкам; контроль метаболической активности.
Цитоплазма	Состоит из основного вещества (цитозоль) и находящихся в нем органелл.	Обеспечивает протекание большинства метаболических процессов.
Клеточная мембрана	Внешняя амфиоплярная оболочка клетки, состоящая из липидов и белков.	Обособление и защита клетки от внешней среды; регуляция проницаемости в клетку и обратно всех веществ; связь с другими клетками; распознавание химических сигналов.
Шероховатая ЭПС	Комплекс мембранных трубочек в цитоплазме, усеянных рибосомами.	Синтез, модификация, хранение и транспортировка белков.
Гладкая ЭПС	Система мембранных трубочек и везикул в цитоплазме клеток.	Синтез, хранение, транспортировка липидов и углеводов. Детоксикация.
Аппарат Гольджи	Система плоских мембранных дисков в цитоплазме клеток.	Накопление и модификация белков, липидов и углеводов. Хранение и транспортировка макромолекул. Образование лизосом.
Лизосомы	Сферические структуры, покрытые мембраной. Содержат гидролитические ферменты.	Внутриклеточное пищеварение основных классов органических веществ. Фагоцитоз и обезвреживание вредных частиц. Рециклизация основных макромолекул.
Митохондрии	Продолговатые овальные структуры, покрытые двойной мембраной. Внутренняя мембрана образует кристы.	Окисление органических молекул до CO_2 и H_2O ; извлечение энергии и запасание её в виде АТФ.
Пероксисомы и глиоксисомы	Мембранные мешочки, содержащие окислительные ферменты.	Разрушение перекиси водорода.
Везикулы	Мембранные пузырьки, заполненные продуктами	Обеспечивают перенос ферментов, полисахаридов, гликопротеинов и т.п.

	деятельности ЭПС и АГ	между компонентами клетки, а также их экскрецию во внешнюю среду.
Рибосомы	Макромолекулярные комплексы, состоящие из двух субъединиц, содержащих рРНК и белки.	Обеспечивают синтез белков.
Цитоскелет	Гибкая, подвижная сеть из белковых нитей, состоящая из микротрубочек, микрофиламентов и промежуточных филаментов.	Поддержание формы и объема клетки, движение клетки и клеточных органелл; связывание специфических ферментов; прикрепление к другим клеткам и поверхностям.
Центриоли	Парная структура, образованная короткими микротрубочками.	Образование веретена деления, нитей цитоскелета.

Итак, клетки – это «жидкие», очень сложные структурно-функциональные единицы жизни; мельчайшие организмы, представляющие собой сложноорганизованные биологические системы, способные к созданию и поддержанию упорядоченности, преобразованию и целевому использованию материи, энергии и информации, а также непрерывному размножению. Это единицы строения и функций всего множества организмов, микроскопические полуавтономные живые тела, представляющее собой динамичное единство взаимодействующих макромолекул в жидкой водной среде, которые под управлением генома формируют высокоорганизованную самоподдерживающуюся биологическую систему. Учитывая неограниченную сложность и мультифункциональность клеток, основанные на упорядоченности расположения молекул в жидкой водной среде, следует ожидать столь же огромного количества структурных и функциональных повреждений после размораживания криоконсервированных биологических объектов.

2.10. Системные основы

Все живые существа являются высокоорганизованными открытыми системами с уникальными термодинамическими и информационными свойствами. *Система* – это организованное целое, составленное из многих взаимосвязанных элементов, реально или условно выделяемых из чего-либо. Говоря о биосистемах в данном разделе, мы будем иметь в виду только живые тела – клетки и многоклеточные организмы. Ведь очевидно, что далеко не все биосистемы являются живыми. Например, эндоплазматическая сеть клетки является биосистемой, но далеко не автономным телом.

Клетка является сложной системой и состоит из большого количества строго упорядоченных, разнообразных, взаимодействующих молекул. Молекулярные комплексы образуют органеллы, которые являются составляющими частями клеточной системы. Клеточные органеллы структурно и функционально связаны между собой в жидкой коллоидной среде, обмениваются между собой материей, энергией и информацией.

Внутреннее пространство клетки поделено биомембранами на компартменты: ядро, митохондрии, лизосомы и др., где происходят только специфические реакции.

Многоклеточным организмам также свойственно несколько уровней организации. Они состоят из частей тела, органов, тканей, клеток, межклеточных структур, жидких сред и т.д. Причем, низшие уровни организации обуславливают структуру и функции более высоких, которые, в свою очередь, контролируют низшие уровни. Жизнедеятельность клеток может осуществляться только в условиях скоординированной связи между ними. Клетки постоянно взаимодействуют друг с другом и с окружающей средой. Между средой и клетками постоянно происходит обмен материей, энергией и информацией. Процессы взаимодействий клеток между собой обеспечивают упорядоченное во времени и пространстве, координированное протекание всех метаболических и физиологических процессов как в них, так и в многоклеточных организмах.

Организмы и клетки должны постоянно обмениваться веществами и энергией с внешней средой, заменять износившиеся и разрушенные структуры на новые. В противном случае в них со временем нарушится высокий уровень упорядоченности, что приведет к гибели системы. Такие термодинамические системы, которые постоянно получают приток материи и энергии извне, называются *открытыми системами*. С термодинамической точки зрения, организм животного представляет собой высокоорганизованную открытую неравновесную систему, которая непрерывно взаимодействует с внешней средой. То есть превращает химическую энергию пищи в энергию биохимических и физиологических процессов, а неиспользованную энергию и неорганизованную материю выделяет в виде теплового потока и отходов во внешнюю среду.

Системы обладают рядом физических характеристик, которые называются *параметрами*. Например, живые организмы отличаются температурой, размерами, объемом, качественным и количественным составом белков и многим другим. Совокупность параметров, свойственных данной системе, определяет ее термодинамическое состояние. Изменения одного или нескольких из них называется термодинамическим процессом. Если параметры могут обратимо изменяться под действием внешних сил или самопроизвольно, то такие системы называют неравновесными. Все биологические системы *неравновесные*, то есть могут самопроизвольно или под действием различных факторов изменяться, временно меняя ход процессов и состояние всей системы.

Живые тела представляют собой своеобразные «возбужденные» системы, так как их высокая структурная организация обладает большой внутренней энергией. Эта внутренняя энергия постоянно рассеивается в ходе метаболизма и неуправляемого термического разрушения системы по причине хаотического теплового движения молекул. Это значит, что биосистемы являются *диссипативными* – в них постоянно происходят процессы перехода энергии упорядоченного движения в хаотическое.

Следовательно, самопроизвольные процессы в живых системах в любой момент связаны с повышением энтропии, связаны с разрушением. Поэтому для того, чтобы выжить, биологические системы искусственно должны поддерживать свою организацию постоянным притоком свободной энергии и необходимых веществ. Малейшие изменения в обеспечении энергией или материей приводят к необратимому нарушению живых систем. Итак, макромолекулы и их комплексы при температуре жизни довольно лабильны и неустойчивы. Организация живых систем сохраняется при этих температурах только благодаря анаболическим процессам, которые непрерывно устраняют хаотически возникающие дефекты, связанные с тепловой и другими видами деструкций. Значит, живые системы на основе вложенной в них генетической информации непрерывно работают против собственного разрушения.

Организмы, хотя и неравновесные, но все-таки довольно *устойчивые системы*, то есть их параметры остаются неизменными в течение определенного промежутка времени. Как мы уже говорили, это обеспечивается постоянным обменом с внешней средой материей и использованием свободной энергии. Причем в сформировавшемся организме потребление материи и энергии соответствует их утилизации и выходу. Например, живая система должна постоянно снабжаться такими компонентами, как вода, соли, кислород, различные органические вещества, так как организм без них не может существовать в связи с постоянным их использованием. Одновременно наружу должны выводиться продукты жизнедеятельности, такие как CO_2 , вредные метаболиты и теплота.

Биосистемы являются *самоорганизующимися*, так как благодаря целенаправленному использованию свободной энергии и материи, поступающей в систему, происходит образование упорядоченных функционирующих структур. Процессы самоорганизации биологических систем контролируются генетическими программами. Это особенно заметно при эмбриогенезе, когда из одной клетки в результате генетически детерминированных процессов морфогенеза и дифференцировки за короткий промежуток времени возникает сложный высокоупорядоченный организм.

Живые системы являются *иерархическими*, потому что имеют несколько уровней организации, каждый из которых взаимосвязан и зависим от предыдущего. Молекулярно-генетический уровень через определенные процессы обуславливает организацию и функционирование клеток, взаимодействующие клетки устанавливают организацию и функции тканей и органов, взаимозависимые и взаимодополняемые системы органов и тканей образуют организм. В организме все взаимосвязано в одном пространстве и контролируется специальными системами и процессами.

Биологические системы являются *кибернетическими*, так как функционируют и регулируются на принципах генерации и использования информации. Кибернетическая система – это организованная и упорядоченная совокупность взаимосвязанных и взаимодействующих элементов системы, способных генерировать, воспринимать, запоминать,

перерабатывать и обмениваться информацией. Например, живые тела воспринимают информацию внешней среды, обрабатывают ее и адекватно реагируют.

Организмы – очень *динамичные системы*, существующие на основе постоянного движения и работы элементов, их составляющих. Организмы являются эволюционирующими системами. Развитие живых систем, в принципе, вероятно и нелинейно, но в конкретных случаях динамика развития организма приобретает линейность на основе генетических программ и избирательно катализируемых процессов.

Живые системы обладают механизмами *саморегуляции* и способностью к *регенерации*, что поддерживает их целостность и постоянство внутренней среды – гомеостаз. Поддержание внутренней среды системы обеспечивает стабильность метаболических и физиологических процессов и относительную независимость от внешней среды. При изменении условий внешней и внутренней среды организм быстро приспосабливается к ним благодаря механизмам, поддерживающим гомеостаз. Стабильность биологических систем и процессы регенерации также контролируются геномом.

Системность клеток и организмов может являться одной из главных мишеней действия замораживания. На всех этапах криоконсервации: действия криопротекторов, замораживания, отогрева, удаления криопротектора – происходит комплексное действие на все элементы клеточной системы. В результате могут нарушаться многие принципы организации клеток и живых тел. В частности, нарушается изоляция и связь с внешней средой – автономность, повреждается единство структуры и компартментализация, ухудшается взаимосвязь процессов и их регуляция, изменяются информационные и материальные потоки, нарушается иерархия и самоорганизация, усиливается диссипация.

2.11 Гомеостаз и адаптация

Гомеостаз. Клетку можно представить как целостную сложную физико-химическую систему, длительно существующую в окружающей среде в относительно стабильном состоянии, несмотря на постоянный износ и деградацию ее отдельных элементов. Стабильность состояния клеток проявляется в постоянстве молекулярного состава, целостности органелл, устойчивости функций, неизменности кислотности среды, температуры, давления и многом другом. Способность к поддержанию стабильного состояния и целостности обеспечивает выживание и длительное существование клеток. У всех клеток и организмов выработались анатомические, физиологические, биохимические и поведенческие приспособления, служащие одной цели – *сохранению постоянства внутренней среды*, что обеспечивает оптимальные условия для жизнедеятельности и размножения. Клетки способны поддерживать и регулировать в достаточно узких пределах все структурно-функциональные параметры довольно длительное время, что является

обязательным условием свободной жизни. *Гомеостаз* – это состояние динамического постоянства внутренней среды, что проявляется в стабильности химического состава, физических и биологических свойств, устойчивости метаболизма и физиологических показателей. Гомеостаз обеспечивает автономность – относительную независимость клеток от внешней среды, а также относительно постоянный уровень активности организмов, несмотря на колебания условий внешней среды. Гомеостаз поддерживается благодаря постоянному притоку в биологические системы материи и энергии в процессе обмена веществ. Биохимические реакции метаболизма поддерживают постоянство внутренней среды клеток и организма в целом, несмотря на изменения окружающей среды. Любая клетка, даже в составе многоклеточного организма, – это полуавтономная система, относительно мало зависящая от факторов внешней среды благодаря наличию мембраны и регулируемому поддержанию гомеостаза. Поддерживая собственный молекулярный гомеостаз, клетки контролируют гомеостаз организма, в состав которого входят. В зависимости от молекулярного состава и степени упорядоченности клеточных комплексов, в них протекают разнообразные биохимические процессы, направленные, в первую очередь, на преобразование и целевое использование материи и энергии для поддержания собственной автономной организации, а только затем – на выполнение функций органа или организма.

Охлаждение биообъектов даже до 0°C способно нарушить многие параметры их гомеостаза. Например, гипотермия вызывает повышение вязкости коллоида цитоплазмы и ядра, что приводит к замедлению Броуновского движения, диффузии и взаимодействий молекул. Снижается скорость ферментативных реакций, нарушаются метаболические процессы и их координация. Это приводит к изменению концентраций субстратов, продуктов, солей, изменению pH и содержания воды, что в свою очередь оказывает отрицательное действие на структуру и функции клеток.

Замораживание нарушает гомеостаз ещё в большей степени. Кристаллизация, дегидратация при замораживании, а затем неуправляемая перекристаллизация и регидратация при отогреве приводит к заметным нарушениям гомеостатических показателей. Например, после отогрева может регистрироваться нарушение осмотического равновесия между клеткой и средой, между органеллами и цитозолем. Это сопровождается набуханием клетки и ее органелл. Избыточное содержание воды нарушает высокоорганизованную коллоидную структуру цитоплазмы, ядра и органелл, что нарушает их свойства и функции. Особенно сильно страдают митохондрии, у которых наблюдается увеличение размеров, разрывы внешней и внутренних мембран, расслоение матрикса и уменьшение количества крист. Это сопровождается разобщением дыхания и фосфорилирования в митохондриях, снижением или прекращением образования АТФ.

Адаптация. Выживание и размножение клеток и организмов в меняющихся, не всегда благоприятных условиях среды обеспечивается их

способностью к адаптации (приспособлению). *Адаптация* – это феномен приспособленности клеток и организмов к внешнему миру. В результате длительной совместной эволюции Земли и Жизни возникла общая приспособленность клеток и живых организмов к условиям обитания на планете: температуре, водной среде, атмосфере, тяготению, солнечной радиации, радиоактивному фону и т.д. Все это нашло отражение в их структурно-функциональной организации. Этим обусловлено наличие у живых тел специальных метаболических процессов (например, фотосинтез или дыхание кислородом), функциональных возможностей (плавание, способность к полету), специальных органов (дыхания, питания, движения), а также частей тела (передняя часть тела, несущая анализаторы; разнообразные конечности), обеспечивающих выживаемость и размножение. В результате естественного отбора из бесчисленного количества вариантов, поставляемых мутациями и рекомбинациями, в генетическом аппарате многих организмов прочно закрепились и точно передаются следующим поколениям (через репликацию ДНК и размножение) общие механизмы выживания, приспособления и гомеостаза.

Клетки и другие биологические объекты обладают способностью к приспособлению на какое-то время к ряду неблагоприятных факторов, в том числе и к низким температурам. Например, изолированные клетки, ткани или органы, или их кусочки могут в течение нескольких часов находиться в искусственной среде при температуре 0-4⁰С. При этом они продолжают поддерживать свой гомеостаз и даже проявляют некоторые функции.

Клетки большинства организмов не способны приспособляться и переносить сам процесс замораживания. Однако они могут несколько компенсировать нарушения после замораживания в процессе или после отогрева. То есть могут адаптироваться и существовать некоторое время в состоянии нарушенного гомеостаза, постепенно его восстанавливая.

2.12 Основные принципы и уровни организации

Организмы состоят из множества составных частей, строго упорядоченных в пространстве и времени, организованное взаимодействие которых обуславливает целостность жизни. Целесообразно выделить следующие фундаментальные качества живых систем: *дискретность, упорядоченность и организованность*.

Дискретность – это прерывистость организации материальных тел. Дискретность строения организмов означает, что они, как *системы*, состоят из многих отдельных, сложных, взаимосвязанных и взаимодействующих частей. Дискретность является важнейшей характеристикой любой системы, так как обеспечивает *внутреннее движение и взаимодействие ее частей*, а значит проявления ее различных качеств, свойств и функций.

Упорядоченность – закономерное расположение материальных тел в пространстве. Важность этой характеристики для живых систем заключается в том, что в конкретном пространстве в определенное время, вопреки

второму закону термодинамики, собираются нужные элементы системы, закономерное расположение и упорядоченное взаимодействие которых обуславливает появление качественно новых свойств данной системы. Такая система имеет оболочку или четкие границы, обозначающие форму и объем.

Организованность живых тел – это определяющие принципы целесообразного строения и целенаправленного функционирования клеток и многоклеточных организмов. Это также принципы упорядоченных целенаправленных отношений, взаимосвязи, взаимодействия и принципов управления всех частей и элементов, составляющих живые тела. Следует отметить несколько таких принципов:

1. *Принцип генетической детерминации.* Одним из основных организационных принципов живых тел является *«информационно-материальный принцип»*: любой организм – это *единство взаимодействующих генома и фенома*. То есть любой организм представляет собой как *генетическую программу*, так и ее конечный продукт в виде *определенного тела*. Абсолютно все стороны организации и функционирования живых тел *детерминированы направленными геномом специальными превращениями веществ и энергии*.

2. *Системный принцип.* В основе организации всех известных форм жизни лежат водные высокоупорядоченные системы органических веществ. Все живые тела – *открытые гетерогенные неравновесные системы*, свойства которых зависят от качественного и количественного состава взаимодействующих элементов. Важность этого принципа организации связана с появлением абсолютно новых качеств и свойств систем по сравнению со свойствами элементов, их составляющих, а также с появлением условий для образования разнообразных комбинаций взаимодействующих элементов с целью выполнения многочисленных функций. Основой существования живых систем является иерархичность, тотальная взаимосвязь и динамичность их многочисленных структур и функций.

3. *Принцип относительной автономности.* Важнейшей организационной основой бытия живых тел является принцип *автономности*, который проявляется в обособлении содержимого клеток и организмов от внешней среды. То есть живые тела являются *организационно замкнутыми*. Только в ограниченном пространстве организованных молекулярных систем особого качественного и количественного состава возможно протекание контролируемых целенаправленных процессов. Однако сохраняется постоянное *взаимодействие организмов через поверхностный аппарат с внешней средой* благодаря обмену веществ, энергии и информации, что подчеркивает их неразрывную связь. Необходимость такого взаимодействия связана с постоянным целевым потреблением материи и свободной энергии для самосохранения, воспроизведения и развития. Без постоянного источника материи и энергии жизнь невозможна.

4. *Принцип компартментализации (Блочный принцип организации).* Это закономерное разграничение внутреннего пространства клеток или

многоклеточного организма на структурно обособленные части (блоки), что позволяет осуществлять одновременное протекание многих тысяч биохимических реакций (часто противоположно направленных) и выполнение множества разнообразных функций одновременно и скоординированно. *Блочный принцип организации* является общим для построения, функционирования и эволюции всех живых систем, любых клеток и многоклеточных организмов. Он позволяет биологическим системам быстро и стандартно реагировать на различные изменения условий существования, обеспечивать гомеостаз и выживание. Это достигается, в первую очередь, благодаря скоординированному взаимодействию всех стандартных частей живых систем, а также благодаря обратимому формированию динамических структурно-функциональных систем из разнообразных блоков.

5. *Принцип соответствия (комплементарности)*. Биологическая целесообразность структурно-функциональной организации живых организмов заключается в соответствии между метаболизмом, физиологией, морфологией, поведением и факторами внешней среды, а также взаимодействием и взаимозависимостью между различными видами живого и средой обитания. Кроме этого, любой организм проявляет удивительную логику в организации, строении и функционировании всех органов, тканей и частей тела, а также удивительное соответствие внешней и внутренней структуры окружающей природной среде.

6. *Принцип динамичности и непрерывности развития*. Жизнь тела – это не стационарное состояние, а совокупность множества *процессов*. Это постоянные взаимодействия, непрерывные реакции и непрерывная смена состояний клеточных органелл, клеток, тканей и органов. Это многоэтапный процесс развития от зиготы до зрелого организма. Это процессы образования гамет, оплодотворения и следующего развития. Это постоянные процессы трансформации генома и генетической информации. Это неизбежная смерть и последующее возрождение новых тел. Это непрерывное развитие и эволюция вида. А внутреннее содержимое клеток настолько дискретно и динамично, что их можно считать не столько телами, сколько непрерывными процессами. Таким образом, одним из основных условий существования живых тел является нескончаемое *упорядоченное движение* на всех уровнях организации. На основе всех видов движения проявляется *постоянная активность* организмов и непрерывно совершается *работа*, направленная на выживание.

7. *Принцип избирательного катализа*. При довольно низких физиологических температурах ($0 - 40^{\circ}\text{C}$) химические связи органических молекул довольно стабильны, поэтому спонтанные превращения материи и энергии в органических системах невероятны или протекают очень медленно. Только наличие биокатализаторов – *ферментов* делает возможным сверхбыстрое протекание ограниченного множества невероятных биохимических реакций, организующих и обуславливающих жизнь.

8. *Принцип противодействия энтропии и использования диссипации.* Постоянно протекающие векторные биохимические, биофизические и физиологические процессы, направленные против внутренних и внешних сил диссипации, являются основой создания и поддержания организации. Они не только временно компенсируют и уравнивают возмущающие силы природы, чем обеспечивают выживание, но и выполняют полезную работу, обуславливают функции, а также способствуют воссозданию живых тел. Только постоянное противодействие со стороны клеток неуклонному росту энтропии и использование ее в своих целях позволяет поддерживать жизнь.

9. *Принцип самовоспроизводства (репродукции).* Повышение энтропии во времени и диссипации на ее основе спонтанны и неотвратимы. Для того чтобы быть стабильными и не исчезнуть, живым организмам необходимо постоянно бороться с повышением энтропии, что возможно лишь в течение некоторого времени. Поэтому для уверенного и длительного существования необходимо время от времени воспроизводить *точные копии самих себя*. Копирование и клонирование структур и процессов в ходе репродукции – основа *сохранения и распространения стандартов организации живой материи и информации*, свойственной только живым телам.

Организм – это обособленная сложная система, состоящая из множества подсистем, блоков, комплексов и молекул. Все элементы системы взаимозависимы и взаимосвязаны. Такая система представляет собой сложноорганизованное единство, как цельный организм. Таким образом, упорядоченность и организованность дискретных элементов системы приводит к качественно новому результату – появлению *целостности* живых тел. Они как единое целое реагируют на различные раздражители, двигаются, размножаются, имеют стандартный набор биохимических реакций и тождество разнообразных функций. Их целостность обуславливается строгой иерархией построения, интеграцией и координацией всех составляющих живых систем благодаря нервной и эндокринной регуляции, а также межклеточной коммуникации.

В природе большинство веществ рассеяно хаотически. Однако в живых организмах концентрации некоторых веществ в тысячи раз превосходят их содержание в окружающей среде. В частности, в микроскопическом объеме клетки сконцентрированы разнообразные белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, специфические липиды, различные углеводы, которых практически нет в окружающей среде. Причем молекулы этих веществ упорядочены и организованы в клетке, в результате чего и образуют сложные специальные структуры. Например, *биологические мембраны* построены из строго упорядоченных по отношению друг к другу, специфических молекул фосфолипидов, которые в водной среде образуют тонкий сплошной слой, полностью покрывающий поверхность клеток или органелл. В этот жидкокристаллический слой в определенном порядке внедрены разнообразные (специфические для разных органелл) структурные и функциональные белки. Благодаря такой строгой избирательности и упорядоченности молекул образуются органеллы, которые могут

обеспечивать многие жизненные процессы в клетках. Упорядоченное расположение разнообразных клеток образует специальные ткани и органы. Упорядоченно расположенные органы, ткани и клетки являются частями целого организма.

Организация и упорядоченность многоклеточного тела создается из неупорядоченности окружающего пространства постепенно, в процессе развития, на основе генетических программ генома. Именно молекулы ДНК являются организующим фактором в живых организмах. Принципы организации и упорядоченность не создаются вновь, а непрерывно копируются. Из одной упорядоченной клетки образуются две, затем четыре, восемь и т.д. В основе репродукции и распространения организации лежат процессы матричного копирования. Сначала клонируются ДНК, затем РНК, затем белки. Вместе с протеинами цитоплазмы и кариоплазмы копируются механизмы и процессы. Функционирующие белки поддерживают клонированную упорядоченность. Для поддержания структурно-функциональной организации необходим приток *свободной энергии и материи* извне, что обеспечивается в процессе обмена веществ и метаболизма.

Уровни организации. Дискретность лежит в основе нескольких структурно-функциональных уровней организации живых организмов и биосистем. Каждый уровень имеет более высокую сложность и обладает новыми свойствами и функциями (Табл. 2.4). Данные таблицы наглядно свидетельствуют о единой основе и неразрывной взаимосвязи явления жизни и индивидуальной жизни, которые, в свою очередь, являются частью органического мира и природы в целом.

Таблица 2.4. Уровни организации жизни

Системы	Уровень
Небиологические микросистемы	1. Элементарные частицы 2. Атомы 3. Молекулы 4. Супермолекулярные комплексы
Биологические микросистемы	5. Органеллы 6. Клетки
Биологические мезосистемы	7. Ткани 8. Органы 9. Системы органов 10. Организмы
Биологические макросистемы	11. Популяции 12. Виды 13. Биоценозы 14. Биосфера

Элементарные частицы: протоны, нейтроны, электроны и другие, которые в разных количествах и комбинациях образуют *атомы* различных элементов.

Атомы, в зависимости от комбинации и количества элементарных частиц, образуют всё разнообразие элементов нашей планеты. В их числе есть несколько, составляющих основную часть органического мира: углерод, кислород, водород, азот и фосфор. Объединяясь между собой в разном количестве и комбинациях, атомы образуют *молекулы*.

Молекулы. Все живые организмы состоят примерно на 70% из молекул воды. Остальное содержимое приходится, в основном, на четыре группы органических макромолекул: белки (до 20%), углеводы, нуклеиновые кислоты и жиры. Энергия преобразуется и запасается в виде макроэргических связей универсальных молекул АТФ. Наследственная информация хранится и реализуется благодаря молекулам ДНК и РНК.

Супермолекулярные комплексы. Молекулы биополимеров, в особенности белки, способны формировать устойчивые, высокоупорядоченные объединения, которые совместно реализуют какую-либо функцию. В составе таких объединений может присутствовать от двух до нескольких десятков и даже сотен индивидуальных молекул, вместе образующих «молекулярную машину». К таким супермолекулярным комплексам относятся АТФ-синтетаза, фотосистемы хлоропластов, реплисомы, фибриллы, нуклеосомы, сплайсосомы и др. Этим же уровнем организации обладают и рибосомы, традиционно рассматриваемые в качестве органелл.

Органеллы образуются в результате упорядоченной организации макромолекул клеток. При этом образуются специальные клеточные структуры: биомембраны, митохондрии, лизосомы, рибосомы и другие. Разные органеллы имеют специфический макромолекулярный состав, что обуславливает специфику их строения и функционирования. Совокупность согласованно функционирующих органелл образует клетку.

Клеточный организм. Клетки являются *элементарными живыми телами, биологическими единицами жизни*, характерными для организации всех видов организмов. Только на клеточном уровне возможен метаболизм, гомеостаз, биосинтез белков, реализация наследственной информации и размножение. В процессе эволюции сначала образовались колонии близких по строению клеток, а затем группы клеток приобретали специализацию и становились тканями многоклеточных организмов.

Ткани. Совокупность клеток с одинаковым типом организации и функций составляет *ткань*. Сотни различных видов клеток входят в состав тел разнообразных многоклеточных организмов. Многочисленные клетки животных образуют 4 типа тканей: нервную, соединительную, эпителиальную и мышечную.

Органы. Органы – это высокодифференцированные части тела, расположенные в определенных местах и выполняющие специальные функции. Они образуются постепенно, в процессе развития. В подавляющем большинстве случаев орган формируется из тканей нескольких различных типов. У высших животных имеется много разнообразных по размерам и структуре органов, выполняющих многочисленные функции.

Системы органов. Система органов – это группа различных органов, коллективно функционирующих для выполнения общей для организма задачи. В классическом случае, органы, составляющие систему, структурно взаимосвязаны друг с другом и специализированы к работе в рамках данной конкретной системы. Таковыми являются анатомические системы – опорно-двигательная, пищеварительная, дыхательная, сердечно-сосудистая, нервная, выделительная, репродуктивная. В то же время существуют и другие системы, физиологические, которые обладают лишь функциональным единством, а их органы, как правило, совмещают принципиально различные функции. Таковы эндокринная, иммунная, кроветворная, лимфатическая системы, а также многочисленные сугубо метаболические «системы без органов» – ретикуло-эндотелиальная, ренин-ангиотензиновая, система гемостаза и т.п.

Многоклеточный организм. Взаимосвязано функционирующие клетки, ткани, органы, системы органов формируют многоклеточное живое тело. Это организм, который является единицей и носителем более высокого уровня организации живой материи. Все вышеперечисленные уровни организации: молекулярный, клеточный, органнй и другие коллективно работают (и координируются нервной, эндокринной и иммунной системой) для выживания отдельного организма. Таким образом, организм – это *сверхсистема*, состоящая из множества молекул, органелл, клеток, тканей, органов и частей тела.

Популяционно-видовой уровень. Сходные по морфологии, физиологии, особенностям метаболизма организмы, способные скрещиваться и воспроизводить себе подобных, составляют классический *биологический вид*. Это – весьма удачная и распространенная форма существования живых организмов, однако не единственная. Миллионы бактерий и протистов, не способных к половому размножению, формируют «клональные виды», особи которых не способны к скрещиванию и воспроизводят себе подобных лишь бесполом путем. Отдельные группы организмов имеют намного более сложные способы воспроизведения сходных особей: так называемые репродуктивные видовые комплексы, представляющие собой объединения нескольких видов, индивиды которых в определенных условиях способны скрещиваться между собой. Подобные явления обнаружены в мире низших эукариотов, грибов и даже позвоночных животных (рыбы, лягушки).

В настоящее время на Земле живут 8,7 миллионов видов живых организмов. Внутри каждого вида имеются группы организмов, обладающих некоторыми морфологическими или физиологическими особенностями. Такие группы индивидуумов образуют *популяции*.

Экосистемы (биоценозы) – исторически сложившиеся устойчивые сообщества популяций разных видов, связанных между собой и с окружающей неживой природой обменом веществ, энергии и информации. Они также являются крупными смешанными системами, в которых осуществляется круговорот веществ и энергии.

Биосфера. Совокупность экосистем образует биосферу. Биосфера – это

совокупность всего живого на Земле – всех организмов, обитающих в тесной связи с неживой природой в атмосфере, гидросфере и литосфере. Биосферу составляют миллионы различных видов животных, растений, грибов, простейших, бактерий и вирусов. Биосфера – это высший уровень организации живой природы, это взаимосвязанное единство всех живых организмов.

Из перечисленных биологических систем живыми следует считать только клетки и многоклеточные организмы. Они принципиально отличаются от остальных биосистем автономностью, а также способностью рождаться и умирать, и только они являются реальными властелинами геномов.

Принципы дискретности, организованности, упорядоченности и целостности имеют отношение не только к структуре, но и к функции. В частности, метаболизм любой клетки дискретен, так как состоит из десятков тысяч биохимических реакций, вместе с тем он целостен, так как служит единой цели – поддержанию гомеостаза. Все реакции метаболизма строго организованы и упорядочены в пространстве и времени. Каждая протекает в определенном месте клетки, осуществляется в строго определенном порядке и в строго определенное время. Организация дискретных процессов обеспечивается избирательным катализом только необходимых клетке реакций. Избирательный катализ основан на наличии только нужных ферментов, которые синтезируются клеткой на основе генетических программ ДНК. Многие субстраты и продукты ферментативных реакций являются регуляторами включения, выключения, активирования или ингибирования биохимических процессов. То есть саморегуляция осуществляется на основе внутренней детерминации и обусловленности появления определенных молекул (определенной информации). Необходимость их наличия и эффективная концентрация, опять же, контролируется ферментами – специфическими производными определенного генома цельного организма.

В живых системах организовано, дискретно и целенаправленно преобразуется и используется также и энергия, которая избирательно направляется на обеспечение только необходимых реакций и процессов. Организованность, дискретность и избирательность характерна также и для конкретных процессов восприятия и использования биологической информации.

Уровни организации всех сторон жизни построены на основе дискретности по принципу иерархии: более низкие уровни организации обязательно являются составной частью высших уровней и обуславливают их качественно новые свойства. Прослеживается аналогия с дискретной шкалой размеров и масс, дискретностью в строении атомов, дискретностью энергетических уровней в квантовой механике и др. То есть можно говорить о дискретности как об одной из главных характеристик природы.

Замораживание-отогрев могут нарушать большинство указанных принципов и уровней организации живых тел.

Рекомендуемая литература:

1. Жегунов Г.Ф. Природа жизни и бессмертия. Основные положения теории жизни. – Москва, Ленард.–2015.– 376с.
2. Жегунов Г.Ф., Д.В.Леонтьев, Е.В.Щербак, Е.Г. Погожих. Биология клетки. – Москва, Ленард.–2018.– 544 с.
3. Zhegunov G. “The dual nature of life”.– Springer, Heidelberg.– 2012.– 294p.
4. Бауэр, Э.С. Теоретическая биология. – Изд-во ВИЭМ.– 1935.–151с.
5. Жегунов, Г.Ф. Медицинская биология. В 2 т. Санкт-Петербург: - Sotis, 2005.
6. Ченцов, Ю.С., Введение в клеточную биологию. – М.: ИКЦ "Академкнига".– 2004. – 495 с.
7. Тринчер, К.С. Биология и информация. Элементы биологической термодинамики. – М.: Наука.– 1965.–121с.

Часть 1. Теретические и экспериментальные основы криоконсервирования биологических объектов

Глава 3. Основные подходы и этапы

3.1. Основы низкотемпературного хранения. 3.2. Основы хранения биообъектов в замороженном состоянии. 3.3. Этапы криоконсервирования: 3.3.1. Забор материала. 3.3.2. Добавление криопротектора. 3.3.3. Замораживание. 3.3.3.1. Охлаждение до начала кристаллизации воды. 3.3.3.2. Охлаждение в зоне кристаллизации воды. 3.3.4. Хранение в замороженном состоянии. 3.3.5. Отогрев до положительной температуры. 3.3.6. Замена среды криоконсервирования изотонической средой

3.1. Основы низкотемпературного хранения

Температура, с позиций молекулярной физики, это термодинамический параметр, характеризующий среднюю кинетическую энергию молекул системы. Для идеального газа (приближение, используемое для описания идеальных растворов) средняя кинетическая энергия молекулы

$$\bar{E} = \frac{3}{2} k_0 T,$$

где k_0 – постоянная Больцмана ($k_0 = 1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж/град), T – абсолютная температура (K).

Таким образом, снижение температуры означает снижение скорости процессов, связанных с перемещением молекул: химических реакций, транспорта через мембрану молекул веществ, ионов и др.

Для характеристики степени влияния температуры на скорость тех или иных процессов используют понятие энергия активации, которая может быть определена из уравнения Аррениуса:

$$(k) = C \cdot \exp(-E_A/RT),$$

где (k) – константа скорости реакции, E_A – энергия активации R – универсальная газовая постоянная $R = k_0 \cdot N_A$, (N_A – число частиц в моле вещества $6,03 \cdot 10^{23}$)

Прологарифмировав уравнение Аррениуса

$$\ln k = \ln C - E_A/RT,$$

можно оценить энергию активации по графику зависимости $\ln k$ от $1/T$, который для реакций (процессов), «подчиняющихся закону Аррениуса», представляет собой прямую линию. В качестве примера приведены графики логарифма коэффициентов проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул диметилсульфоксида (ДМСО) и глицерина в зависимости от обратной температуры (рис.3.1).

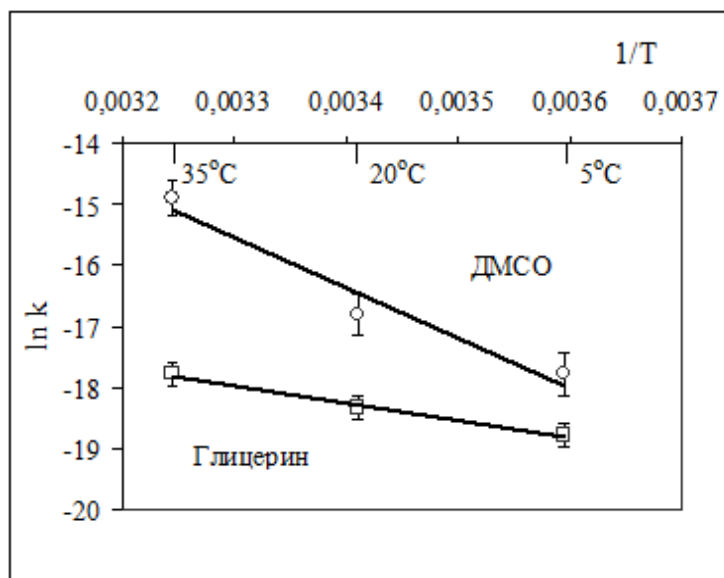


Рис. 3.1. Зависимости константы скорости процесса от температуры в координатах Аррениуса. E_A/R – определяется как тангенс угла наклона прямой на графике.

Из графиков видно, что скорость проникновения криопротекторов через мембрану клеток при температуре 35°C ($3,40 \times 10^{-7}$ м/с для ДМСО и $1,90 \times 10^{-8}$ м/с для глицерина) выше, чем при температуре 20°C ($0,50 \times 10^{-7}$ м/с для ДМСО и $1,10 \times 10^{-8}$ м/с для глицерина), и при температуре 5°C ($0,19 \times 10^{-7}$ м/с для ДМСО и $0,70 \times 10^{-8}$ м/с для глицерина). Однако угол наклона прямых отличается. Чем больше угол наклона прямой, тем выше E_A процесса переноса молекул криопротекторов через мембраны клеток, т.е. тем больше понадобится энергии, чтобы криопротектор проник в клетки при более низких температурах. Так, рассчитанная E_A для молекул ДМСО в интервале температур 35 – 5°C составляет 66,99 кДж/моль, а для молекул глицерина $E_A = 23,31$ кДж/моль. Для большинства реакций значения E_A лежат в пределах от 10 до 200 кДж/моль.

Распространенной характеристикой зависимости скорости реакции от температуры является также температурный коэффициент Вант Гоффа Q_{10} , равный отношению скоростей реакций при двух различающихся на 10°C температурах.

$$Q_{10} = v_{T+10}/v_T.$$

Q_{10} для большинства биологических процессов лежит в пределах 2 – 3.

Между Q_{10} и E_A существует зависимость:

$$E_A = 0,1R (T+10)T \times \ln Q_{10}.$$

Таким образом, как следует из вышеприведенного, снижение температуры на 30° может обеспечить снижение скорости обменных процессов в 8 – 27 раз.

Эти соображения и лежат в основе *гипотермического хранения* биообъектов. Гипотермическое хранение живых биологических объектов, как правило, осуществляется в условиях бытового холодильника при температурах $0 - 4^\circ\text{C}$. Срок его ограничен не только протеканием (хоть и медленным) обменных процессов, но и возможным их разбалансом в результате разной зависимости тех или иных реакций от температуры. При гипотермическом хранении отсутствует действие на биообъекты льда и образующихся при замораживании повышенных концентраций солей, поэтому и не требуется специальной криопротекции.

Гипотермическое хранение – процесс недолгосрочного хранения биообъектов при температурах ниже физиологических, но не ниже 0°C . Срок гипотермического сохранения значительно больше времени хранения изолированного из организма биообъекта в условиях умеренного (20°C) тепла, но все же меньше времени функционирования клеток в физиологических условиях. Это можно объяснить, прежде всего, механическими повреждениями при заборе материала, нарушениями клеточных контактов, трофики и оксигенации. В свою очередь, негативное влияние гипотермии может быть обусловлено различным влиянием температуры на динамическую структуру различных белков, особенно ферментов. Многие ферменты полностью теряют свою активность при температурах ниже $20 - 10^\circ\text{C}$. Если нарушается функция ключевого в метаболической цепи фермента, то нарушается весь комплексный процесс.

Основным визуальным признаком нарушения клеток и биологических тканей при гипотермии является их набухание. Причину этому и ограниченной сохранности и гибели клеток в условиях гипотермии следует искать в нарушении ионного баланса в результате сниженной активности Na^+K^+ -насоса биологических мембран. Характер повреждения – набухание клеток – заставляет предполагать наличие потока внеклеточных веществ (Na^+ и Cl^-) внутрь клетки, нарушающего осмотическое равновесие в системе клетка – окружающая среда. В пользу такого предположения свидетельствует, в частности, возможность увеличения сроков гипотермического хранения гепатоцитов крысы в средах «внутриклеточного типа» (содержащих повышенное содержание K^+ и пониженное содержание Na^+). В свою очередь, нарушение работы ионных насосов и переносчиков в клетках может быть обусловлено нарушением структуры их мембран при охлаждении, так как известно, что с понижением температуры ослабляются гидрофобные силы, являющиеся основой организации всех биологических мембран.

3.2. Основы хранения биообъектов в замороженном состоянии

Для полного прекращения химических реакций необходим переход биообъекта в твердое агрегатное состояние, обеспечивающее его неограниченно долгое хранение в состоянии *анабиоза*. В природе анабиоз достигается замораживанием или обратимой потерей воды (*ангидробиоз*) с частичной ее заменой сахарами. В отличие от него искусственный анабиоз в большей степени направлен на иммобилизацию воды, чем на ее удаление. В этом основное отличие искусственного замораживания от природного анабиоза и ангидробиоза.

При замораживании биологического материала в качестве хладагента обычно используют жидкий азот с температурой минус 196°C. Можно использовать и твердый CO₂ с температурой испарения минус 78°C, даже такой температуры достаточно для полного затвердевания большинства водных растворов. Замораживают также в специальных морозильниках при температуре минус 80°C.

В процессе криоконсервирования биообъект подвергается многофакторному воздействию (см. главу 5). Для успешного перехода в состояние холодового анабиоза необходимо применять специальные защитные меры для сохранения клеточных структур и функций. И часто возвращение биообъекта к норме после отогрева, без частичной или полной потери жизнеспособности остается достаточно непростой задачей.

3.3. Этапы криоконсервирования

Процесс криоконсервирования биологических объектов условно разбивают на несколько этапов:

- Забор материала в физиологический раствор,
- добавление в раствор криопротекторов,
- замораживание биообъекта,
- хранение в замороженном состоянии,
- отогрев до положительной температуры,
- замена среды криоконсервирования физиологической средой,
- использование биологических объектов.

3.3.1. Забор материала

Забор материала - извлечение биообъекта из физиологической системы и помещение его в искусственную среду (физиологический раствор). Процедура извлечения клеток, тканей и органов из организма сопровождается умеренной (20°C) или глубокой (0÷4°C) гипотермией и неблагоприятным действием на клетки нескольких факторов:

- *Механическая деструкция, нарушение трофики и оксигенации.*

Выделение клеток из изолированных органов (гепатоцитов из печени, спленоцитов из селезенки, тимоцитов из тимуса и т.д.) связано с механической деструкцией ткани и ее ферментативной обработкой (колагеназа). Нарушение питания и оксигенации, нарушение клеточных контактов, действие посторонней среды сопровождается гибелью части клеток и повреждением мембран их основной массы. Для репарации этих повреждений может применяться краткосрочное культивирование при физиологических температурах.

- *Агрегация.*

В результате действия растворов и методов выделения изменяются адгезионные свойства и электростатические взаимодействия и в выделенных суспензиях клеток, что приводит к образованию клеточных агрегатов и конгломератов. С целью исключения подобных эффектов применяют антикоагулянты (гепарин, цитрат натрия), снижающие эффективность действия связывающих факторов.

3.3.2. Добавление криопротекторов

Замещение «физиологического» раствора криозащитной средой проводится с целью уменьшения количества образующегося льда и снижения эффектов концентрирования солей при замораживании. Эта цель может быть достигнута применением достаточно высоких (гипертонических) концентраций криопротекторов. В практике криоконсервирования криопротекторы наиболее часто используются в концентрациях 0,5÷3М. Результатом взаимодействия клетки с непроникающими криопротекторами (например, сахарозой) является уменьшение ее объема в результате дегидратации. Степень дегидратации с увеличением концентрации криозащитного раствора возрастает (Рис.3.2а).

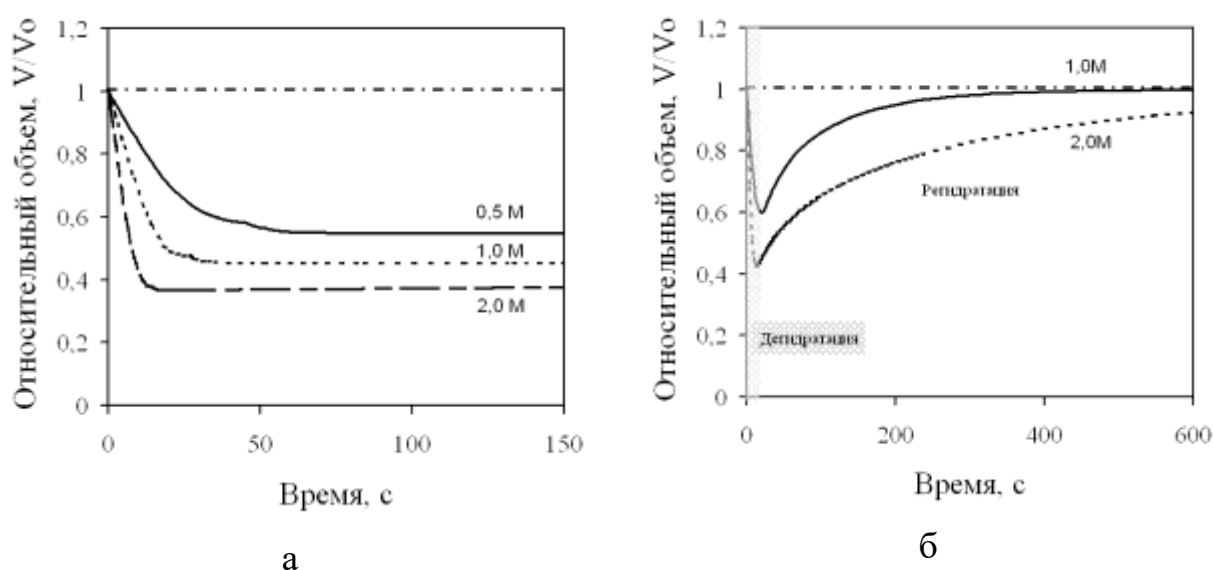


Рис. 3.2. Изменение объема клетки в растворах непроникающего (а) и проникающего (б) криопротектора, содержащих изотоническую концентрацию NaCl. Пояснения в тексте.

В растворах проникающих криопротекторов (например, глицерина) за фазой дегидратации следует фаза регидратации (Рис.3.2б). Чем выше концентрация криопротектора, тем больше степень обезвоживания клетки. Длительность фазы регидратации зависит от проникающей способности криопротектора, свойств мембран, геометрии клеток и температуры. Чем быстрее проникает криопротектор в клетку, тем быстрее восстанавливается осмотическое равновесие: вода возвращает клеточный объем до размеров исходного.

В криозащитную среду, содержащую проникающий криопротектор, необходимо включать непроникающую добавку в изотонической концентрации для предотвращения набухания клеток в процессе регидратации.

На рис. 3.3 показано, как обезвоживаются (2), а затем набухают (4) бластомеры двухклеточного эмбриона мыши, закрепленного на микропипетке, в водном растворе проникающего криопротектора.

Криопротекторы добавляют в среду замораживания постепенно. Быстрое добавление к клеткам высоких концентраций криопротекторов может стать причиной:

- резкого повышения проницаемости мембран для криопротектора;
- внезапного повышения проницаемости мембран для внеклеточных ионов, приводящего к набуханию клеток;
- быстрой грануляции внутриклеточного содержимого, сопровождаемой потерей гранул и обесцвечиванием клеток;
- образования крупных трансмембранных дефектов, через которые клетки могут терять крупные молекулы, например, гемоглобин.

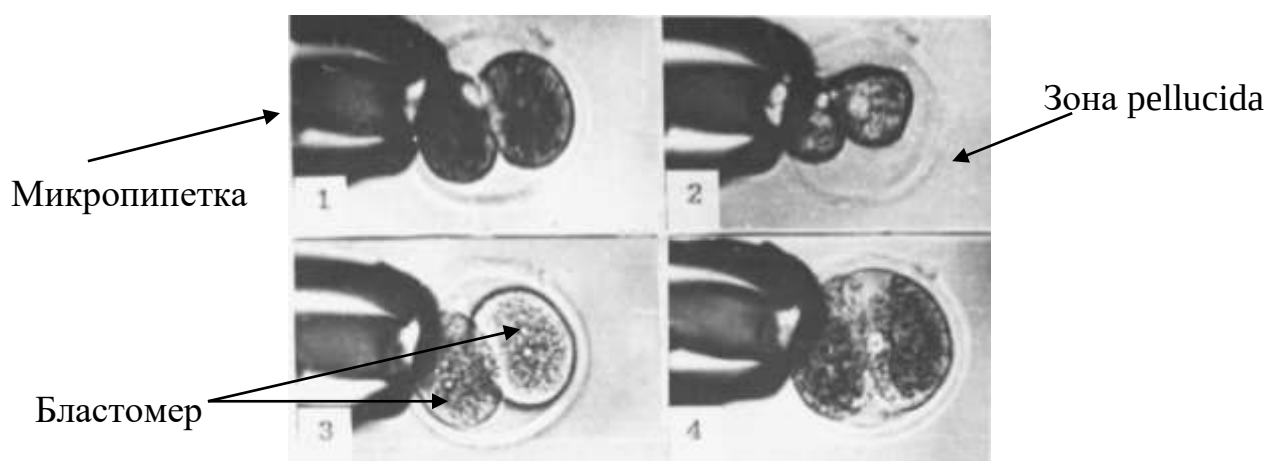


Рис. 3.3. Дегидратация бластомеров двухклеточного эмбриона мыши с последующей их регидратацией и набуханием в 1 М водном растворе ДМСО. 1- контроль, без криопротектора, 2 – сразу после добавления криопротектора, 3 – регидратация, обусловленная проникновением криопротектора в клетки, 4 – набухание бластомеров после выравнивания концентраций криопротектора вне и внутри клеток.

Одной из причин, приводящих к повреждению клеток на этом этапе, может быть гипертонический стресс (острая реакция клеток), связанный со значительной деформацией клеточных мембран при обезвоживании или чрезмерной дегидратацией клеток. Для предотвращения гипертонического стресса можно использовать процедуры постепенного многоэтапного или капельного добавления криозащитных сред.

Помимо осмотического, криопротекторы могут обладать более или менее выраженным цитотоксическим действием. Механизмы цитотоксического действия криопротекторов изучены еще недостаточно. Тем не менее установлено, что цитотоксический эффект может быть снижен при понижении температуры, уменьшении концентрации криопротектора и времени контакта с ним клеток. Снизить или исключить цитотоксическое действие криозащитных сред можно:

- осуществляя отбор криопротекторов по степени цитотоксического действия на изучаемый биообъект;
- снижая концентрацию отдельных компонентов в криозащитной среде за счет введения в нее дополнительных компонентов;
- уменьшая время контакта криопротекторов с клетками;
- понижая температуру инкубации.

Таким образом, на этапе замены «физиологической» среды криозащитной особо важна роль осмотических и цитотоксических эффектов. По крайней мере, одним из проявлений повреждения клеток на этом этапе криоконсервирования является нарушение проницаемости плазматических мембран.

3.3.3. Замораживание

3.3.3.1. Охлаждение до начала кристаллизации воды

К эффектам, которые происходят на этом этапе и характеризующим процесс охлаждения от комнатной температуры до 0°C, можно отнести:

- снижение скоростей химических реакций;
- температурно-зависимые перестройки в липидном бислое;
- увеличение растворимости газов;
- снижение функциональной активности некоторых интегральных белков;
- нарушения активного транспорта ионов.

3.3.3.2. Охлаждение в зоне кристаллизации воды

Действующие на этом этапе факторы и степень их проявлений определяются составом криозащитной среды, скоростью охлаждения и степенью переохлаждения биообъекта до начала кристаллизации.

Незащищенные криопротектором клетки при медленном охлаждении погибают от эффектов внеклеточного кристаллообразования, а при быстром - от эффектов вне- и внутриклеточного кристаллообразования (рис. 3.4).



Рис 3.4. Быстро замороженные клетки, содержащие внутриклеточные кристаллы (темные), в окружении внеклеточного льда.

К факторам, оказывающим пагубное влияние на клетки при медленном замораживании, относят:

- внеклеточный лед, рост кристаллов которого приводит к концентрированию клеток в малых объемах жидкой фазы и действию на них кристаллизационного давления (рис. 3.5);
- электрические поля, возникающие на границе льда и жидкой фазы в результате неодинакового захвата льдом ионов разного знака;
- осмотическое действие повышенных концентраций солей, нарушение барьерных функций мембран для ионов, слабо проникающих в норме;
- сдвиги pH в результате одновременного выпадения из раствора компонентов буфера в зоне эвтектической кристаллизации.

Деструктивные изменения не защищенных криопротектором клеток, если скорость охлаждения достаточно мала, могут проявляться уже на этапе замораживания. Эритроциты теряют гемоглобин, ядродержащие клетки набухают и обесцвечиваются в медленно сужающихся каналах между кристаллами льда, затем, по мере сужения каналов, снова сжимаются. При увеличении темпа охлаждения разрушение клеток происходит медленнее, и проявляется на этапе отогрева.

При медленном замораживании в присутствии криопротекторов каналы между кристаллами льда становятся тем шире, чем выше концентрация криозащитного вещества. Увеличение переохлаждения до начала кристаллизации измельчает структуру льда. Кристаллизация начинается при более низкой температуре и захватывает более широкий температурный диапазон. Вероятность попадания клеток в замкнутые включения во льду и возможность подвергаться действию кристаллизационного давления уменьшается. Разветвленная система каналов способствует ослаблению возникающих в системе напряжений. Степень концентрирования солей уменьшается, однако возрастает вклад самого криопротектора в осмотическое давление внеклеточной среды.

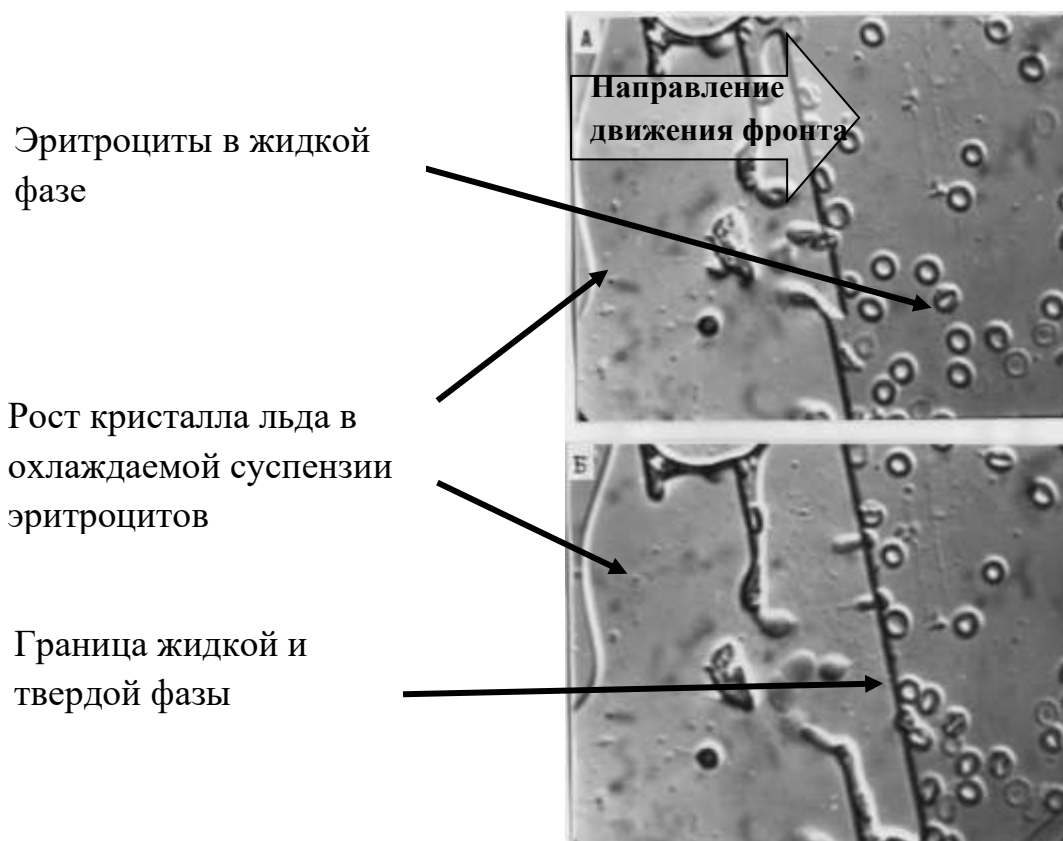


Рис 3.5. Перемещение эритроцитов растущим внеклеточным льдом и их захват кристаллом.

Высокомолекулярные (не проникающие в клетки) криопротекторы обычно используются в высоких весовых ($\sim 20\%$), но низких молярных ($\sim 0,5\text{M}$) концентрациях. К моменту витрификации молярная концентрация их растворов обычно не превышает 2M . Тем не менее, они не позволяют концентрации внеклеточной соли вырасти более чем в $3\div 4$ раза.

Низкомолекулярные (проникающие) криопротекторы при использовании в высоких весовых концентрациях (более 20%) также сильно ограничивают концентрирование внеклеточных солей. Но их собственная молярная концентрация к моменту витрификации может достигать $7,5\text{M}$. Это может представлять опасность для клеток, если учесть, что в процессе замораживания поступление криопротекторов в клетку ограничено выраженным уменьшением проницаемости для них биомембран при пониженных температурах. Эффект низкомолекулярных криопротекторов, особенно применяемых в малых ($\sim 5\%$) концентрациях, может быть сравним с эффектом солей.

Клетки, замораживаемые быстро, дегидратации не подвергаются. Внутреннее содержимое клеток и внешний раствор достаточно быстро переходят в твердое состояние. Эффекты концентрирования клеток в каналах в значительной мере исключаются. При быстром охлаждении уменьшается количество внеклеточного льда, его структура становится мелкокристаллической. В этих условиях основным фактором повреждения

становится внутриклеточное кристаллообразование. Его повреждающее действие проявляется на этапе отогрева. Некоторые исследователи связывают повреждение внутриклеточным льдом с его рекристаллизацией. Не исключено, однако, что неравновесные условия внутриклеточного кристаллообразования уменьшают количество образуемого при замораживании льда, но «докристаллизация» при отогреве восполняет его количество до повреждающего уровня. В этом случае речь должна идти не только о рекристаллизации, сближающей разъединенные биологические структуры, но и о продолжении роста кристаллов льда на этапе отогрева.

При быстром замораживании в присутствии непроникающих криопротекторов внутриклеточная кристаллизация может быть исключена за счет предшествующей замораживанию дегидратации. Однако только дегидратации иногда может быть недостаточно.

Применение проникающих криопротекторов при быстром замораживании в малых концентрациях не способно предотвратить внутриклеточное кристаллообразование и поэтому нецелесообразно. Насыщение клеток большими концентрациями криопротекторов чревато цитотоксическими эффектами, к тому же усложняется проблема удаления криопротекторов из клеток после отогрева. Более часто на практике используется процедура подготовки к замораживанию, включающая два этапа: насыщение клеток криопротектором в растворах относительно невысоких концентраций (~1М) с последующей кратковременной выдержкой в растворе повышенной концентрации (~3М), обеспечивающей дегидратацию клеток перед замораживанием. Второй этап, как правило, проводится при пониженной температуре (0÷4°C), иногда в среду вводят непроникающую добавку, например, сахарозу. Комбинация насыщения криопротектором с дегидратацией наиболее эффективно предотвращает внутриклеточное кристаллообразование при быстром замораживании.

3.3.4. Хранение в замороженном состоянии

В качестве хладагентов можно использовать твердую углекислоту (-79°C), жидкий азот (-196°C). Использование жидкого гелия хотя и возможно, но сопряжено со значительными методическими сложностями. Хранение в жидком азоте в течение десятков лет не отражается на жизнеспособности погруженных в него биообъектов. Падение сохранности на этом этапе может быть обусловлено периодическими снижениями уровня азота в результате испарения и периодическим попаданием образцов в пары азота. Хранение при температурах минус 10÷20°C широко применяется для хранения биологических препаратов и продуктов в быту. Применение такого хранения для клеток в научных или медицинских целях требует применения криозащитных сред и не может быть продолжительным.

3.3.5. Отогрев до положительной температуры

При отогреве биообъекта от температуры хладагента до зоны фазовых превращений воды основным повреждающим фактором могут быть

термомеханические напряжения. При медленном нагреве быстро замороженных образцов регистрируется «докристаллизация» - включение части образовавшейся жидкой фазы в кристаллическую структуру, сопровождающаяся повышением концентрации внеклеточных растворов. В зоне фазовых превращений наблюдается рекристаллизация – рост крупных кристаллов за счет мелких. После плавления внутриклеточного льда клетки могут обезвоживаться при отогреве. Плавление внеклеточного льда разбавляет концентрированные внеклеточные растворы. Возвращаясь в исходную среду замораживания, неповрежденные клетки могут восстанавливать свой объем.

Повышение температуры на этапе отогрева способствует восстановлению исходных свойств биомембран, повышает скорости биохимических реакций.

3.3.6. Замена среды криоконсервирования изотонической средой

При возвращении насыщенной криопротектором клетки в изотоническую среду в нее устремляется вода, восстанавливая осмотическое равновесие на мембране. По мере выхода из клетки криопротектора по концентрационному градиенту объем клетки восстанавливается. Критический (допустимый) уровень набухания - не более, чем в 1,2 раза по сравнению с исходным объемом. Клетки могут при набухании максимально увеличивать свой объем в $1,8 \div 2$ раза. Для исключения набухания или уменьшения его уровня в среду отмывания вводят непроникающую добавку, например, сахарозу.

Динамика объемных изменений при отмывании клеток представлена на рис. 3.6. На рисунке представлены три варианта отмывания клеток от криопротектора:

1. физиологическим раствором;
2. раствором криопротектора с более низкой концентрацией;
3. гипертоническим раствором непроникающего криопротектора.

В первом и втором случае наблюдается двухфазная кинетика изменения объема, связанная с более высокой проницаемостью воды, чем криопротектора. Вода стремится снизить градиент концентрации криопротектора на мембране, приводя к набуханию клетки. По мере выхода криопротектора из клетки ее покидает и вода, уменьшая объем клетки до исходного. Чрезмерное набухание клетки (случай 1) может привести к ее гибели. Снизить степень набухания можно постепенным снижением концентрации криопротектора в отмывающем растворе (случай 2). Применение гипертонического раствора непроникающего вещества (случай 3), позволяет практически избежать набухания, клетка при этом окажется обезвоженной, и для восстановления ее объема потребуются дополнительная процедура – перенос в изотоническую среду.

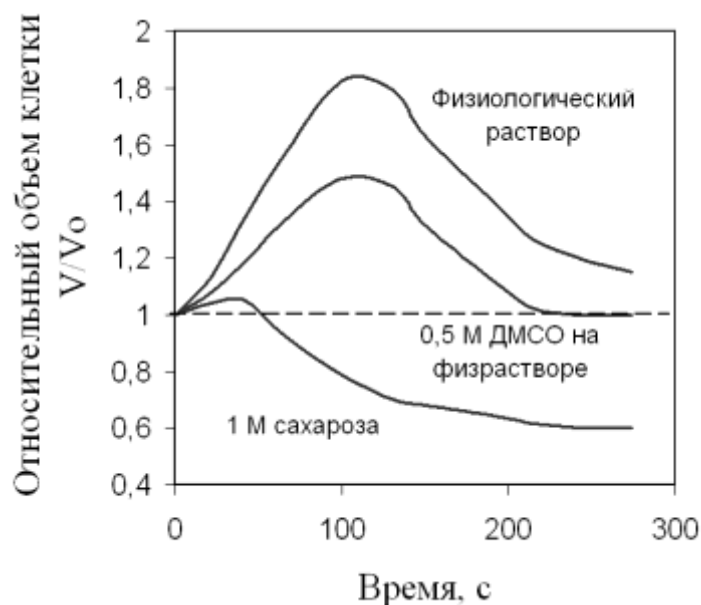


Рис. 3.6. Изменение объема клетки, насыщенной 1М ДМСО при отмывании в разных средах. Объяснение в тексте.

Таким образом, в процессе криоконсервирования биологические объекты подвергаются действию большого числа факторов. Важнейшими условиями, влияющими на сохранность биообъектов в процедуре криоконсервирования, являются:

- адекватный способ получения препаратов, температура и среда выделения;
- соответствующие скорости (режимы) охлаждения и отогрева;
- адекватные виды и концентрации криопротекторов;
- необходимое время и температура экспозиции в криозащитной среде;
- соответствующая температура хранения;
- обязательное наличие непроникающей добавки в среде отмывания;
- аккуратные процедуры насыщения криопротектором и удаления криопротектора из клеток.

Рекомендуемая литература:

1. Низкие температуры в медицине / Под ред. К.С. Тернового, Л.Г. Гассанова. – Киев.: Наук. Думка.– 1988. – 279 с.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев.: Наук. Думка.– 1994. – 432 с.
3. Грищенко В. И. Достижения криобиологии и криомедицины во имя нации // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 3. – С. 269–274.
4. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. академика НАНУ А.Н. Гольцева. – Харьков.– 2012. – 768 с.

Глава 4. Роль воды в процессах замораживания-отогрева биообъектов

4.1.Свойства и агрегатные состояния воды 4.2.Структура воды в жидком состоянии 4.3.Состояния воды в биологических объектах 4.4.Свойства воды в биополимерах, мембранах, клетках и тканях 4.5.Дегидратация биообъектов 4.6.Действие низких температур на обезвоженные объекты. 4.7.Эвтектическая точка растворов и кристаллизация 4.8.Кристаллизация воды при замораживании 4.9.Формы воды в твёрдом состоянии 4.10.Механизмы и особенности кристаллизации воды при разных скоростях замораживания

4.1. Свойства и агрегатные состояния воды.

Вода является одним из основных компонентов всего живого. Организмы животных почти на две трети состоят из воды. Человеческий эмбрион в течение первого месяца содержит около 93% воды. Без воды не было бы жизни. Вода служит основной средой, в которой происходят биохимические реакции в клетке. Она образует жидкую часть крови и лимфы. Вода необходима для пищеварения, так как расщепление углеводов, белков и жиров происходит с присоединением молекул воды. Вода выделяется в клетке при построении белков из аминокислот. Физиологические свойства биополимеров и многих надмолекулярных структур (в частности, клеточных мембран) весьма существенно зависят от их взаимодействия с водой.

Рассмотрим некоторые свойства воды. В отдельно рассматриваемой молекуле воды атомы водорода и кислорода, точнее их ядра, расположены так, что образуют равнобедренный треугольник. В вершине его - сравнительно крупное кислородное ядро, в углах - по одному ядру водорода (рис. 4.1.).

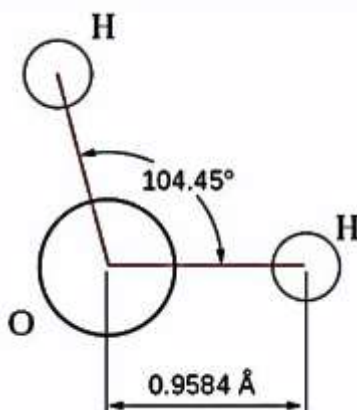


Рис. 4.1. Структурная формула молекулы воды

Каждая молекула воды обладает большим электрическим моментом. Вследствие высокой электроотрицательности атомов кислорода молекула воды может образовывать водородные связи с одной, двумя, тремя и

четырьмя другими молекулами воды. В результате получаются сравнительно устойчивые димеры и другие полимерные комплексы. В среднем каждая молекула в жидкой воде имеет четыре соседа. Состав и структура межмолекулярных комплексов зависят от температуры воды.

В природе вода содержится в трех агрегатных состояниях:

- твёрдое — лёд
- жидкое — вода
- газообразное — водяной пар.

При нормальном атмосферном давлении (760 мм рт. ст., 101 325 Па) вода переходит в твердое состояние при температуре 0°C и кипит (превращается в водяной пар) при температуре 100°C . При снижении давления температура таяния льда медленно растёт, а температура кипения воды — падает. При давлении в 611,73 Па (около 0,006 атм.) температура кипения и плавления совпадает и становится равной $0,01^{\circ}\text{C}$. Такое давление и температура называются тройной точкой воды. При более низком давлении вода не может находиться в жидком состоянии, и лёд превращается непосредственно в пар. Температура возгонки (сублимации) льда падает со снижением давления. При высоком давлении существуют модификации льда с температурами плавления выше комнатной.

Наиболее упорядоченную структуру имеет кристаллическая вода (лёд) при нормальном давлении и температуре ниже нуля градусов Цельсия. Кристаллы ее имеют гексагональную структуру. В элементарную ячейку входят четыре молекулы воды. Структура ячейки изображена на рис. 4.2. Вокруг центрального атома кислорода расположены в вершинах правильного тетраэдра на расстояниях 2,76 А четыре других атома кислорода. Каждая молекула воды соединена с соседними четырьмя водородными связями. При этом угол между ОН-связями в молекуле приближается к «тетраэдрическому» значению $109,1^{\circ}$. В свободной молекуле он равен приблизительно 105° .

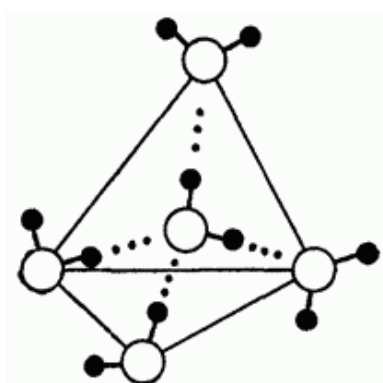


Рис. 4.2. Структура льда. Каждая молекула воды соединена водородными связями (три точки) с четырьмя молекулами воды, находящимися в вершинах тетраэдра.

Решетка льда весьма рыхлая и содержит много «пустот», так как число ближайших молекул воды у каждой молекулы (координационное число)

равно только четырем. При расплавлении решетка льда частично разрушается, одновременно заполняются некоторые пустоты, и плотность воды становится больше плотности льда. Это одна из основных аномалий воды. При дальнейшем нагревании до 4°C процесс уплотнения продолжается. При нагревании выше 4°C возрастает амплитуда ангармонических колебаний, уменьшается число ассоциированных молекул в комплексах (роях) и плотность воды уменьшается. В состав роев при комнатной температуре входит около 240 молекул, при 37°C — около 150, при 45 и 100°C соответственно 120 и 40.

В жидкой воде наряду с остатками тетраэдрической структуры льда имеются линейные и циклические димеры и другие комплексы, содержащие 3, 4, 5, 6 и более молекул. Существенно, что в зависимости от числа молекул в цикле меняется угол β , образованный между связью ОН и водородной связью (рис. 4.3). В димере этот угол равен 110° , в пятичленном кольце $\beta \approx 10^{\circ}$, а в шестичленном кольце и гексагональной структуре льда он близок к нулю («линейная» водородная связь).

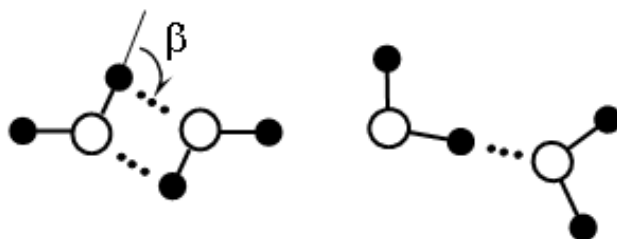


Рис. 4.3. Водородная связь в димере воды ($\beta=110^{\circ}$) и «линейная» водородная связь ($\beta=0$)

Говоря о роли воды в биологических явлениях, следует отметить, что все живые организмы весьма успешно приспособились к определенной величине водородной связи между молекулами H_2O . Об этом свидетельствует тот факт, что замена H_2O молекулами тяжелой воды D_2O оказывает весьма существенное влияние на биологические системы. Уменьшается растворимость полярных молекул, уменьшается скорость прохождения нервного импульса, нарушается работа ферментов, замедляется рост бактерий и грибов и т. д. Возможно, все эти явления связаны с тем, что водородное взаимодействие между молекулами D_2O сильнее, чем взаимодействие между молекулами H_2O . На большее значение водородной связи между молекулами тяжелой воды указывает более высокая температура ее плавления ($3,8^{\circ}\text{C}$) и большая теплота плавления ($1,51$ ккал/моль). Для обычной воды теплота плавления $1,43$ ккал/моль.

4.2. Структура воды в жидком состоянии

Водородные связи в жидкой воде легко разрушаются и быстро образуются вновь, что делает структуру воды непостоянной и изменчивой во

времени. Этот процесс приводит к неоднородностям в структуре воды, характеризующей воду как ассоциированную неоднородную 2-х фазовую жидкость с ближним порядком, т. е. упорядоченностью во взаимном расположении атомов и молекул, которая (в отличие от дальнего порядка) повторяется на расстояниях, соизмеримых с расстояниями между атомами. Жидкость является динамической системой: атомы, ионы или молекулы, сохраняя ближний порядок во взаимном расположении, участвуют в тепловом движении, характер которого гораздо более сложный, чем в кристаллах.

Существуют несколько моделей, описывающих структуру жидкостей – микрокристаллические, квазикристаллические, фрактальные и фрактально-клатратные модели.

Микрокристаллическая модель Дж. Бернала и П. Фаулера предполагает, что в жидкости существуют группы молекул – микрокристаллы, содержащие несколько десятков или сотен молекул. Внутри каждого микрокристалла в точности сохраняется порядок твердого тела.

Согласно кинетической теории жидкости Я.И. Френкеля, называемой также моделью «прыжок-ожидание», структурные свойства жидкостей связаны с особенностями теплового движения их молекул. Тепловое движение молекул воды описывается двумя параметрами: периодом колебаний молекулы около положения равновесия и временем «оседлой жизни», т. е. временем колебаний около одного определенного положения равновесия. Среднее время «оседлой жизни» τ молекулы, в течение которого молекулы воды сохраняют неизменную равновесную ориентацию, называется временем релаксации τ :

$$\tau = \tau_0 e^{W/RT},$$

где τ_0 – средний период колебаний молекулы около положения равновесия (сек), W – величина барьера потенциальной энергии, отделяющего друг от друга два соседних положения равновесия (Дж), R – постоянная Больцмана (Дж/К), T – абсолютная температура (К).

Благодаря тепловым флуктуациям молекула воды в течение времени «оседлой жизни» колеблется в положении равновесия, совершая колебательные движения, а затем перескакивает на другое место, имея тем самым возможность перемещаться по всему объему жидкости, что объясняет высокую текучесть воды. Тепловое движение молекул воды приводит к непрерывному изменению расстояний между ними, что приводит к флуктуациям – непрерывно происходящим отклонениям не только от средней плотности, но и от средней ориентации, так как молекулы воды способны образовывать группы, в которых преобладает определенная ориентация. По мере повышения температуры и увеличения энергии теплового движения молекул воды происходит постепенный распад ассоциативных образований и частичный разрыв водородных связей с

нарастающим уменьшением времени «оседлой жизни» каждой молекулы воды.

Квазикристаллическая модель предполагает, что относительное расположение частиц в жидкости приближается к существующему в кристалле; отступление от правильности увеличивается с расстоянием по мере удаления от исходной молекулы. На большом расстоянии уже не наблюдается правильности в расположении молекул. Каждая молекула воды окружена соседними молекулами, которые располагаются вокруг нее почти так же, как и в кристалле льда. Однако во втором слое появляются отклонения от упорядоченности, которые увеличиваются по мере отдаления от исходной молекулы.

«Фрактальные» модели рассматривают воду как сложную динамическую систему, состоящую из замкнутых пространственных ассоциатов – кластеров $(\text{H}_2\text{O})_n$, кластерных ионов $[(\text{H}_2\text{O})_n]^+$ и $[(\text{H}_2\text{O})_n]^-$, в основе молекулярной структуры которых лежит объемный скелет (ячейка) из отдельных молекул воды, объединенных друг с другом в многомолекулярный ассоциат наподобие клатрата, имеющий форму правильного полиэдра (рис. 4.4.).

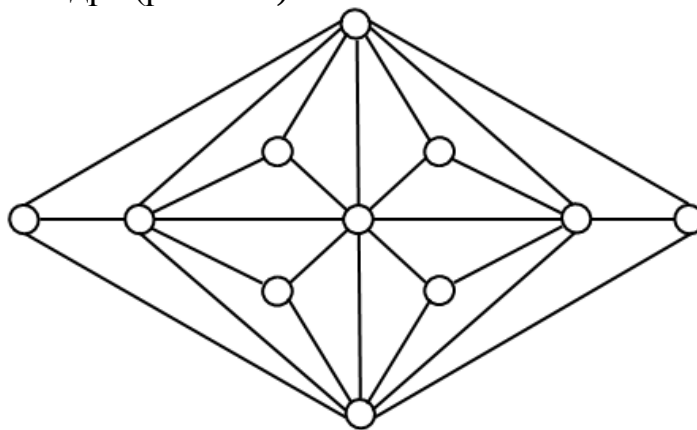


Рис. 4.4. Модель полиэдральной упаковки пространственных ассоциатов молекул и кластеров воды

В 1957 г. С. Фрэнк и У. Уэн предложили модель воды, предусматривающую произвольные образования из ассоциатов воды – «мерцающих кластеров», находящихся в динамическом равновесии со свободными молекулами воды. Водородные связи в воде непрерывно образуются и рвутся; эти процессы протекают кооперативно в пределах короткоживущих ассоциативных групп молекул воды, времена жизни которых по расчетам составляют от 10^{-10} до 10^{-11} секунд. О. Лобода и В. Гончарук приводят данные о существовании кластеров воды, состоящих из 280 молекул воды, размером до 3 нм.

Согласно исследованиям воды методами лазерной спектроскопии и масс-спектрометрии, кластеры, содержащие в своем составе 20 молекул H_2O и протон в составе иона гидроксония H_3O^+ , формируют кластерные ионы

состава $(\text{H}_2\text{O})_{20}\text{H}_3\text{O}^+$ или $(\text{H}_2\text{O})_{21}\text{H}^+$, которые оказались наиболее устойчивыми (рис.4.5). Устойчивость таких кластерных ионов объясняется

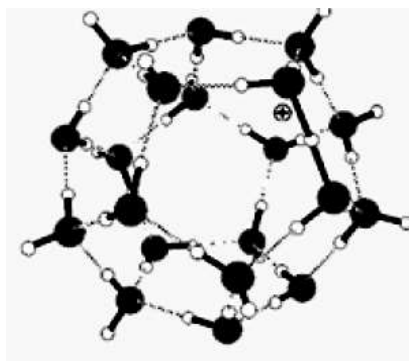


Рис. 4.5. Кластерный ион (клатрат) состава $(\text{H}_2\text{O})_{20}\text{H}_3\text{O}^+$ из 20 молекул воды с протоном H^+ в составе иона гидроксония H_3O^+

особой клатратной, т.е. имеющей полости, структурой, в которой 20 молекул воды формируют 12-гранный многоугольник - додекаэдр, в полостях которого располагается протон в виде иона гидроксония H_3O^+ . Это объясняется тем, что из всех кластеров только додекаэдр обладает достаточно большими полостями, способными вместить в себя ион гидроксония H_3O^+ , который помещается внутри додекаэдра. Природа взаимодействия протона с кластером обусловлена ван-дер-ваальсовыми и кулоновскими силами, определяющими особый вид зарядово-комплементарной связи, за счет которого осуществляется построение структурных элементов воды в ячейки (клатраты) размером 20-50 нм. В природных условиях полости в клатратах воды могут занимать молекулы углеводородных (метан, аргон, гелий) и благородных газов (аргон), образуя кристаллогидраты.

4.3. Состояния воды в биологических объектах

Вода, локализованная в клетке или связанная с поверхностью биомакромолекулы, в значительной степени отличается своими параметрами от так называемой свободной воды.

В качестве общего свойства биологических объектов можно рассматривать их способность образовывать поверхности раздела фаз (клетки, компартменты, органеллы и т.п.). Свойства жидкости вблизи поверхности изменяются, а их аномалии служат тестом на наличие поверхностно измененных жидких слоев, в частности слоев воды.

Влияние поверхности на близлежащие слои жидкости (воды) заключается в том, что структура жидкости упорядочивается. Толщина поверхностного упорядоченного слоя воды, по разным данным, составляет от 10 до 100 нм. Свойства жидкости на границе с поверхностью изменяются. Граничная зона воды обладает такими особенностями как повышенная

сдвиговая упругость, повышенная теплопроводность, аномальная температурная зависимость коэффициента теплового расширения. Все эти изменения объясняются ориентирующим влиянием поверхности, а также влиянием многочисленных поверхностей раздела фаз внутри клетки. Таким образом, приобретая упорядоченную структуру, вода меняет свои свойства.

Упорядоченная вода принимает участие во внутриклеточных процессах как на уровне ультраструктуры, так и молекулярной организации, облегчая перенос свободных радикалов и протонов в биохимических реакциях, участвуя в процессе мышечного сокращения, в частности в скольжении нитей, а также в процессах транспорта веществ внутри клетки и через клеточную мембрану.

К числу методов исследования клеточной воды можно отнести метод инфракрасной спектроскопии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), радиочастотной диэлектрической спектроскопии, спектроскопию биологических объектов в поле переменного тока и термодинамические методы. Данные, полученные с помощью этих методов, свидетельствуют, что большая часть воды в биологических системах мало отличается по своим структурным характеристикам от обычной воды. В биологических системах, в клетках и тканях существуют все структурные организации воды (клатраты, кластеры и т. д.).

Для биосистем особенно существен механизм дальнего действия, который присущ воде, а тем более упорядоченной воде, то есть способность передавать энергию и с большой скоростью проводить сигналы по упорядоченным цепочкам молекул. Этот механизм определяет роль структуры воды в межмолекулярных взаимодействиях. Особое значение имеет взаимосвязь структуры макромолекулы и воды, которые образуют систему с обратной связью, причем с такой связью, которая может изменять свой знак и регулироваться присутствием ионов. Вода оказывается тем звеном, через которое развивается лавина цепных реакций, играющих столь важную роль в биологии, либо средой, через которую осуществляются автоколебания.

Молекулы воды являются интегральной частью молекул многих белков, метаболическая активность которых – результат функционирования всего комплекса биомолекула-вода. Однако вода не только участвует в организации пространственной структуры биологических мембран, но и активно действует на происходящие в них процессы. Изменение гидратации мембран существенным образом меняет равновесие сил в пределах тройной системы белок-липид (детергент)-вода и вызывает ее глубокую перестройку. В результате меняется лабильность всей системы в целом и ее способность к выполнению своих биологических функций. В качестве одного из основных механизмов регуляции метаболических реакций в клетке являются процессы сорбции-десорбции белков на мембранах и других биологических структурах под действием биологически активных веществ, гормонов, ионов кальция, различных метаболитов, поступления субстратов реакций, а также лекарственных веществ (анестетиков, нейролептиков и др.). Основу

подобных процессов составляют особенности взаимодействия белков с водой, позволяющие влиять на их регуляцию путем очень слабых взаимодействий. Следовательно, вода наряду со своим регуляторным воздействием на процессы функционирования белковых макромолекул и мембранных структур играет несомненную общерегуляторную роль на уровне клетки в целом.

Таким образом, состояние воды в биологических системах соответствует представлениям о непосредственном участии воды в формировании нативной структуры биологических макромолекул, а также о возможности воздействия изменений ее структуры на ход и эффективность обменных реакций и на процессы, протекающие при замораживании.

4.4. Свойства воды в биополимерах, мембранах, клетках и тканях

Состояние воды характеризуется её *структурой*, соотношением *свободной* (с неизменными физико-химическими свойствами) и *связанной* (с измененными физико-химическими свойствами вследствие взаимодействия с неводными компонентами) воды. Ведь вода не может сохранять в неизменном виде все свои свойства, находясь в сложнейшей гетерогенной среде биообъектов, где неизбежны самые разнообразные взаимодействия с ионами, молекулами других веществ, где действуют векторные факторы внутриклеточных полей, вдоль силовых линий которых могут ориентироваться диполи воды.

С введением физических методов исследования - ядерного магнитного резонанса (ЯМР), электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), диэлектрической спектроскопии, инфракрасной спектроскопии - появилась возможность характеризовать состояние воды подвижностью ее молекул (трансляционной, вращательно-колебательной), энергией и числом водородных связей, в том числе и в биологических объектах.

Уровень макромолекул. Взаимодействие высокополимерных веществ с водой включает следующие виды:

1. гидратацию ионизированных и полярных групп;
2. стабилизацию структуры (иммобилизацию) воды около неполярных групп («гидрофобная гидратация»).

Гидратация ионизированных ($-\text{NH}_3^+$, $-\text{COO}^-$) и гетерополярных групп ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{CONH}_2$, $> \text{C} = \text{O}$, $> \text{NH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{SH}$) состоит в электростатическом притяжении молекул воды. Между этими двумя видами гидратации существуют только количественные различия. Степень гидратации зависит от количества этих групп на поверхности макромолекул, характера их расположения и соответствия структуре воды. Этим определяется связь степени гидратации с конформационными изменениями макромолекул. Гидратная вода располагается около гидрофильных радикалов и состоит из нескольких молекулярных слоев.

В основе полимолекулярной гидратации лежит кооперативный характер образования водородных связей. Определенная ориентация

монослой молекул воды около полярных групп макромолекул создает благоприятные условия для возникновения других водородных связей с соседними молекулами воды, вследствие чего ее структура упрочняется. Данные ЯМР и ЭПР показывают, что существуют 2-3 слоя воды с ограниченной подвижностью около поверхности макромолекулы, помимо воды, непосредственно взаимодействующей с полярными группами. Различают две категории связанной воды: *прочно связанная* - монослой гидратной оболочки, где подвижность молекул по сравнению с чистой водой снижена на 3-4 порядка; *менее прочно связанная вода* двух следующих слоев молекул, где подвижность воды снижена на 2 порядка. Для сравнения отметим, что у льда подвижность воды снижена на 6 порядков.

Количество гидратной воды у белков составляет около 0,3 г на 1 г белка. В пересчете на молярные соотношения эта величина означает, что одной молекулой белка связывается 850-1000 молекул воды, т. е. в среднем менее 1 моль на аминокислотный остаток. На гидратацию высокополимерных веществ большое влияние оказывает рН среды, который предопределяет количество ионизированных групп. В изоэлектрической точке степень гидратации будет наименьшей. Отнятие у белков связанной воды сопровождается изменениями третичной структуры макромолекул, определяющей индивидуальность и функционирование белка. Более чувствительны к дегидратации белки с высокоразвитой третичной структурой, т. е. ферменты и другие активные белки мембран.

Взаимодействие гидрофобных групп белка, например, остатков аланина ($-\text{CH}_3$), валина ($-\text{C}_3\text{H}_7$), фенилаланина ($-\text{C}_7\text{H}_7$), сопровождается ослаблением их взаимодействия с водой. Молекулы воды как бы выталкиваются из той сферы, в которой возникает сближение неполярных частей полипептидных цепочек, что также стабилизирует структуру воды и называется «гидрофобной гидратацией».

Особое положение занимает *иммобилизованная макромолекулами вода*. Иммобилизация представляет собой захват воды при конформационных изменениях макромолекул или их комплексов. При этом вода оказывается заключенной в замкнутом пространстве внутри макромолекулы или между макромолекулами. Белки могут иммобилизовать воды в 30 раз больше, чем весят сами.

Уровень мембран. Возможности взаимодействия воды с неводными компонентами расширяются при переходе к более сложным структурам. Мембраны содержат 25-30 % воды, причем она связана не только с белками, но и с полярными частями липоидов. Не вызывает сомнения структурообразующая роль воды в формировании мембран, так как строго ориентированные липоидные мицеллы образуются только в ее присутствии в результате гидрофобных взаимодействий неполярных частей молекул. Существует модель строения мембраны, где поверхностный слой представлен структурированной водой. При обезвоживании происходят изменение структуры мембраны, закрывание гидрофильных пор и снижение проницаемости.

Клеточный уровень. Все сказанное ранее относится и к клетке в целом. В зрелой клетке можно выделить две основные структуры, различающиеся по состоянию воды: мембраны клеток и цитоплазма.

1. Мембраны клеток содержат около 13 %, объем воды в них примерно 10 % объема ткани. Состояние воды в мембранах клеток неодинаковое. Примерно 1/3 часть ее гидратирует вещества и имеет сниженную подвижность, 2/3 представляет воду с такой же подвижностью молекул, как у обычной воды. Это наиболее лабильная, легкообмениваемая вода клетки.

2. Цитоплазма занимает 80-90 % объема клетки и содержит осмотически связанную воду. Оводненность органелл составляет 65 %, цитозоля -95 -98 %. В ядре содержится 20-30 %, в митохондриях - 5-7 % воды цитоплазмы.

Оставшуюся в клетках после воздействия гипертонического раствора воду нельзя считать «связанной» в точном физическом смысле, т. е. водой, взаимодействующей с неводными компонентами и вследствие этого имеющей пониженную подвижность молекул, так как часть её удерживается мембранами. Тем не менее, водоудерживающую способность можно использовать как физиологическую характеристику подвижности воды.

Тканевой уровень. Вода входит в состав тканевой жидкости. Например, объем лимфы в организме человека 1-2 л. Основной составляющей лимфы является вода. Тканевая жидкость служит посредником между клеточными элементами тела и кровью. Из нее клетки получают все питательные вещества и ей отдают продукты обмена. Обмен всегда сопровождается выходом из крови и тканей растворенных веществ и воды. Часть тканевой жидкости из межклеточных пространств проникает через стенку лимфатических капилляров, оттекая по ним в лимфатические сосуды, по которым возвращается в кровь в венозной части сосудистой системы.

Таким образом, состояние воды в биологических системах соответствует представлениям о непосредственном участии воды в формировании структуры биологических макромолекул, а также о возможности воздействия изменений ее структуры на ход и эффективность обменных реакций.

4.5. Дегидратация биообъектов

Вода составляет основу организма. Клетки буквально «плавают» в водном растворе межклеточной жидкости. В самой же клетке вода находится в двух формах: свободной и связанной. Из всей этой клеточной воды свободная вода составляет 95 %.

Свободная вода участвует в биохимических реакциях. В ней растворены органические и минеральные вещества. При высушивании и замораживании свободная вода легко удаляется. При удалении свободной воды гибели клетки не происходит.

Снижение содержания свободной (биологически активной) воды есть физико-химическая основа перехода к любому из трёх известных на сегодня видов анабиоза. А это есть «анабиоз в результате высыхания», «анабиоз в результате глубокого охлаждения», «анабиоз в результате нахождения в среде с высокой концентрацией солей и высоким осмотическим давлением». Таким образом, отнятие воды из клеток (высушивание и осмос), или при её иммобилизации (замораживание) является путем к какому-либо виду анабиоза.

Связанной называют воду, молекулы которой физически или химически соединены с другими веществами. Она не растворяет кристаллы, не активизирует многие биохимические процессы. Связанная вода входит в состав коллоидов клетки и с трудом высвобождается из них. С потерей связанной воды нарушаются клеточные структуры, и наступает гибель клетки.

Дегидратация - важный фактор, влияющий на структуру и жизнеспособность биологических объектов при низкотемпературном консервировании.

В процессе эволюции клетка унаследовала от первичной жизнеспособной структуры способность обратимо снижать содержание воды, что способствует сохранению структуры клетки и ее функций. При замораживании дегидратация может стать как причиной повреждения в результате гипертонического стресса, так и способом предотвращения внутриклеточного кристаллообразования.

Для поддержания сбалансированной упаковки молекул биологических мембран важно поддержание на оптимальном уровне всех фракций воды, входящих в состав биополимеров и мембран клетки. При переходе воды в твердое состояние в процессе охлаждения вымерзает не только свободная вода, но и часть связанной воды. Степень ее вымерзания зависит от температуры и других, сопутствующих криоконсервированию факторов. Так, при замораживании системы лецитин-вода до минус 50°C образуется больше льда, чем при охлаждении до минус 30°C, что указывает на включение части связанной воды в структуру льда.

Уровень гидратации мембран и белков в существенной мере влияет на их стабильность, особенно при воздействии отрицательных температур. Дегидратация липидов сопровождается лиотропным мезоморфизмом липидных бислоев и сдвигом фазовых переходов в область более высоких температур. Холестерин, эффективно устраняющий фазовый переход при оптимальном содержании воды в мембране, в условиях обезвоживания кластеризуется в отдельную фазу, что приводит к более облегченному воздействию льда на дегидратированный фосфолипидный слой, лишенный своего естественного пластификатора – холестерина. Методами ЯМР высокого разрешения, рентгеновской дифракции установлено, что дегидратация эритроцитов и микроорганизмов приводит к разделению липидных и липопротеиновых фаз, потере барьерных свойств мембран из-за формирования в них трансмембранных дефектов, через которые происходит

потеря внутриклеточной воды, ионов и небольших молекул, аномально высокая проницаемость для непроникающих в норме в клетку веществ. При дегидратации клеток, вызванной затвердеванием внеклеточной воды и действием экзогенных растворов солей, происходит нарушение структуры и функции внутриклеточных органелл, имеющих явно выраженное мембранное строение (лизосомы, митохондрии, структуры саркоплазматического ретикулума).

4.6. Действие низких температур на обезвоженные объекты

Несмотря на феноменальную устойчивость некоторых существ к полному высушиванию, для среднестатистической клетки обезвоживание — это стресс, в первую очередь это гиперосмотический стресс, который развивается по следующему сценарию.

Сначала происходит обезвоживание околоклеточного пространства с закономерным возрастанием концентрации растворенных веществ, т.е. образуется гиперосмотическая среда. Она вытягивает воду из клетки, тем самым обезвоживая её. Клетка теряет объем, а ее плазматическая мембрана сморщивается. Одновременно возрастает внутриклеточная концентрация электролитов, которые, разрушая ионные связи, снижают стабильность белковых молекул.

Эволюция микроорганизмов противопоставила процессу обезвоживания процесс накопления *ксеропротекторов* — соединений, защищающих микробные клетки от гиперосмотического стресса. Эти вещества стабилизируют белковые глобулы и биомембраны, замещая в них молекулы воды и облегчая тем самым переход коллоидов в аморфное состояние. Наиболее распространенным ксеропротектором является дисахарид трегалоза, который выгодно отличается высокой температурой стеклования и неспособностью вступать в реакцию с молекулами белков. Обезвоженные клетки становятся чрезвычайно устойчивыми к действию экстремальных условий внешней среды и в первую очередь — низких температур. Подтверждением этого является факт успешного возрождения плодов смолёвки узколистой (*Silene stenophylla*) целого растения после того, как сухие плоды-коробочки пролежали в вечной мерзлоте около 30 тысяч лет. Это характеризует в большей степени состояние гипобиоза, т.к. при температуре минус 7°C полного промерзания тканей, с прекращением подвижности молекул связанной воды, не происходит. Но, тем не менее, это подтверждает возможность чрезвычайно длительного низкотемпературного хранения обезвоженных клеток.

Заморозить организм с последующим возвращением к жизни без предварительного высушивания сложнее. Теоретически при температурах ниже минус 80 ÷ 90°C броуновское движение молекул воды в тканях прекращается, и организм должен погрузиться в состояние так называемого «криоанабиоза». В природных условиях такое невозможно, и поэтому

криоанабиоз — состояние неестественное, возможное только в условиях лаборатории.

Практически все виды микроорганизмов могут благополучно пережить «шоковую» заморозку, когда охлаждение происходит так быстро, что вода мгновенно переходит в аморфное состояние, не успев кристаллизироваться. Замораживание же многоклеточного организма значительно сложнее, т.к. связано с решением проблемы снижения скорости охлаждения, обеспечивающей переход воды в аморфное, а не кристаллическое состояние. Важную роль в этом случае играют криопротекторы — вещества, придающие организму устойчивость к замерзанию. Некоторые из криопротекторов являются одновременно ксеропротекторами, что лишний раз доказывает сходство механизмов ксеро- и криоанабиоза.

Во всех случаях анабиоза обнаруживается один механизм: жидкая вода меняет свое агрегатное состояние, либо испаряясь (ксероанабиоз), либо замерзая (криоанабиоз). Поэтому идеальным вариантом погружения в анабиоз является сочетание вакуумного обезвоживания с замораживанием и хранением биообъекта при сверхнизких температурах. В этом состоянии организм максимально устойчив ко многим экстремальным факторам внешней среды.

4.7. Эвтектическая точка растворов и кристаллизация

Клеточный сок содержит в растворе органические и неорганические вещества. Температура замерзания раствора лежит в пределах минус $0,4 \div$ минус $4,0^{\circ}$ С. При температуре замерзания из водного раствора начинает вымерзать вода. По мере вымораживания воды остаточная концентрация раствора возрастает и температура замерзания еще более понижается вплоть до эвтектической точки.

Эвтектика (от греч. eutektos - легкоплавящийся) - жидкая фаза, находящаяся в равновесии с двумя или более твердыми фазами. Температура кристаллизации эвтектики называется *эвтектической точкой*. Продукт кристаллизации жидкой эвтектики - твердая эвтектика, высокодисперсная смесь нескольких твердых фаз того же состава, что и у жидкой эвтектики (подробнее см. главу 6).

4.8. Кристаллизация воды при замораживании

При охлаждении физиологических солевых сред, как только их температура падает ниже точки замерзания по всему объему жидкости, начинается выпадение кристаллов льда.

Строение таких кристаллов льда не отличается от строения кристаллов, образовавшихся в чистой воде. Эти кристаллы, однако, отделены друг от друга канальцами, заполненными концентрированными солевыми растворами. По мере понижения температуры кристаллы льда растут за счет уменьшения количества жидкости, заполняющей канальцы. Форму этих

растущих кристаллов изучают при помощи специальных микроскопов с устройством для охлаждения исследуемых проб до очень низких температур. Скорость роста кристаллов, а также их форма зависят от природы раствора и от скорости охлаждения. До достижения эвтектической точки кристаллизация льда происходит постепенно. Затем внезапно жидкость в протоках между крупными кристаллами льда мутнеет вследствие образования многочисленных мельчайших кристалликов, состоящих из смеси соли или солей со льдом.

Процесс кристаллизации состоит из двух фаз, включающих зарождение кристаллов и их рост. С понижением температуры снижается кинетическая энергия молекул воды, начинают образовываться центры кристаллизации. Зарождение кристаллов происходит при упорядочении группы молекул воды и сохранении этой структуры с последующим ее укрупнением за счет вовлечения новых молекул воды. Зародыши кристаллов могут появиться не только в результате спонтанной агрегации молекул воды, но и при участии в этом процессе примесей, например, белков, метаболитов и т. д. В первом случае зародышеобразование называется гомогенным, во втором – гетерогенным. Таким образом, в процессе гетерогенного зародышеобразования центрами кристаллизации могут служить примеси, а в процессе гомогенного – случайно возникшие молекулярные ассоциации. При понижении температуры перед началом кристаллообразования протекает процесс переохлаждения. В отсутствие переохлаждения превращение кластеров в способные к росту кристаллические зародыши энергетически не выгодно, так как приводит к увеличению их поверхностной энергии. Образование поверхности раздела ведет к энергетическому проигрышу, который может быть скомпенсирован снижением энергии системы при отводе от нее тепла.

В биологических системах вода содержит различные гетероморфные включения (соли, биомолекулы, метаболиты и т. д.). Поэтому с позиций гетерогенного кристаллообразования клетку можно рассматривать как систему, находящуюся в определенной готовности к процессу зародышеобразования кристаллов льда. В обычных условиях гетерогенное зародышеобразование происходит при участии примесей и поверхностей раздела.

Скорость роста и структура формирующихся кристаллов льда в биологических системах зависят от числа зародышевых центров, скорости охлаждения и конечной температуры замораживания. Если степень переохлаждения низкая, то скорость образования зародышей будет небольшая. По мере возрастания степени переохлаждения скорость образования зародышей кристаллов значительно увеличивается. В первую очередь начинает замерзать та часть воды, которая имеет более слабые связи с гидрофильными коллоидами, в которой меньше содержится растворенных веществ. Растворимые примеси, увеличивающие поверхностную энергию активации на границе кристалл – жидкость, как правило, тормозят процесс образования центров кристаллизации и смещают границу метастабильности

в сторону больших переохлаждений. Для предотвращения отрицательных последствий сильно переохлажденной жидкости в криобиологических экспериментах используют так называемый метод индуцированной кристаллизации. Этот метод используется для предотвращения повреждения недостаточно обезвоженных клеток, подготавливаемых для низкотемпературного консервирования. Такой прием применяют, например, при замораживании таких крупных клеток, как эмбрионы человека и животных на ранних стадиях развития.

Для индукции кристаллообразования обычно используют так называемые «затравки» (соли серебра, льдинки и т. п.), которые вносят в переохлажденную систему при определенной температуре перед замораживанием. В результате такого воздействия система кристаллизуется с образованием мелкозернистого льда, который не оказывает столь повреждающего действия на биообъекты, как гексагональные формы льда. Ионы в качестве центров кристаллизации малоэффективны, так как, согласно теории гидратации, способны разрушать льдоподобную структуру воды и при замерзании вытесняются фронтом кристаллизации в жидкую фазу.

4.9. Формы воды в твёрдом состоянии

При замораживании водных систем, содержащих биологические объекты, происходит фазовый переход воды в твердое состояние, с формированием вне- и внутриклеточных кристаллов льда. Вода формирует большое число модификаций твердых фаз по сравнению с другими известными веществами.

Благодаря внутреннему устройству самой молекулы воды и водородным связям, соединяющим все молекулы в упорядоченную систему, образуется прежде всего гексагональная (шестиугольная) кристаллическая решетка льда. Ближайшие друг к другу молекулы (одна центральная и четыре угловых) расположены в форме трехгранной пирамиды, или тетраэдра, который лежит в основе гексагональной кристаллической модификации (рис. 4.6). Такое шестиугольное строение обыкновенного льда распространяется на весь его объем.

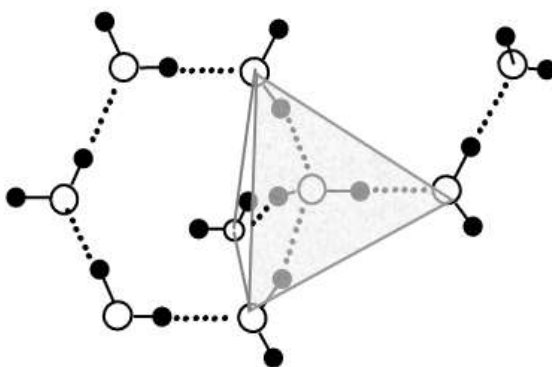


Рис. 4.6. Кристаллическая решетка льда. Выделена базовая часть решетки – тетраэдр

Привычный лед образуется при температуре от 0°C и ниже при давлении в 1 атмосферу (нормальное значение). Следовательно, для появления иных модификаций льда требуется изменение этих значений, и в большинстве случаев наличие низких температур и высокого давления, при которых происходит изменение угла водородных связей и реконструкция всей кристаллической решетки. На приведенной фазовой диаграмме (рис. 4.7) линии ограничивают области состояний «температура-давление», в которых устойчивой является та или иная модификация льда.

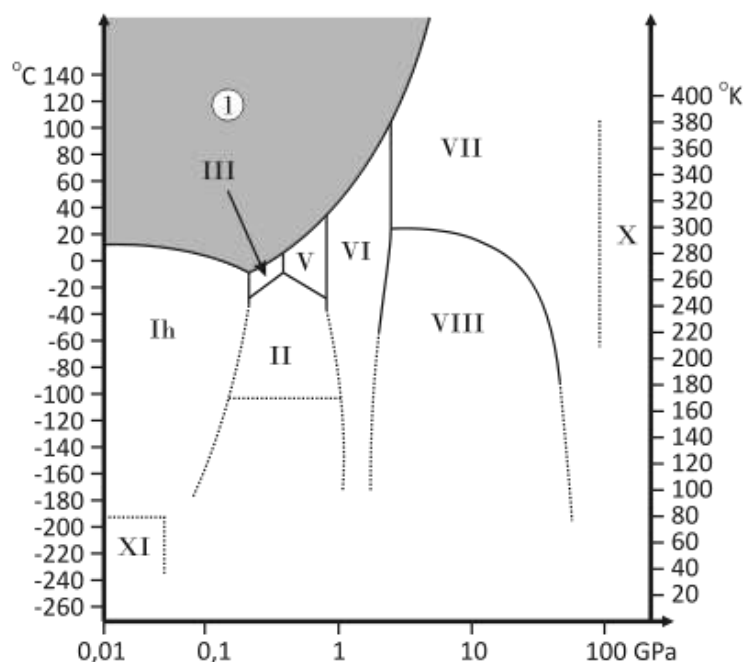


Рис. 4.7. Фазовая диаграмма льда. Давление (ГПа) в логарифмическом масштабе, температура слева — в градусах Цельсия, справа — Кельвина, 1 — жидкая фаза.

Каждая модификация льда относится к определенной сингонии — группе кристаллов, в которых элементарные ячейки обладают одной и той же симметрией и системой координат (оси XYZ). Всего же различают семь сингоний. В обычных условиях наиболее стабильной является фаза льда — I_h (приставка «h» означает гексагональную сингонию).

В этих же условиях может существовать и другая, метастабильная фаза льда — I_c , подобная фазе I_h , но кубической, а не гексагональной структуры. В природе образование этой разновидности льда изредка возможно только в верхних слоях атмосферы. При повышенных давлениях лед имеет одиннадцать кристаллических модификаций, области существования основных показаны на фазовой диаграмме льда (см. рис. 4.7). Лед II относится к тригональной сингонии. Он может образоваться из гексагонального типа при давлении около 3000 атм и температуре около

минус 75°C, или из другой модификации (лед V), путем резкого снижения давления при температуре минус 35°C.

При нагреве II модификации можно получить лед III, и наоборот, охлаждение льда III превращает его в лед II. Также лед III образуется, когда температуру воды постепенно понижают до минус 23°C, увеличивая давление до 3 000 атм. Льды III и V имеют четыре тройные точки с окружающими модификациями (термодинамические значения, при которых возможно существование разных состояний вещества). Лёд VI – тетрагональный кристаллический лёд. Образуется при охлаждении воды до –3 °C и давлении 1,1 ГПа. Лёд VII – кубическая модификация. Нарушено расположение атомов водорода. Водородные связи образуют две взаимопроникающие решётки. Лёд VIII – более упорядоченный вариант льда VII, где атомы водорода занимают фиксированные положения. Образуется из льда VII при его охлаждении ниже 5 °C. Лёд X – симметричный лёд с упорядоченным расположением протонов. Образуется при давлениях около 70 ГПа. Лёд XI – ромбическая низкотемпературная равновесная форма гексагонального льда. Является сегнетоэлектриком.

Кроме того, существует так называемая аморфная (или витрифицированная) фаза льда, которая образуется при медленной конденсации водяного пара при температуре сжиженного азота. Существуют также другие фазы, известные как клатратные гидраты, имеющие рыхлую и сложную структуру, заполненную молекулами инертных газов.

Таким образом, вода при замораживании способна формировать различные кристаллические фазы, структурные и физические особенности которых зависят от температуры, давления, наличия примесей.

4.10. Механизмы и особенности кристаллизации воды при разных скоростях замораживания

Как отмечалось ранее, в процессе замораживания сложного раствора можно выделить две стадии: первая – кристаллизация растворителя (воды), и вторая – затвердевание эвтектической смеси, куда входят остатки растворителя и растворенные в нем вещества.

Возникновение и рост кристаллов льда зависят от интенсивности отвода тепла (охлаждения) и степени переохлаждения, скорости замораживания и количества и концентрации растворенных веществ. Используемые в криобиологии скорости замораживания обычно относят к определенным группам. Чаще всего используемая классификация скоростей замораживания приведена в табл. 4.1.

Скорости замораживания имеют большое значение, поскольку позволяют регулировать степень дегидратации клеток и тканей в цикле криоконсервирования. Более того, степень элиминации свободной воды из клеток при замораживании является процессом, влияющим на уровень внутриклеточной кристаллизации. При высоких скоростях охлаждения (~100град/мин) некоторые виды клеток не успевают обезводиться и в них

наблюдается внутриклеточная кристаллизация. При низких скоростях охлаждения ($\sim 1 - 5$ град/мин) клетка в процессе охлаждения уменьшается на $1/3$ своего первоначального объема. В этом случае внутри клеток кристаллы льда либо совсем не формируются, либо размеры кристаллов не достигают критических. Скорость и конечная температура замораживания влияют на размер и форму кристаллов, формирующихся как вне, так и внутри клетки.

Таблица 4.1. Классификация скоростей замораживания биообъектов

Вид замораживания	Скорость снижения температуры, град/мин
Сверхбыстрое	5000 – 10000 и более
Быстрое	10 – 5000
Медленное	1 – 10
Очень медленное	Менее 1

Влияние скорости замораживания на рост кристаллов заключается в том, что при медленном охлаждении, когда пребывание системы в данном интервале температур достаточно велико, в ней формируются крупные кристаллы льда. С увеличением скорости замораживания увеличивается число зародышей кристаллообразования небольшого размера. При дальнейшем увеличении скорости замораживания достигается витрифицированное (стеклообразное) состояние системы с возможными включениями незавершенных кристаллических структур и аморфных участков.

При очень медленном замораживании ($\sim 0.5 - 1$ град/мин), когда имеется достаточно времени для перестройки молекул воды, возникают упорядоченные структуры льда гексагональной формы. При повышении скорости замораживания ($5 - 10$ град/мин) гексагональные кристаллы льда трансформируются, и вначале образуются структуры типа неправильных дендритов, а затем, при еще большем увеличении скорости замораживания, – сферулиты, характерной чертой которых является радиально расположенная лучистость, идущая от центра кристаллизации. При сверхбыстрых скоростях замораживания в тонком слое (1000 град/мин и выше), когда молекулярная структура воды не успевает перестроиться и процесс кристаллизации остается незавершенным, возникают аморфные структуры или структуры типа быстро исчезающих сферулитов, при которых различия между льдом и раствором исчезают. Такое состояние называется витрифицированным, или стеклообразным. Стеклообразная форма системы представляет собой особое состояние переохлажденной жидкости, которая из-за большой вязкости приобретает свойственную твердым телам устойчивую форму. Это означает, что витрификация – это отверждение жидкости с образованием аморфного или стеклообразного состояния льда. При этом важен тот факт, что переход из жидкого состояния в стеклообразное состояние не сопровождается побочными эффектами, в результате чего степень повреждения биообъектов

в состоянии витрификации минимальна. Для водных растворов витрифицированное состояние может быть получено только при высоких скоростях замораживания ($\sim 10^4$ град/мин).

При высоких скоростях замораживания наблюдается следующая последовательность возникновения кристаллических структур: твердые компактные тела $\rightarrow$ дендриты $\rightarrow$ сферулиты $\rightarrow$ исчезающие сферулиты. Такое многообразие форм кристаллов при быстром замораживании свидетельствует о метастабильном состоянии системы и незавершенности ее структуры, переходящей друг в друга в зависимости от температуры. Процессы, которые сопровождаются молекулярной транслокацией кристалликов льда в замороженной матрице при ее затвердевании и отогреве, называются рекристаллизационными. Различают рекристаллизацию спонтанную, происходящую при снижении температуры, и индуцированную, развивающуюся при нагреве замороженной системы. Оба вида рекристаллизации в своей основе имеют одну и ту же природу – недостроенные кристаллы льда, отличающиеся скоростью выделения скрытой теплоты кристаллизации. Процессы рекристаллизации играют важную роль в криоповреждении биообъектов, поскольку укрупнение кристаллов льда может привести к механическим разрушениям биоструктур (подробнее см. главы 5 и 6).

Рекомендуемая литература:

1. Паундер Э. Р., Физика льда, пер. с англ., М.–1967.–188с.
2. Давыдов А. С. Биология и квантовая механика. – Киев : Наук, думка.– 1979.– 296 с.
3. Франкс Ф. Вода и водные растворы при температурах ниже 0°C. – Киев : Наук, думка.–1985. – 386 с.
4. Аксенов С.И. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. М. «Наука».–1990.–115с.
5. Каргаполов А.В., Г.М.Зубарева Г.М. Состояние воды в биологических системах (http://irika.narod.ru/Articles/Refer_Book/Water_state_in_biol_syst.htm)
6. Игнатов И., Мосин О.В., Великов Б. Математические модели, описывающие структуру воды // Науковедение. – 2013.– №3. – . С.1-25.
7. Кутимская М.А., М.Ю. Бузунова М.Ю. Роль воды в основных структурах живого организма // Успехи современного естествознания. – 2010. – № 10. – С. 43-45.

Глава 5. Физико-химические факторы и механизмы криповреждений биообъектов

5.1. Пусковой механизм криповреждений. 5.2. Внеклеточная кристаллизация
 5.3. Внутриклеточная кристаллизация 5.4. Рекристаллизация.
 5.5. Эвтектическая кристаллизация 5.6. Механические повреждения.
 5.7. Эффекты концентрированных растворов 5.8. Дегидратация – регидратация. 5.9. Фазовые переходы мембран. 5.10. Изменение концентрации водородных ионов (рН). 5.11. Электростатические эффекты.
 5.12. Сульфгидрильная гипотеза. 5.13. Температурный шок.
 5.14. Постгипертонический лизис. 5.15. Перекисное окисление.
 5.16. Двухфакторная теория криповреждений. 5.17. Мультифакторная теория криповреждений.

5.1. Пусковой механизм криповреждений

Замораживание-отогрев биологических объектов и вызванные этими процессами криповреждения непосредственно связаны с изменениями агрегатного состояния и фазовыми переходами содержимого клеток и тканей, а также окружающей их водной среды.

Агрегатное состояние – это состояние вещества или тела, зависящее от температуры и давления, которое характеризуется способностью или неспособностью сохранять объем и форму, наличием или отсутствием дальнего и ближнего порядка. Изменения агрегатного состояния сопровождается скачкообразными изменениями свободной энергии, энтропии, плотности и других физических свойств. Выделяют три основных агрегатных состояния веществ: *твердое, жидкое и газообразное*.

Фазовый переход – переход вещества из одной термодинамической фазы в другую (из одного агрегатного состояния в другое) при изменении внешних условий (например, температуры). Примерами фазовых переходов могут быть: плавление – кристаллизация; сублимация – десублимация и др. Так как вода составляет примерно 70% массы тканей животных, то переходы воды из жидкого состояния в твердое при замораживании, а затем снова в жидкое при размораживании, значительным образом влияют на целостность клеток и тканей. То есть дегидратация, образование кристаллов льда или аморфной фазы внутри и вне клетки, рост кристаллов, перекристаллизация и таяние – центральные процессы, происходящие во время замораживания-отогрева. Следовательно, именно *изменение агрегатного состояния* является пусковым механизмом формирования целого каскада факторов и процессов криповреждений. Концепция, утверждающая, что пусковым механизмом криповреждений при замораживании является формирование льда, была высказана еще в середине прошлого века Б. Люйе.

Характер затвердевания жидкой фазы биологических объектов и наличие комплекса криповреждающих факторов и процессов существенно зависят от методов и скоростей замораживания и оттаивания. Наиболее

полно они проявляются при медленных скоростях замораживания биологических объектов.

5.2. Внеклеточная кристаллизация

Понижение температуры жидких биологических систем ниже критических значений приводит к затвердеванию внеклеточной жидкости. В зависимости от скорости охлаждения и использования криопротекторов в результате кристаллизационного процесса могут образовываться как крупнокристаллические, так и мелкокристаллические структуры льда. Начало внеклеточной кристаллизации в значительной степени определяется уровнем переохлаждения раствора, температурным градиентом в охлаждаемой системе и скоростью теплоотвода. Названные факторы во многом определяют скорость роста, степень дисперсности и вид образующегося льда.

При охлаждении жидкости процесс кристаллизации начинается при наличии в среде зародышей кристаллов. Структура воды включает в себя льдоподобные структуры – кластеры, способные стать зародышами кристаллов. С понижением температуры доля кластеров и их агрегатов увеличивается. Зародыши кристаллов могут появиться и при участии примесей, например, белков, метаболитов и т. д. Превращение в способные к росту кристаллические зародыши энергетически невыгодно без переохлаждения. *Переохлаждение*, в данном случае, – это снижение температуры жидкости ниже температуры перехода в кристаллическую модификацию. Температура кристаллизации воды при нормальных условиях 0°C, соответственно жидкость должна переохладиться ниже этой температуры для того, чтобы из зародышей кристаллов сформировался полноценный кристалл – лед. Таким образом, достижение системой определенного уровня переохлаждения является непрямым условием возникновения зародышей кристаллов. Скорость образования зародышей кристаллов, как было сказано ранее, прямо пропорциональна уровню переохлаждения.

При внеклеточной кристаллизации рост кристаллов будет приводить к снижению концентрации жидкой фазы воды, увеличивая гипертоничность раствора, окружающего клетки. Высокая концентрация веществ, окружающих клетку, является следствием внеклеточного кристаллообразования, а ее действие называют *эффектом раствора*. Рост внеклеточного кристалла будет происходить как за счет вымораживания воды вне клетки, так и за счет той воды, которая выходит из клетки. Это ведет к дегидратации, уменьшению объема клетки и повреждению клеточной мембраны, что также негативно сказывается на выживании клетки. Кроме того, растущие внешние кристаллы льда могут вести к механическому повреждению клеток (Рис.5.1).

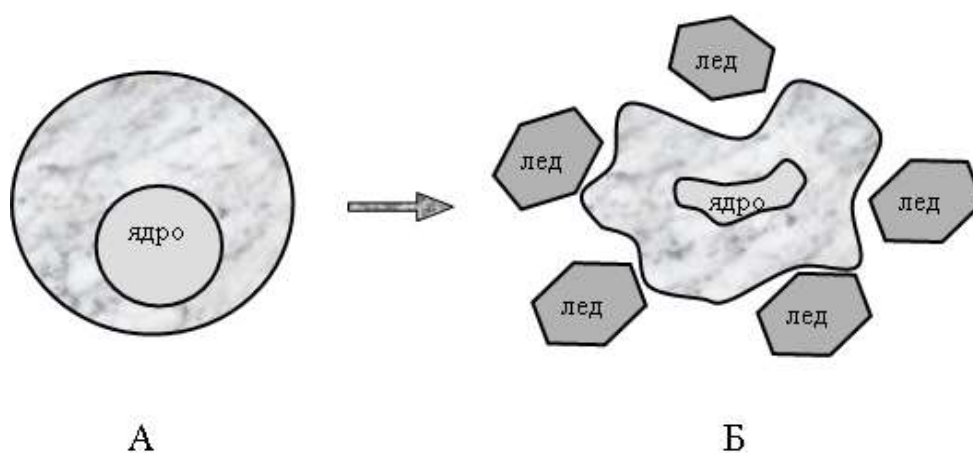


Рис. 5.1. Рост внеклеточных кристаллов и дегидратация клетки при замораживании. *А – клетка в изотоническом растворе до замораживания. Б – клетка в замороженном состоянии, окружённая кристаллами льда в гипертоническом растворе.*

Сохранность замороженных клеток может зависеть и от структуры образующегося льда. При образовании крупнокристаллических структур происходит концентрирование клеток в каналах между кристаллами льда. Тесный контакт клеток может стать причиной их агрегации.

Внеклеточная кристаллизация на начальных ее этапах может какое-то время играть определенную роль в защите клеток от появления в них кристаллов внутриклеточного льда.

5.3. Внутриклеточная кристаллизация

Вслед за внешней кристаллизацией наступает внутриклеточная кристаллизация воды (Рис.5,2, 5.3), которая во многом определяется скоростью охлаждения.

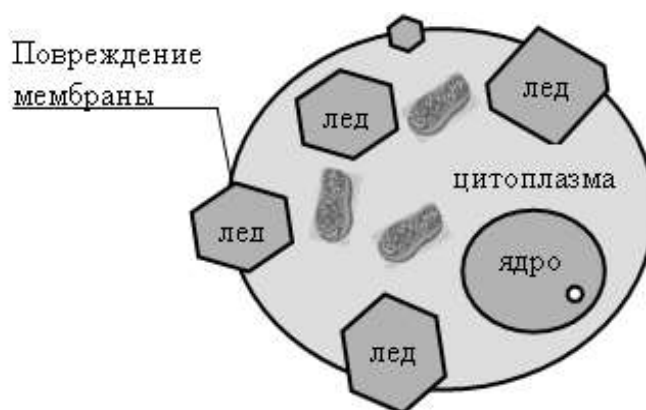


Рис. 5.2. Внутриклеточная кристаллизация при замораживании.

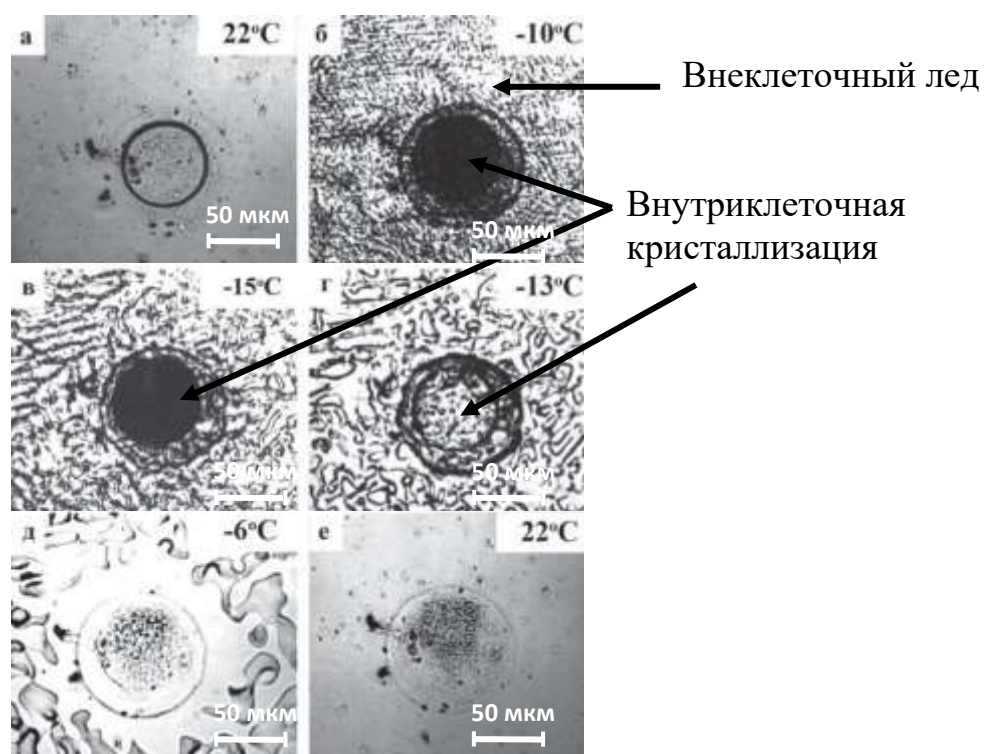


Рис. 5.3. Фотографии, демонстрирующие кинетику формирования льда и изменения клеток при медленном замораживании и оттаивании в физиологическом растворе. На фото видно, что с изменением температуры модифицируется структура и размеры кристаллов как внеклеточного, так и внутриклеточного льда. Рекристаллизация льда регистрируется и при замораживании, и при отогреве.

а – интактная клетка; б, в – замораживание (образование внеклеточного и внутриклеточного льда); г – отогрев (рекристаллизация льда); д – плавление льда; е – отогретая и поврежденная внутриклеточным льдом клетка.

Для различных видов клеток скорости, при которых может наблюдаться внутриклеточная кристаллизация, отличаются в десятки раз. Это обусловлено отличиями в размерах клеток, проницаемости их мембран для воды, структурных составляющих как мембраны, так и цитозоля. Образование внутриклеточного льда зависит не только от скорости охлаждения, но и от степени переохлаждения системы.

Внутриклеточный лед может образовываться при большом переохлаждении путем спонтанного зародышеобразования. Своеобразной «затравкой» для внутриклеточного льда может служить внеклеточный лед. Предполагается, что кристаллы льда, контактируя с мембраной клетки, вызывают их физическую деформацию, в результате которой в мембране возможно формирование разрывов и фактически сквозное прорастание внеклеточного льда через мембраны. Не исключается возможность того, что контакт внеклеточного льда с внешней поверхностью мембраны индуцирует в ней структурные изменения, в результате которых внутренняя поверхность мембраны становится эффективным катализатором внутриклеточного льда. В

качестве внешнего кристалла может выступать и соседняя клетка с внутриклеточным льдом. В данном случае лед в закристаллизовавшейся клетке рассматривается как внеклеточный по отношению к соседней клетке, а белки плазматической мембраны, взаимодействуя с внеклеточным льдом, выступают как катализаторы внутриклеточного зародышеобразования.

При внутриклеточном льдообразовании сохранность клеток зависит как от суммарного внутриклеточного объема кристаллов льда, так и от их фактического размера. Внутриклеточная кристаллизация часто рассматривается как одна из причин летальных последствий для клетки. Механизм повреждения в данном случае можно продемонстрировать на примере стеклянной бутылки с водой, выставленной на мороз. Она может треснуть, поскольку при замерзании объем кристаллической воды становится больше, чем жидкой, давя на стеклянные стенки бутылки. Подобное повреждение предположительно может происходить и с клетками.

Применение криопротекторов способствует умеренной дегидратации клеток, понижает точку кристаллизации растворов, чем существенно препятствует преждевременному появлению кристаллов льда. Увеличение скорости обезвоживания клеток – также один из механизмов их защиты от возникновения внутриклеточного льда. В частности, искусственная экспрессия аквапоринов в мембранах клеток, увеличивающая водный обмен, существенно улучшает способность клеток переносить замораживание.

Однако полная картина повреждений клеток при замораживании (в частности, внутриклеточным льдом) до сих пор остается не до конца ясной.

5.4. Рекристаллизация

В криобиологии под рекристаллизацией понимают процесс *укрупнения (достройки)* кристаллов льда в ходе криоконсервирования. В своей основе этот процесс имеет одну действующую силу – нестроенные, нестабильные структуры льда, которые имеют тенденцию к укрупнению. При высоких скоростях охлаждения температура образца падает настолько быстро, что процесс формирования стабильного льда попросту не успевает завершиться по достижении температуры ниже минус 160°C.

Обычно рекристаллизация льда происходит в диапазоне температур от минус 80 до минус 160°C, причем как при замораживании, так и при отогреве. Различают рекристаллизацию *спонтанную и индуцированную*.

Спонтанная рекристаллизация происходит при охлаждении, при этом сформированные на начальном этапе охлаждения кристаллические структуры начинают перестраиваться и укрупняться, формируя более стабильный лед (рис. 5.4).

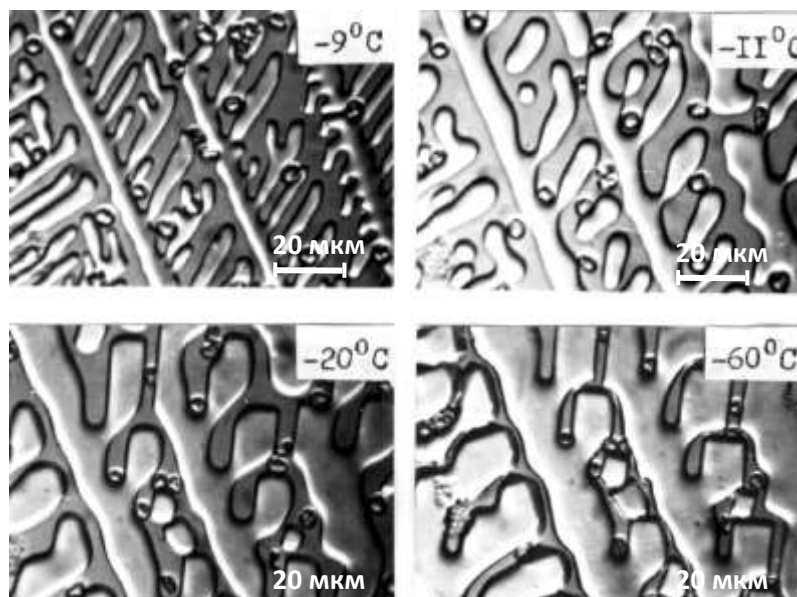


Рис 5.4. Фотографии спонтанной рекристаллизации и укрупнения мелкокристаллической структуры льда при медленном замораживании физиологического раствора

Индукцированная рекристаллизация происходит при отогреве. Хотя структуры льда при температуре ниже минус 160°C относительно стабильны, при отогреве они могут также стать центрами рекристаллизации (Рис.5.5).

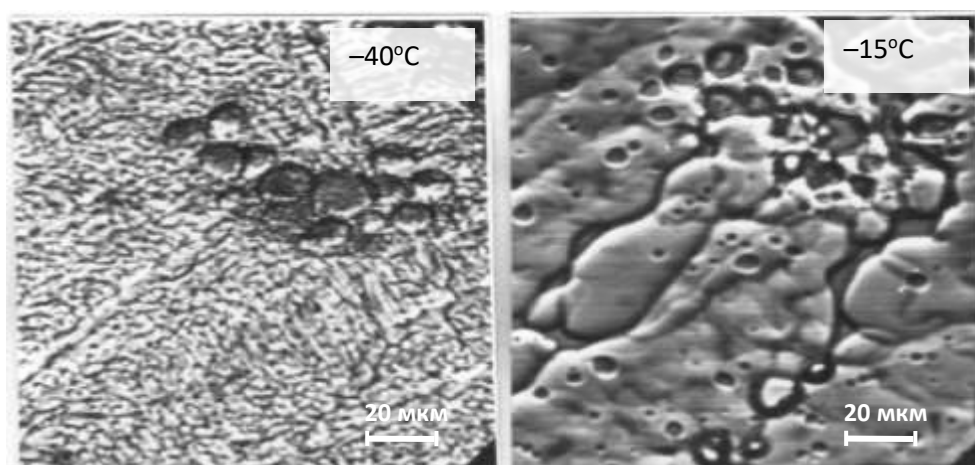


Рис 5.5. Фотографии индуцированной рекристаллизации и укрупнения мелкокристаллической структуры внеклеточного льда при медленном отогреве

Индукцированная рекристаллизация происходит главным образом в температурном диапазоне минус 80 – минус 160°C, но наблюдается и при более высоких температурах. При отогреве процессы рекристаллизации особенно интенсивно протекают в быстро замороженных витрифицированных системах, которые обладают изотропностью и аморфностью структуры и характеризуются неустойчивостью затвердевшего состояния. При отогреве таких систем аморфное состояние переходит в

кристаллическое состояние. Этот процесс сопровождается выделением скрытой теплоты плавления и кратковременным скачком температуры, что легко обнаруживается методом дифференциального термического анализа. Независимо от скорости отогрева, лед, образующийся при этом из стеклообразного состояния, имеет вначале кубическую форму, а затем трансформируется в обычный гексагональный лед.

Потенциально возможные повреждения, вызванные индуцированной рекристаллизацией, особенно важно учитывать при криоконсервировании путем витрификации. При витрификации раствор находится в метастабильном состоянии. Это увеличивает вероятность спонтанной кристаллизации, особенно при медленном отогреве.

Рекристаллизационные процессы играют важную роль в криоповреждении клеток, поскольку укрупнение кристаллов льда может привести к механическим разрушениям структуры клетки.

5.5. Эвтектическая кристаллизация

Эвтектика – это жидкая система (раствор, расплав), которая при определенном давлении находится в равновесии с твердыми фазами. Замораживание водных растворов ведет к концентрированию растворенных веществ в остающейся жидкой фазе и осадению-агрегации веществ при превышении их пределов растворимости. Переход воды из жидкого в твердое состояние при понижении температуры происходит до тех пор, пока концентрация растворенного вещества не достигнет некоторой определенной для данного вещества величины, при которой весь оставшийся раствор затвердевает в сплошную массу. Она состоит из прослоек льда, растворенного вещества и кристаллогидратов этого вещества. Такую застывшую массу, состоящую из смеси твердых веществ, тоже называют *эвтектикой*. Затвердевание таких растворов называется *эвтектической кристаллизацией*. Температура, при которой происходит образование тотальной твердой массы, называется *эвтектической температурой*, а соответствующая концентрация раствора – *эвтектической концентрацией*. Эвтектическая температура для разных криоконсервантов может существенно отличаться, но обычно ограничивается областью минус 15-25⁰С. Биологические объекты, попадающие в такие условия замораживания-оттаивания, подвергаются дополнительному существенному патологическому воздействию.

Количественные стороны замерзания растворов описывают законы Рауля, которые утверждают, что понижение точки замерзания по сравнению с чистым растворителем пропорционально количеству вещества в определенном количестве растворителя. Эквимольные количества различных веществ, будучи растворенными в одном и том же количестве данного растворителя, понижают его точку замерзания на одно и то же число градусов. Понижение точки замерзания, соответствующее растворению 1 моля вещества в 1000 г растворителя, является величиной постоянной для

данного растворителя, называемой *криоскопической константой* растворителя. Концентрация растворенных веществ, приводящая к самой низкой температуре, при которой раствор находится еще в жидком состоянии, представляет собой *эвтектический раствор*. Как правило, по достижению пределов растворимости, помимо внутри- и внеклеточной кристаллизации воды, мы имеем кристаллизацию остальных веществ, присутствующих в клетке и криоконсервирующем растворе, что сопровождается выпадением кристаллов солей, кристаллогидратов и др.

Характер эвтектической кристаллизации зависит от композиции криоконсервирующего раствора и существенным образом может влиять на живые объекты. Добавление в замораживаемые растворы таких эффективных криопротекторов, как глицерин, 1,2-пропандиол, ДМСО, ПЭГ, которые способны связывать воду, приводит к тому, что соли, находящиеся в таком водно-криопротекторном растворе, присутствуют там в виде сложных комплексов. Затвердевая в таком состоянии, они оказывают заметно меньшее пагубное влияние на биологические объекты. Кроме этого, криопротекторы способны понижать область эвтектической кристаллизации, что позволяет хранить некоторые объекты при умеренно низких температурах.

5.6. Механические повреждения

Увеличение объема при замерзании. В процессе замораживания объем образующихся кристаллов воды становится больше, чем исходный жидкий объем. Вследствие этого все мембраны, окружающие структуры, которые имеют определенные формы и объем, испытывают на себе давление со стороны образующейся твердой фазы. Таким образом, лед может попросту раздавить или разорвать клетку и ее органеллы при внутриклеточном кристаллообразовании.

Термодинамическое напряжение. При охлаждении среда криоконсервирования вблизи стенки контейнера, содержащего биообъект, в каждый момент времени будет холоднее, чем центральная часть контейнера. То есть происходит формирование температурных градиентов. Учитывая, что объем веществ при разных температурах разный, присутствие таких градиентов может приводить к термодинамическим напряжениям, результатом чего может быть разрыв клеток, растрескивание ткани и органа.

Сдавливание. Часть клеток, захваченных в кристалл льда, оказывается замкнутой. Это может приводить к значительному росту давления внутри «ледяной капсулы» и разрушению клеток. Так, еще в начале прошлого века Максимовым Н.И. было показано, что цитоплазма клеток замораживаемого растения испытывает давление со стороны растущих в межклетниках или между протоплазмой и оболочкой клеток ледяных кристаллов. Такие представления лежали в основе ранних концепций криоповреждения биообъектов при замораживании, подчеркивая роль и значение механического повреждения биообъектов вне- и внутриклеточными кристаллами льда

Повреждение мембран и внутриклеточных структур. Под механическими повреждениями понимают также прямой эффект действия кристаллов льда, вызывающий повреждение плазматической мембраны клеток и структурной организации внутриклеточных структур в результате роста кристаллов. Плазматические мембраны клеток могут проявлять устойчивость к медленно растущим кристаллам льда, но сильно повреждаются в случае очень быстрого (взрывного) роста кристаллов, которые иногда могут пронизывать мембраны насквозь. При этом процессы рекристаллизации, о которых говорилось ранее, играют важную роль в криоповреждении клеток, так как укрупнение кристаллов, особенно внутриклеточного льда, может привести к механическим разрушениям ее структуры.

5.7. Эффекты концентрированных растворов

Эффекты растворов – это воздействие на клетки высоких концентраций веществ, образующихся во время криоконсервации. Клетки могут находиться в среде с высокими концентрациями разнообразных веществ в результате вымораживания воды при формировании внеклеточного льда.

Развитие методов криомикроскопии позволило установить процессы, протекающие в замораживаемых клеточных суспензиях. Было обнаружено, что при медленных скоростях замораживания большая часть клеток оттесняется фронтом кристаллизации и оказывается в извитых жидких микроканальцах, в которых находятся концентрированные растворы солей. Используя криомикроскопию, при этом можно наблюдать, как клетки в каналах между кристаллами льда после сжатия начинают набухать (*после отогрева*) до размеров, значительно превышающих исходные. Подобным образом они себя ведут в гипертонических средах. Причиной набухания клеток в такой среде может быть резкое повышение проницаемости плазматических мембран для внеклеточных растворов, приводящее к исчезновению их концентрационных (и, следовательно, осмотических) градиентов на мембране. В результате начинает действовать механизм, известный как «коллоидно-осмотический лизис» (рис.5.6).

На основе сделанных наблюдений была сформулирована концепция повреждения клеток в результате действия «эффектов растворов». Согласно выдвинутой концепции повреждения клеток, ведущим механизмом разрушения замораживаемого биообъекта признавалось воздействие гиперконцентрированных растворов электролитов, метаболитов и других веществ, находящихся в жидкой фазе, на структуру плазматической мембраны клеток.

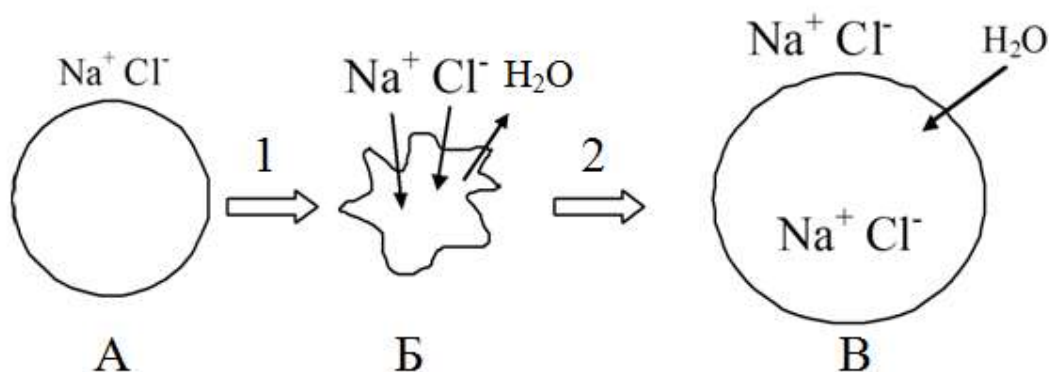


Рис. 5.6. Схема гипертонического (коллоидно-осмотического) лизиса клеток в процессе замораживания-отогрева в изотоническом растворе NaCl. 1 – замораживание, 2 – отогрев. А – клетка перед замораживанием, Б – обезвоженная клетка, насыщенная NaCl, В – набухшая после отогрева клетка.

В 1953÷1955 годах были опубликованы работы (Дж. Лавлока), который обратил внимание на то, что увеличение концентрации криопротектора (глицерина) приводит не только к уменьшению количества образующегося при каждой данной температуре льда, но и концентрации внеклеточной соли (NaCl). Было установлено соответствие между температурами, при которых начинается повреждение эритроцитов, и температурами, при которых достигается концентрация 0,8М NaCl. Автор высказал гипотезу, согласно которой причиной криповреждения при медленном замораживании является лиотропное действие солей, приводящее к нарушению соотношения холестерин/фосфолипиды в плазматической мембране. Гипотеза Дж. Лавлока в дальнейшем неоднократно критиковалась в части, касающейся причин повреждения мембран, но ее основа – наличие повреждающего предела внеклеточной концентрации веществ и то, что главным локусом криповреждения является плазматическая мембрана, нашла отражение в последующем развитии теорий криповреждения и криозащиты.

Основу эффектов раствора составляют так называемые *лиотропные и хаотропные эффекты*.

Лиотропный эффект – способность ионов изменять физические свойства растворителя, такие как вязкость, поверхностное натяжение, набухание полимерных молекул и их высаливание. Например, было показано, что некоторые анионы способны изменять набухание таких полимеров как белки. Одни из них увеличивают растворимость белков, другие, наоборот, уменьшают. Эти анионы по степени их влияния на растворимость белка можно расположить в следующий ряд (лиотропные ряды, ряды Гофмейстера): $\text{CNS}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-}$. Роданит (CNS^-) и йодид (I^-) – максимально увеличивают набухание белка (например, желатина) и способствуют его растворению, тогда как присутствие сульфата

(SO_4^{2-}) в растворе ведет к снижению растворимости белков и их преципитации, что составляет сущность процесса высаливания белков.

Катионы также обладают разной способностью осаждать белки. В ряду $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ литий (Li^+) обладает максимальной способностью осаждать белки.

Хаотропный эффект – способность определенных веществ нарушать структурный порядок системы. Например, такие вещества, как мочевины и хлорид гуанидиния, способны вытеснять воду, находящуюся в гидратных оболочках белков и других полимеров (*связанная вода*), а также разрушать Ван-дер-Ваальсовы связи. Все это ведет к потере нативной физиологической конформации молекулы полимеров.

Таким образом, увеличение концентрации ионов при формировании льда может вести к прямому нарушению ими клеточных структур.

5.8 Дегидратация – регидратация

На начальном этапе медленного замораживания суспензии клеток протекают процессы зарождения, формирования и роста внеклеточных кристаллов льда с сохранением жидкого внутриклеточного состояния. Внешняя кристаллизация осуществляется за счет перехода в твердое состояние внеклеточной воды и части объемной воды клеток, выходящей из них в результате осмотического эффекта, которая также используется для достройки каркаса льда. При этом содержимое клетки достаточно сильно концентрируется. При такой дегидратации клеток и возникающей при этом гиперконцентрацией солей и других веществ происходит нарушение структуры и функции внутриклеточных органелл (лизосом, митохондрий, эндоплазматической сети), имеющих мембранное строение.

Увеличение концентрации веществ приводит к нарушению вязко-эластических свойств мембран, снижает их устойчивость к осмотическому воздействию и даже приводит к потере клеткой фрагментов мембран. Результатом этого является проникновение внеклеточной среды внутрь клетки. Процесс дегидратации способствует также пространственному сближению макромолекул и их физическому контакту, что вносит свой вклад в проявление криоповреждений.

Снижение концентрации свободной воды, в конечном счете, ведет к уменьшению объема клетки. В 70-х годах прошлого столетия Г.Меримен выдвинул так называемую *теорию минимального объема*. Он утверждал, что уменьшение содержания внутриклеточной воды само по себе не является решающим фактором криоповреждения. При этом решающее значение имеет снижение объема клетки до некоторого критического уровня – минимального объема. По достижению этого уровня барьерные свойства мембран резко падают. Они становятся проницаемы для молекул и ионов. Повреждение при этом, по мнению автора, состоит из двух этапов (Рис.5.7).

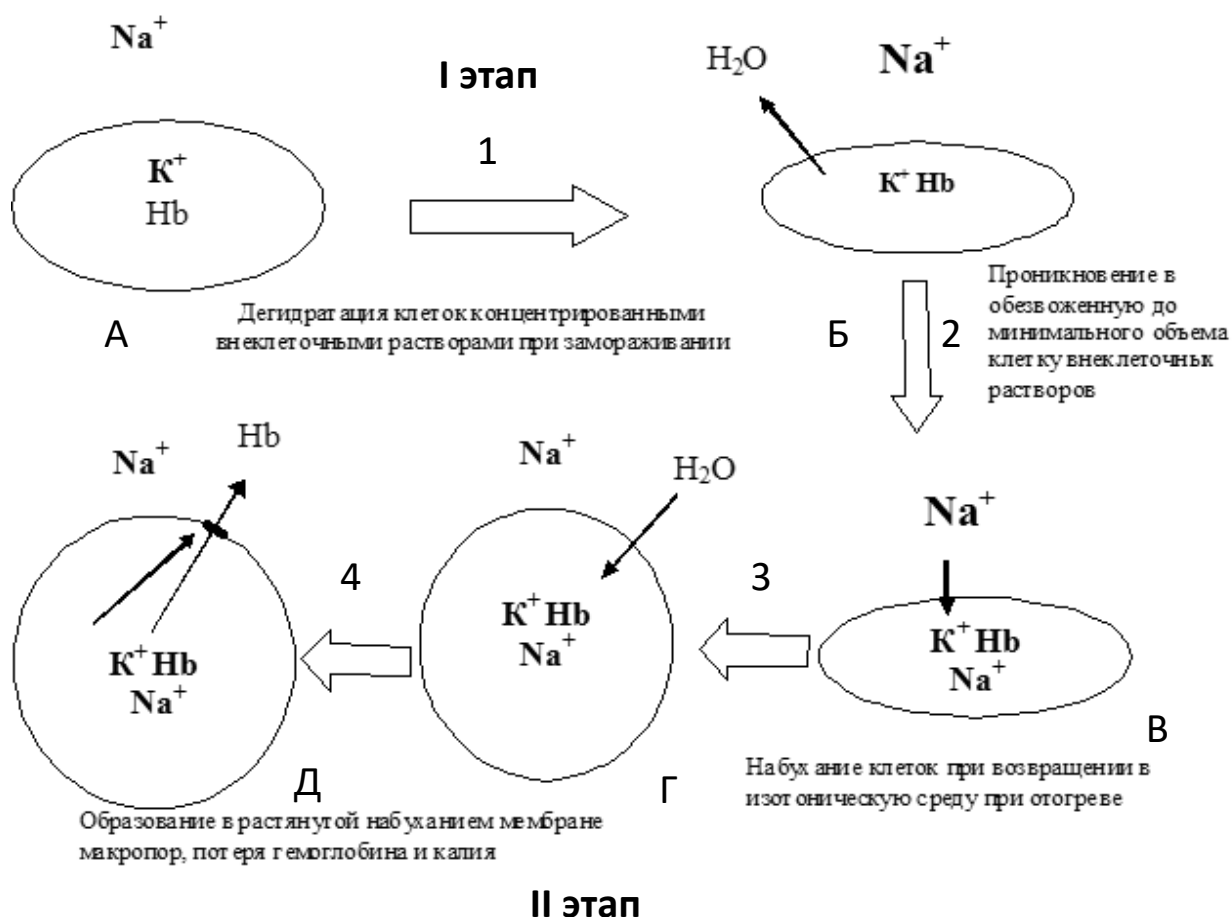


Рис.5.7. Иллюстрация гипотезы Меримена на примере эритроцита. А – клетка перед замораживанием, Б, В – дегидратированная клетка, Г – набухание клетки при отогреве, Д – повреждение мембраны клетки. Объяснение в тексте.

На этапе замораживания (1 этап, дегидратация) увеличивается проницаемость клеточной мембраны для концентрированного внеклеточного раствора. На этапе отогрева (2 этап, регидратация) эритроциты, оказываясь в среде с более низкой тоничностью, чем их содержимое, набухают; их мембрана растягивается до образования макропор и разрывов мембраны, через которые происходит потеря клетками гемоглобина во внеклеточную среду. Другими словами, при снижении объема клетки до критического уровня происходило резкое снижение выживаемости клеток.

5.9. Фазовые переходы мембран

Гипотеза «мембранного повреждения», предложенная Квин П.Д., базируется на термотропных фазовых переходах липидов мембран (Рис. 5.8). При нормальных физиологических условиях биологические мембраны находятся в жидкокристаллическом состоянии, что необходимо для выполнения функций. Мембранные компоненты способны вращаться и колебаться, диффундировать вдоль липидных монослоев, а также совершать

перескок из одного монослоя в другой. При охлаждении агрегатное состояние мембранного бислоя меняется: жидкокристаллическая фаза превращается в гелеобразную. Вследствие гетерогенности и сложности состава мембран переход в них происходит не сразу по всему объему, а то в одной, то в другой ее части, в целом занимая широкий интервал температур. Считается, что фазовое разделение липидов и белков приводит к образованию микродефектов в структуре бислоя на границах твердой и жидкой фаз. Вследствие этого нарушается транспортная и барьерная функция мембран. Агрегация белков при латеральном разделении мембраносвязанных компонентов ведет к нарушению функционирования мембранных ферментов. Утечка из клеток биокатионов и метаболитов через дефекты структуры на границе раздела между дискретными твердыми и жидкими доменами мембраны также может быть причиной повреждения клеток.

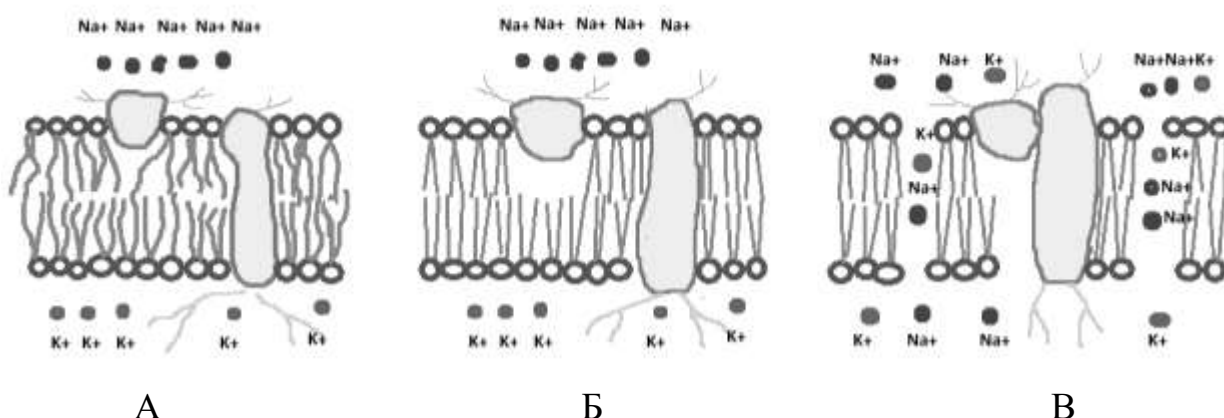


Рис. 5.8. Схема фазовых переходов липидов в биологических мембранах. А – мембрана до охлаждения; Б – затвердевание липидов и нарушение белок-липидных взаимодействий при охлаждении; С – латеральное разделение липидов, агрегация белков, формирование трансмембранных дефектов и утечка ионов.

Разделение мембранных компонентов может быть вызвано не только понижением температуры, но и деформацией плазматических мембран в процессе обезвоживания или обводнения клеток, имеющих место на разных этапах низкотемпературного консервирования.

5.10. Изменение концентрации водородных ионов (pH)

Многие макромолекулы, особенно это касается белков, могут выполнять свои функции только в определенных диапазонах pH. Избыток ионов водорода в криоконсервирующем растворе приводит к протонированию (присоединению H⁺) определенных функциональных групп, например, карбоксильных групп боковых цепей аминокислотных остатков, изменяя их заряд. Это влияет на степень электростатического взаимодействия между группами в полипептиде, приводит к изменению

вторичной, третичной и четвертичной структур белка, что, как следствие ведет к денатурации белка и потери функции.

Протонирование головок липидов в мембранах также имеет огромное значение. Например, это влияет на температуру фазовых переходов липидов в мембранах, а также ведет к изменению свойств фрагментов мембран, вызывая деформацию клеток.

Для того чтобы объяснить, почему изменяется рН при замораживании, нужно опять вернуться к концепции, высказанной Б. Люйе, – пусковым механизмом криоповреждений при замораживании является формирование льда. Формирование льда, повышение концентрации веществ, окружающих клетки, и снижение температуры – взаимосвязанные процессы. Известно, что клетки, ткани, а также растворы для криоконсервирования содержат большое количество высоко- и низкомолекулярных соединений. Некоторые из этих соединений являются компонентами буферных систем, например, фосфатной и бикарбонатной. При повышении концентрации растворенных веществ в растворе, окружающем биологический объект, происходит постепенное осаждение и кристаллизация (эвтектическая кристаллизация) компонентов этих буферных систем (особенно это касается акцепторов протонов, например, HPO_4^{2-} с формированием кристаллов Na_2HPO_4).

Было показано, что рН растворов NaCl и KCl , содержащих компоненты фосфатной буферной системы, изменяется значительно. Присутствие NaCl в данной системе ведет к значительному повышению концентрации H^+ из-за изменения состава фосфатного буфера. Подобное происходит и с другими буферными системами – протеиновой, гемоглобиновой и др. Величина рН вблизи температуры эвтектической кристаллизации также подвергается значительным изменениям.

В отличие от растворов, содержащих NaCl , растворы KCl в меньшей степени влияют на рН. Они вообще более склонны к защелачиванию, чем закислению. Поэтому некоторые среды для криоконсервирования содержат малое количество Na^+ , но высокое содержания K^+ .

Таким образом, сдвиг рН криоконсервирующих сред в кислую область при замораживании является следствием изменения их состава при кристаллизации солей.

5.11. Электростатические эффекты

Возникновение электростатических эффектов в первую очередь связано с формированием кристаллов в растворе электролитов. В такой системе на границе раздела «лед – жидкая фаза» могут возникать электрические поля в результате неодинакового захвата льдом ионов разного знака. При этом электролиты обладают способностью адсорбироваться на поверхности кристалла. На поверхности адсорбируются ионы противоположного по отношению к телу кристалла знака. Около поверхности кристалла концентрируются ионы противоположного знака в количестве, пропорциональном заряду на поверхности льда.

Таким образом, на границе раздела между кристаллической поверхностью и раствором образуется двойной электрический слой. Образование такого заряженного слоя приводит к появлению электрического потенциала. Величина этого потенциала определяется концентрацией ионов, являющихся общими для кристалла и раствора. Она может достигать 200мВ, что достаточно для того, чтобы вызывать пробой плазматической мембраны клетки.

Исчезновение границ между жидкой и твердой фазой в процессе кристаллизации будет устранять потенциал, снижая вероятность повреждения клеток. Поэтому при рассмотрении данного фактора очень важно учитывать скорость охлаждения и отогрева биологических объектов.

5.12. Сульфгидрильная гипотеза

Одним из биохимических механизмов криоповреждения является окисление сульфгидрильных групп (-SH), результатом чего является формирование прочной дисульфидной ковалентной связи (-S-S-) внутри и между молекулами. Левит в 1963 году обратил внимание на то, что замораживание содержащих SH-группы веществ приводит к образованию S-S-сшивок. В результате была выдвинута следующая гипотеза: понижение температуры приводит к обратимой денатурации белков, а сближение льдом денатурированных молекул может сопровождаться их необратимой агрегацией.

Сначала речь шла о нарушениях в цитоплазме клеток, затем автор пересмотрел свою концепцию и предположил возможность *образования S-S-сшивок* в мембранной структуре. Такие сшивки, по мнению автора, могли быть причиной *нарушений мембранной проницаемости*.

Таким образом, одной из причин криоповреждений, по мнению Дж. Левита, является пространственное сближение макромолекул. Он был одним из тех, кто сформулировал так называемую *сульфгидрильную гипотезу криоповреждений*. В пользу этой гипотезы свидетельствует устойчивость рибонуклеазы при замораживании-оттаивании, нативная конформация которой стабилизирована -S-S- мостиками. Но рибонуклеаза становится криолабильной после фотоокисления хотя бы одной -S-S- связи.

5.13. Температурный шок

Температурный, или холодовой шок может быть описан как повреждение клеток, которое развивается после их быстрого охлаждения до температур ниже физиологических, но выше температуры затвердевания раствора.

Основные закономерности температурного шока сформулированы в 1968г. Ф.И. Осташко:

- повреждение и гибель клеток имеют место только при быстром снижении температуры, медленное охлаждение в том же температурном диапазоне для клеток не опасно;
- при заданной скорости охлаждения существует некоторый минимальный температурный диапазон, внутри которого шок не проявляется, но увеличение диапазона приводит к гибели клеток;
- быстрое нагревание в том же диапазоне температур менее опасно для клеток, чем быстрое охлаждение;
- сверхбыстрое охлаждение к шоку не приводит.

В настоящее время существуют несколько механизмов, описывающих данное явление. Одним из главных факторов является изменение состояния мембранных липидов, а именно переход липидов из жидкокристаллического в гелеобразное состояние. Иногда это явление называется фазовым переходом липидов в мембранах или расслоением липидов, ведущее к образованию трансмембранных эффектов. Денатурация мембранных липидов также вносит свой вклад. Формирование трансмембранных дефектов ведет к перераспределению ионов и других осмотически активных компонентов внутри и вне клетки, потере целостности мембраны и гибели клетки. Температура фазовых переходов липидов во многом зависит от состава мембраны каждого конкретного вида клеток. Следовательно, разные клетки в разной степени подвержены холодовому шоку. Они обладают разными критическими температурными диапазонами, в которых этот фактор криоповреждений может себя проявлять.

5.14. Постгипертонический лизис

Постгипертонический лизис является следствием переноса насыщенных гипертоническими растворами клеток в среду меньшей тоничности. Постгипертонический лизис может иметь место как в процессе оттаивания замороженных суспензий клеток, так и в процессе их отмывания от проникающего криопротектора. Причиной постгипертонического лизиса при отогреве является проникновение в клетки концентрируемых замораживанием внеклеточных солей. Уровень гемолиза эритроцитов после экспозиции в условиях умеренной гипертонии ($\sim 1,2 \div 1,5M$) и возвращения в изотоническую среду возрастает с увеличением времени нахождения в гипертонической среде. Частичную защиту от постгипертонического лизиса может обеспечить быстрый выход из клетки анионов хлора, осуществляемый в обмен на входящие в клетку анионы OH^- . Условием такого выхода является создание направленного наружу градиента анионов Cl^- на мембране. Этот быстрый обмен может сопровождаться более медленным обменом внутриклеточного K^+ на H^+ (рис. 5.9).

Аналогичная картина наблюдается при высоких концентрациях использования *криопротекторов*. Постгипертонический лизис при возвращении насыщенных криопротектором клеток в изотоническую среду,

при размораживании и отмывании может приводить к чрезмерному их набуханию и гибели (Рис.5.10).

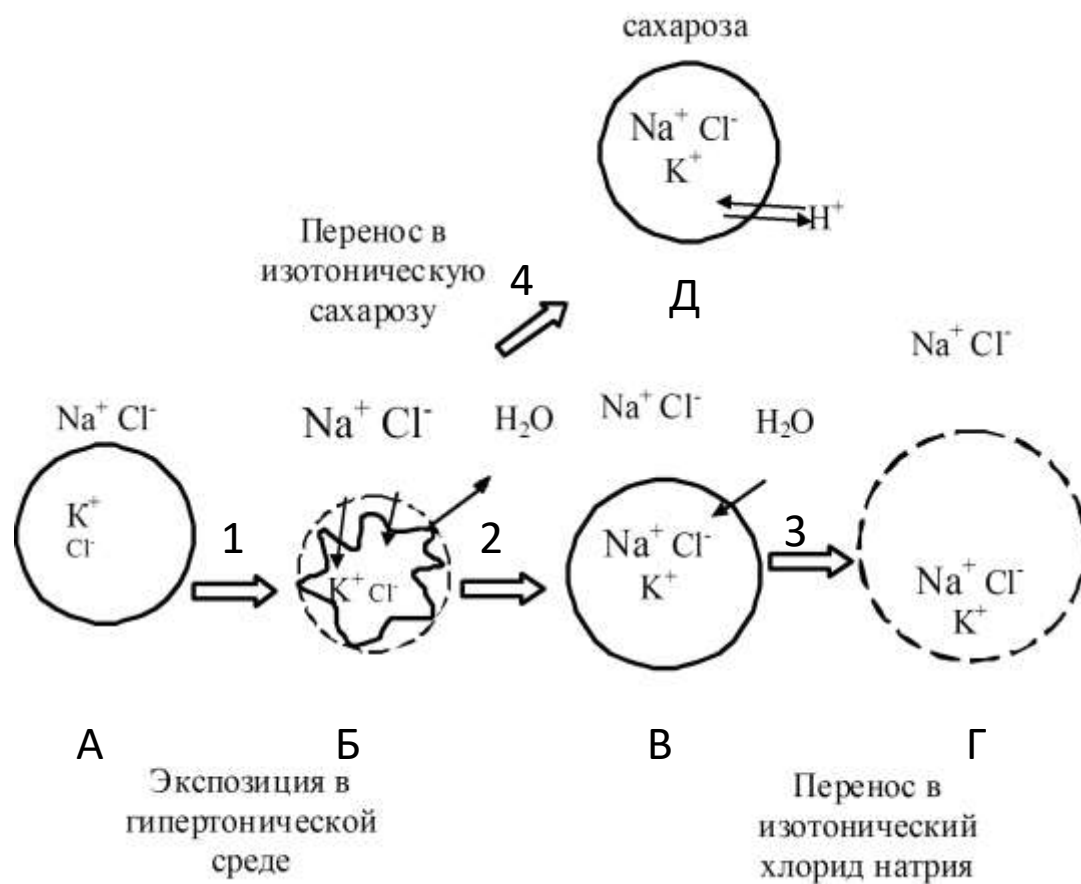


Рис.5.9. Схема инициации и развития постгипертонического лизиса клеток в растворах хлористого натрия и его предотвращения в растворе сахарозы. А – исходная клетка в изотонической среде, Б – дегидратированная клетка в гипертонической среде, В – клетка, перенесенная в изотоническую среду, Г – разрушение клетки в изотонической среде в результате быстрой гидратации, Д – перенос клетки в сахарозную среду предотвращает разрушение. 1 – перенос клетки из изотонической среды в гипертоническую, 2 – перенос клетки из гипертонической среды в изотоническую, 3 – быстрое набухание клетки и разрушение цитоплазматической мембраны.

Это подтверждает, что одним из главных объектов повреждений после замораживания-оттаивания клеток принято считать клеточную мембрану. Причиной гибели клеток может стать *образование макроскопических пор* с последующим выходом из клеток крупных молекул или поступление в клетку внеклеточных веществ, нарушающее осмотическое равновесие на мембране и приводящее к набуханию клетки. Набухание может завершаться образованием макроскопических пор, однако, это не единственная причина разрушения клеточной структуры. Возможно, что чрезмерное обводнение

(особенно это касается более сложно организованных, чем эритроцит, клеток) представляет опасность как явление, приводящее к дезорганизации внутриклеточной структуры и большинства клеточных процессов.

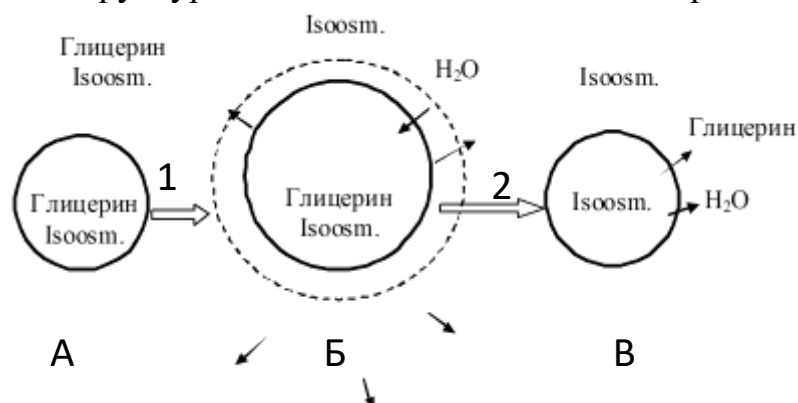


Рис. 5.10. Схема изменения клеточного объема при удалении криопротектора из клетки. *А – клетка, насыщенная глицерином в среде с криопротектором, Б – клетка в изотонической среде без глицерина. Криопротектор выходит из клетки, вода поступает в клетку. Клетка набухает и может разорваться. В – осмотически уравновешенная средой клетка, спустя время после помещения в изотоническую среду. 1 – перенос клетки из среды с глицерином в изотоническую среду без глицерина. 2 – после выхода избытка глицерина клетка осмотически уравнивается и стабилизируется.*

Таким образом, для исключения постгипертонического лизиса, замораживание необходимо проводить так, чтобы продолжительность экспозиции клеток в растворах криопротекторов и продолжительность кристаллизации в каждой точке были как можно меньше. Если же этого обеспечить не удастся (чаще всего это действительно невозможно), то после размораживания клеточной суспензии удалять криопротектор необходимо в несколько этапов, постепенно (ступенчато) снижая его концентрацию в отмывающем растворе.

5.15. Перекисное окисление

В органических молекулах (включая те, которые входят в состав биологических структур) электроны на внешней электронной оболочке располагаются парами - одна пара на каждой орбитали. Свободные радикалы отличаются от обычных молекул тем, что у них на внешней электронной оболочке имеется неспаренный (одиночный) электрон. Это делает радикалы химически активными, поскольку радикал стремится либо вернуть себе недостающий электрон, отняв его от окружающих молекул, либо отдать лишний электрон. Реакции, в которых участвуют свободные радикалы, называют свободнорадикальными процессами.

Развитие свободнорадикальных процессов неоднократно было показано после цикла замораживания-оттаивания. Одним из проявлений свободнорадикальных процессов является развитие перекисного окисления липидов (ПОЛ), которое усугубляет повреждение мембран после криоконсервирования (после отогрева).

Особенно активно эти процессы протекают в структурах, содержащих катализаторы и Fe-белки (например, цитохромы, гемоглобин и т.п.). Так в митохондриях важную роль в инициировании процессов ПОЛ играют геминные (цитохром с) и негеминные железо-серные белки электрон-транспортной цепи (например, НАД-Н-Ко-с-редуктаза), а также активные формы кислорода (O_2^-). Основными причинами, ведущими к инициированию процессов ПОЛ в липидном бислое мембран при охлаждении и замораживании – отогреве, являются гипоксия, лиотропное действие гиперконцентрированных солей и нарушение структурной интеграции мембраны, что приводит к стерическому сближению субстрата (липидов) и катализаторов (Fe-содержащие белки) процессов ПОЛ. В результате действия этих факторов при замораживании – отогреве в мембранных функциях микросом или митохондрий происходит избыточное накопление анион-радикалов O_2^- , которые в присутствии НАД-Н активируют процессы ПОЛ. Продукты, образующиеся при ПОЛ, например, гидроперекиси, являются высокогидрофильными соединениями, в силу чего они эффективно гидратируют бислой, разрыхляя мембрану. Процессы ПОЛ после замораживания до минус $25^{\circ}C$ очень активно развиваются во внутренней мембране митохондрий, липидный бислой которой обогащен полиненасыщенными жирными кислотами и содержит достаточное количество железосодержащих белков. При разветвлении цепей ПОЛ идет распад фосфолипидов до промежуточных (диеновые конъюгаты) и конечных продуктов (малоновый диальдегид, эпоксиды и др.). При этом содержание основных классов липидов в мембране снижается, функция клеток или внутриклеточных органелл нарушается. Процессы ПОЛ могут протекать вплоть до минус $25^{\circ}C$, т. е. когда в ледяных канальцах еще сохраняются жидкие микрофазы, содержащие концентрированные растворы солей, которые оказывают хаотропное действие на структуру мембран и функцию вичиальной воды. Снижение содержания фосфатидилхолина и этаноламинофосфатида в составе мембран митохондрий ведет к их набуханию, а в дальнейшем, в условиях нарастающей дегидратации, – к распаду мембран на фрагменты, поскольку в этих условиях резко ослабляются гидрофобные липид-липидные и липидбелковые взаимодействия в мембране.

Одним из главных источников свободных радикалов является электротранспортная цепь митохондрий. Как правило, при утечке электрона из электротранспортной цепи образуется супероксид анион (O_2^{*-}). Вероятность утечки электрона возрастает при повреждении мембран в результате охлаждения-нагрева. Являясь представителем свободных радикалов, O_2^{*-} может взаимодействовать с липидами мембран, особенно с

фрагментами ненасыщенных жирнокислотных остатков, входящих в состав липидов. Это приводит к формированию пероксил-радикалов жирнокислотных остатков, окислению части молекулы липида, нарушению ее структуры, функции и целостности мембраны, усугубляя криоповреждения.

5.16. Двухфакторная теория криоповреждений

При изучении зависимости сохранности биологических объектов в процессе охлаждения было показано, что сохранность объектов максимальна только при определенной скорости охлаждения. Несмотря на то, что для различных клеток оптимальная скорость замораживания различна, исследование влияния скорости на сохранность показало, что для всех она имеет куполообразную форму. Так для эритроцитов это ~ 3000 град/мин, для клеток культуры китайского хомячка – 100 град/мин, для дрожжей – 10 град/мин, для яйцеклеток мыши – 0,1 град/мин. Скорости охлаждения выше или ниже оптимальной непосредственно были связаны с различными типами криоповреждений, многие из которых были изложены выше. В связи с этим П. Мейзур была предложена так называемая *двухфакторная гипотеза криоповреждения*. В общем виде она может быть описана следующим образом (рис. 5.11):

При скоростях ниже оптимальных биологические объекты слишком долго находятся под влиянием высоких концентраций электролитов, высокой осмолярности, измененными параметрами среды, такими как рН, вязкость, ионная сила и д.р., которые лежат в основе «эффектов раствора», или *первого фактора*. Например, осмотичность среды может возрасть в 20 раз.

При скоростях охлаждения выше оптимальной повышается вероятность внутриклеточной кристаллизации в виду того, что клетки не успевают потерять достаточное количество воды. Это является *вторым фактором*.

Для уменьшения криоповреждений явлениями первого типа надо увеличить скорость охлаждения замораживаемой суспензии, так как их повреждающий эффект возрастает с увеличением времени их воздействия, но с другой стороны скорость охлаждения должна быть меньше, чтобы уменьшить повреждения явлениями второго типа.

Литваном была предложена альтернативная двухфакторная гипотеза. Она принимает во внимание влияние двух факторов. Первый из них – это чрезмерная дегидратация клеток при скорости охлаждения ниже оптимальной. Второй фактор – это повреждение мембран в результате чрезмерно высокой скорости охлаждения. Формирование внутриклеточного льда в этой теории рассматривается не как фактор повреждения мембран, а скорее как следствие их повреждения. То есть при нарушении целостности мембраны внеклеточный лед может прорасти внутрь клетки сквозь трансмембранные дефекты.

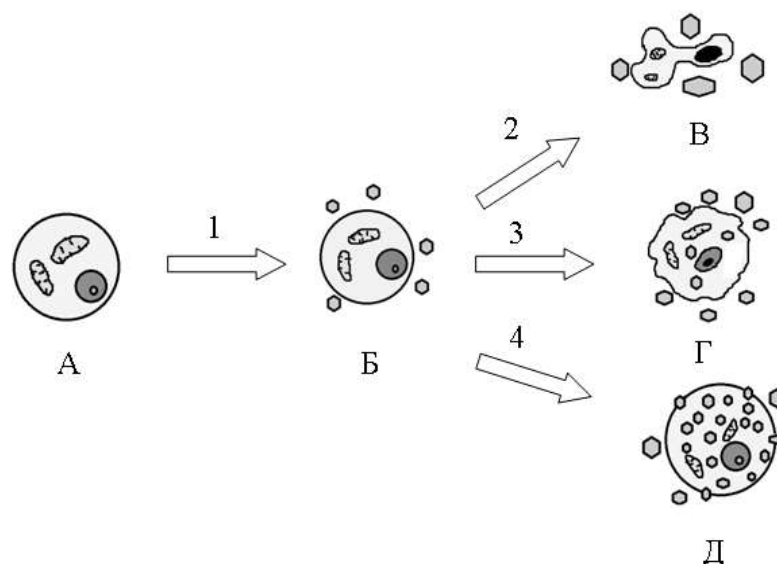


Рис. 5.11. Схема объемных и структурных нарушений клеток при разных скоростях замораживания. Оптимальные скорости охлаждения, позволяющие избежать двух основных факторов криповреждений.

1,2 -изменение клетки при низких скоростях охлаждения, воздействию «эффектов раствора», формирование преимущественно внеклеточных кристаллов; 1,3 - «оптимальная скорость» - с минимизацией воздействия «эффектов растворов» и незначительным внутриклеточным кристаллообразованием; 1,4 - высокая скорость охлаждения, с формированием значительных внутриклеточных кристаллов льда. А – исходная клетка перед замораживанием при температуре 20°C, Б – формирование кристаллов льда на начальном этапе замораживания при температуре ниже 0°C, В – клетка после медленных режимов замораживания, Г – клетка после оптимального режима замораживания, Д – клетка после быстрых режимов замораживания.

5.17. Мультифакторная теория криповреждений

В 70-е годы прошлого века для объяснения криповреждений Лозина-Лозинский Л.К. и Прайбор Д. выдвинули мультифакторную теорию криповреждений. Эта теория называет несколько причин повреждений или гибели клеток. Например, эта теория принимает во внимание композицию сред используемых при криоконсервировании, тип криопротектора, время контакта биологического объекта с этими средами, время экспозиции клеток при температурах, которые значительно ниже физиологических, а также процесс замораживания, процесс отогрева и т.д. Влияние этих параметров на выживание клеток может быть различным в процессе криоконсервирования. Например, пребывание эритроцитов при низких температурах или в гипертонических растворах перед замораживанием может значительно увеличить их сохранность. В этих условиях они могут терять часть воды, становясь более устойчивыми к действию отрицательных температур.

Также было отмечено, что повреждаемость клеток усиливалась при увеличении времени их экспонирования при температурах ниже 0°C, а также в результате их критического переохлаждения. Большое значение при этом имеет факт присутствия или отсутствия в замораживаемой среде криопротекторов, их концентрация, способность проникать (или не проникать) через плазматическую мембрану. Обращается внимание, что одни и те же виды холодových воздействий могут вызывать в одних клетках обратимые повреждения мембран, а в других – необратимые разрушения. Это во многом зависит как от силы повреждающих факторов, так и строения клеточной мембраны. Но повреждения клеток после переохлаждения всегда сильнее, чем после их прямого замораживания без предварительного переохлаждения. Выявлено, что число поврежденных и не способных к росту клеток гораздо выше после их предварительного переохлаждения. Авторы данной концепции считают, что фактор времени, который не учитывается двухфакторной теорией криоповреждений, а также сам факт сильного переохлаждения клеток являются причинами нарушения барьерных свойств мембраны для ионов и воды, а также других физиологических показателей плазматической мембраны.

Таким образом, эта теория учитывает действие многих факторов в процессе криоконсервирования. Некоторые из этих факторов могут потенцировать или ослаблять те или иные факторы криоповреждений. Одним из преимуществ данной теории по сравнению с двухфакторной теорией является учет остальных причин повреждений, таких как переохлаждение, глубина замораживания, срок хранения образца и т.д.

Рекомендуемая литература:

1. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения / Смит О. – М. : ИЛ.– 1963. – 430 с.
2. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии / Лозина-Лозинский Л. К. – Ленинград : Наука.– 1972. – 288 с.
3. Фаррант Дж. Пересмотр некоторых криобиологических концепций // Криобиология и криомедицина, вып. 3 : статьи / Дж. Фаррант. – К.– 1977. – С. 12-20.
4. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Осташко Ф. И. – К. : Урожай.– 1978. – 256 с.
5. Белоус А. М. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко. – К.: Наук. Думка.– 1982. – 255 с.
6. Moiseyev V.A., Belous A.M., Nardid O.A. On a possible mechanism of the protective action of cryoprotectants // Cryo-Letters.- V. 3, № 1. – 1982.–Р. 17-26.
7. Криоиммунология / [Щуцаева А. А., Гольцев А. Н., Попов Н. Н. и др.]. – К. : Наукова думка.–1988. – 176 с.

8. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев.: Наук. Думка.– 1994. – 432 с.
9. Гордиенко Е.А, Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев.: Наук. Думка.– 1994. – 144 с.
10. Нардид О.А. Влияние низких температур на белковые системы // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014 – Т. 24, № 2. – С. 83–101.

Глава 6. Скоростные режимы и глубина замораживания биообъектов

6.1. Основные скоростные режимы замораживания. 6.2. Медленное замораживание. 6.2.1. Техническое осуществление замораживания. 6.2.2. Температурный анализ процесса замораживания во времени. 6.2.3. Эвтектика. 6.2.4. Модификация эвтектики криопротекторами. 6.3. Быстрое замораживание. 6.4. Оптимальная скорость охлаждения. 6.5. Многоэтапное замораживание. 6.6. Сверхбыстрое замораживание. 6.6.1. Витрификация (стеклование). 6.7. Отогрев. 6.8. Особенности глубины замораживания. 6.9. Оборудование для замораживания и криоконсервации. Заключение.

6.1. Основные скоростные режимы замораживания

Одним из главных факторов, определяющих, выживет ли биообъект после замораживания, является скорость охлаждения.

В зависимости от скорости охлаждения методы замораживания условно подразделяются на следующие:

1. Методы медленного замораживания – скорость снижения температуры биообъектов 1 – 10 град/мин;
2. Методы быстрого замораживания – скорость снижения температуры 10 – 5000 град/мин;
3. Методы сверхбыстрого замораживания, при которых обеспечивается витрификация – скорость снижения температуры 5000 – 10000 и более град/мин.
4. Многоэтапное замораживание.

Биологические объекты очень разные, поэтому выбор режимов охлаждения зависит от целого ряда условий:

- а) от объема, формы и размеров консервируемого объекта;
- б) от организации объекта: суспензия клеток, ткань или орган;
- в) от типа и видовой принадлежности клеток (тканей);
- г) от вида и концентрации криопротекторов;
- д) от формы, объема и материала контейнера, в котором замораживают объект.

То есть каждый объект требует индивидуального подхода при криоконсервировании. Это касается и скорости замораживания, которая должна быть оптимальной для всякого биологического объекта.

6.2. Медленное замораживание

При медленном замораживании (1 – 10 град/мин) до температуры точки замерзания воды, с клетками (в суспензии) в течение нескольких минут практически ничего плохого не происходит. Только после начала кристаллизации воды во внешней среде начинают действовать факторы, приводящие к криповреждениям. По мере увеличения внешних кристаллов

клетки быстро теряют воду через оболочку, что обусловлено осмосом. До какой-то стадии замораживания затвердевшая фаза содержит в основном закристаллизовавшуюся воду. Незамёрзшей остается концентрированная в микроканалах между кристаллическими фазами жидкая масса веществ (например, сахара, соли, криопротекторы и др.) вместе с вытесненными туда клетками (Рис.3.5). Объем незамёрзшей фракции постепенно уменьшается, а концентрация веществ и клеток увеличивается. При этом ещё сильнее увеличивается осмотическая сила внешней среды, что приводит к дальнейшей прогрессирующей дегидратации клеток. Клетки могут уменьшиться в объёме в несколько раз. Кроме этого, они подвергаются сдавливанию растущими кристаллами. На определённом этапе замораживания клеток в них инициируется образование мелкого внутриклеточного льда, повреждающего внутреннюю структуру и организацию (См. главу 5).

Как было сказано ранее, переход воды из жидкого в твердое состояние при понижении температуры происходит до тех пор, пока концентрации растворенных веществ в оставшейся жидкой фазе не достигнут некоторых определенных величин, при которых весь оставшийся раствор затвердевает в сплошную массу. Она состоит из прослоек льда, растворенного вещества и кристаллогидратов этого вещества.

В результате замороженный объект превращается в гетерогенное твердое тело, состоящее из нескольких фаз:

- а) крупных кристаллов замерзшей воды внешней среды;
- б) застывшей массы, состоящей из смеси твердых гиперконцентрированных веществ, называемых *эвтектикой*;
- в) вмерзших в эвтектику клеток с мелкими кристаллами внутри.

Таким образом, повреждение клеток в процессе медленного замораживания-отогрева клеточной суспензии обусловлено: а) образованием внеклеточных и внутриклеточных кристаллов льда, б) механическим сдавливанием, в) обезвоживанием, г) так называемым «эффектом концентрированного раствора».

Вероятность и степень повреждения клеток факторами криоконсервации растет с увеличением длительности их действия.

6.2.1. Техническое осуществление замораживания

Линейные режимы медленного охлаждения реализуются с помощью *программных замораживателей*. Для конвекционного отбора тепла от образцов обычно используют холодные (до минус 150°C) пары жидкого азота, испарение которых контролируется помещенным в сосуд Дьюара терморезистором, а изменение температуры осуществляется нагреванием в теплообменнике. Регулирование температуры образца или температуры в камере замораживателя осуществляют по принципу отрицательной обратной связи путем ее сравнения с температурой (сигналом) задающего режим охлаждения устройства.

Программные замораживатели используют для замораживания клеточных суспензий в контейнерах объемом до 1л. При различных габаритах толщина контейнеров обычно не превышает 1см. Материалом контейнеров могут служить как различные полимерные материалы, так и металл (пищевой алюминий, нержавеющая сталь).

Скорости охлаждения, реализуемые с помощью программных замораживателей, как правило, не превышают 10 град/мин. Охлаждение проводится до температур не ниже минус 70°C, затем контейнеры с объектом переносят в жидкий азот.

Необходимым условием равновесной кристаллизации является очень медленное охлаждение и внесение в раствор кристаллической «затравки образования льда» для предотвращения переохлаждения.

6.2.2. Температурный анализ процесса замораживания во времени

Температурный анализ процессов медленного замораживания–оттаивания простых солевых растворов позволяет, прежде всего, охарактеризовать процессы, происходящие в замораживаемых системах в разных температурных зонах. На рис. 6.1 представлена типичная термограмма замораживаемого раствора.

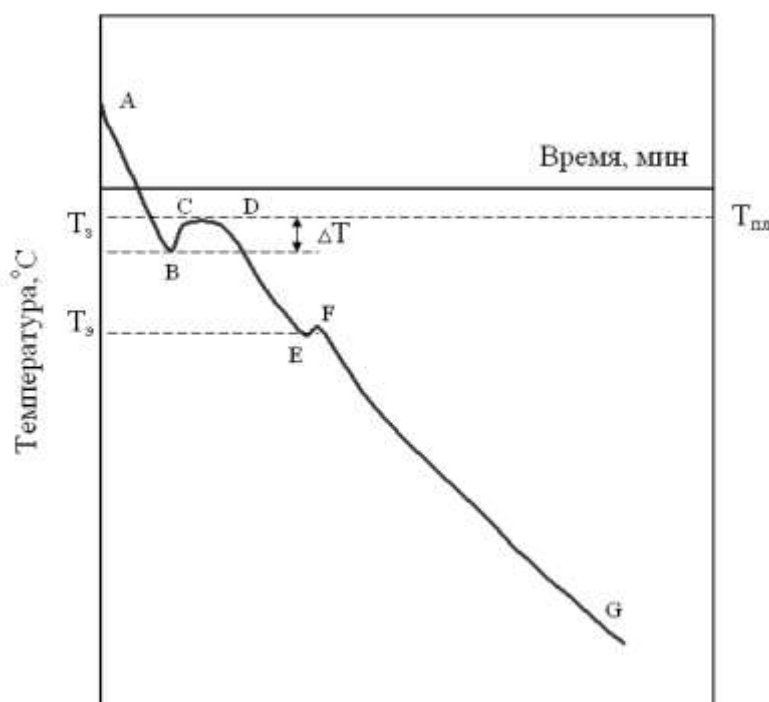


Рис. 6.1. Типичная термограмма замораживаемого раствора: *A* – начало охлаждения; *B* – начало кристаллизации; *C* – начало выделения скрытой теплоты кристаллизации; *D* – окончание выделения скрытой теплоты кристаллизации; *E* – начало затвердевания эвтектики; *F* – конец затвердевания эвтектики; *G* – окончание замораживания, T_z температура замерзания; T_n – температура плавления; $T_э$ – температура эвтектики; ΔT – начальное переохлаждение системы.

При охлаждении раствора участок АВ термограммы соответствует охлаждению раствора до момента начала кристаллизации. На этом участке не происходит видимых изменений ни в охлаждаемом растворе, ни в охлаждаемом биологическом объекте. Участок термограммы ВС представляет собой «температурный скачок» начала кристаллизации. На этом участке начинают образовываться первые кристаллы льда. Почти горизонтальная площадка CD на термограмме возникает вследствие выделения в продолжающейся кристаллизации скрытой теплоты кристаллизации на движущейся границе раздела фаз «лед – жидкий раствор». Сохранение постоянной температуры на термограмме в течение некоторого времени связано с выделением скрытой теплоты кристаллизации в процессе кристаллизации. Длина этого участка зависит от объема образца и местоположения термодатчика. Чем ближе датчик температуры расположен к стенке контейнера, через которую осуществляется теплоотвод от образца, тем короче оказывается горизонтальная площадка CD, так как фронт кристаллизации быстрее достигает точки, в которой расположен датчик температуры. В предельном случае, когда размер датчика температуры соизмерим с характерным размером объекта, горизонтальный участок на термограмме превращается в излом.

Излом на участке EF термограммы обусловлен выделением тепла при затвердевании областей, в которых концентрация компонентов раствора соответствует эвтектической. Чем выше исходная концентрация компонентов охлаждаемого раствора, тем больший его объем затвердевает в эвтектической точке и тем длиннее становится участок термограммы при эвтектической температуре T_e . Рекристаллизация – рост крупных кристаллов за счет мелких при замораживании или отогреве – термическими эффектами не сопровождается.

6.2.3. Эвтектика

Биологические объекты состоят преимущественно из воды. Вода в живых тканях является составной частью жидкости, где, наряду с водой, находятся и другие молекулы. Если ткань охлаждается до температуры замораживания, то молекулы воды начинают соединяться и образуют растущие кристаллы льда. Лед отодвигает другие молекулы наружу растущего кристалла, где они собираются в химически более активный концентрированный раствор. По мере образования льда количество жидкой фазы воды уменьшается, и концентрация замораживаемого раствора увеличивается. Поэтому температура его замерзания понижается. Образование льда и понижение температуры происходит до тех пор, пока концентрация некоторых растворов не достигнет некоторой определенной для данного растворенного вещества величины, при которой весь раствор застывает в сплошную массу, состоящую из тонких прослоек льда и растворенного вещества в твердом виде. Такая застывшая масса называется *эвтектикой* и состоит из смеси твердых веществ. Интервал температур, в котором выделяющиеся из замороженной системы твердые компоненты

находятся в равновесии с жидкой фазой, называется *эвтектической зоной*. Эта зона является наиболее повреждающей для биологических объектов, так как на них одновременно действуют: соли, температура и лед. Температура, при которой происходит образование тотальной твердой массы, называется *эвтектической температурой*. Эта температура является температурой полного затвердевания биообъекта и внешней среды. После полного исчезновения жидкой фазы дальнейшее охлаждение вызывает стремительное падение температуры системы.

Наиболее низкие эвтектические температуры могут иметь растворы электролитов, обладающих высокой растворимостью.

Таблица 6.1. Эвтектические температуры для растворов электролитов

Природа электролитов	Эвтектическая температура, °С
KNO ₃	-2,0
NaNO ₃	-8,15
KCl	-11,1
KBr	-13,0
NH ₄ Cl	-15,8
NaCl	-21,8
MgCl ₂	-33,6
CaCl ₂	-54,9

Из представленной таблицы 6.1 видно, что наиболее низкую температуру замерзания эвтектики имеют растворы солей двухвалентных ионов кальция и магния.

Эвтектическая кристаллизация растворов в значительной степени тормозится добавлением криопротекторов, например, глицерина, ДМСО, 1,2-пропандиола, ПЭГ, ГЭК, которые способны связать воду и тем самым снижать точку эвтектики. Большинство криопротекторов (глицерин, ДМСО, 1,2-пропандиол, ПЭГ, ГЭК, диметилформамид имеют низкие температуры эвтектики (46,5 – 100°С). Соли при этом остаются в водном растворе в виде сложного комплекса и при дальнейшем снижении температуры затвердевают в сплошную массу.

Влияние солей и механическое действие растущих кристаллов льда на клетки в суспензиях уменьшается с увеличением концентрации криопротекторов в них. В области концентраций выше 0,1 М клетки практически не отодвигаются растущим льдом, в то время как в солевых растворах этот процесс происходит со скоростью несколько микрометров в секунду. В частности, добавление ГЛ в концентрации более 10% (1.1М) к изотоническому раствору хлористого натрия, содержащему эритроциты, приводит к практически полному исчезновению механического

взаимодействия между клетками и льдом. Уменьшается также и эффект солей.

6.2.4. Модификация эвтектики криопротекторами

Как кристаллизация воды, так и эвтектическая кристаллизация начинаются после переохлаждения раствора. Если в чистой воде фазовый переход «вода-лед» протекает и завершается при 0°C, то в водных растворах различных веществ он может захватывать довольно широкий температурный диапазон. При этом, если охлаждение проводить бесконечно медленно, система «лед - концентрируемый замораживанием раствор» будет проходить через ряд равновесных состояний, описываемых фазовой диаграммой. Иными словами, каждой температуре будет соответствовать определенная концентрация раствора.

В солевом растворе при достижении эвтектической концентрации происходит выпадение из раствора кристаллов соли и льда. Эвтектическая концентрация хлористого натрия - 23% (4.61M), а хлористого кальция - 30% (3.46M). Естественно, чем выше будет исходная концентрация соли, тем большее количество эвтектической смеси образуется. Именно поэтому на термограммах замораживания растворов с высокой исходной концентрацией соли отмечается четко выраженное выделение тепла эвтектической кристаллизации.

В простых растворах криопротекторов смеси «криопротектор – вода» при замораживании стеклуются при определенных отрицательных температурах значительно ниже нуля, в зависимости от его концентрации. Например, при 40% (4.77M) концентрации глицерина затвердевание водного раствора происходит при минус 20°C, а при 60% (7.51M) - при минус 60°C. То есть определённые концентрации криопротекторов позволяют при медленном охлаждении пройти зону эвтектики без ее затвердевания, что предотвращает пагубное действие концентрированных солей на биологические объекты. Иными словами, криопротектор не только уменьшает количество образующегося льда, но и может предотвратить эвтектическую кристаллизацию солей, если они не представлены слишком высокой исходной концентрацией.

6.3 Быстрое замораживание

Быстрое замораживание осуществляется обычно погружением контейнеров с биообъектом в жидкий азот. В зависимости от размеров, природы объектов, а также используемых контейнеров, скорости их замораживания могут составлять от 10 до 5000 град/мин. Криповреждения клеток при быстром замораживании обусловлены двумя факторами: во-первых, формированием и ростом внутриклеточных и внешних кристаллов льда и, во-вторых, процессами рекристаллизации. То есть в данном случае

отсутствует обезвоживание, перемещение клеток фронтом растущих кристаллов льда и отсутствует эффект концентрированных солей эвтектики.

В случае быстрого замораживания клетки не успевают обезводиться, в силу чего создаются условия для кристаллизации внутриклеточного раствора. Возникновение и рост внутриклеточных кристаллов являются летальными факторами для клеток. Внутриклеточная кристаллизация является непосредственной причиной криоповреждений, а не следствием воздействия других повреждающих факторов. При этом рост внеклеточных и внутриклеточных кристаллов происходит быстро, клетка не успевает обезводиться и застывает как единое целое. Вероятность быстрого формирования льда внутри клетки увеличивается с увеличением скорости замораживания.

При быстром замораживании наблюдается феномен механического раздавливания клеток растущими кристаллами внеклеточного льда. Механическое повреждение клеток происходит также во время рекристаллизационного укрупнения внутриклеточных кристаллов при отогреве. Поэтому при быстром отогреве сохранность многих видов предварительно замороженных клеток выше, чем при медленном, поскольку снижается время их пребывания в зоне рекристаллизации. Указанная закономерность объясняется тем, что разрушение клеток обусловлено механическим повреждением в процессе рекристаллизации внутриклеточных кристаллов при небольших скоростях отогрева. В этом случае для предварительной дегидратации и уменьшения количества внутренних кристаллов перед замораживанием используют не проникающие в клетки криопротекторы (например, ПЭО-400, ПЭО-1500, ПВП, ГЭК и др.). Дегидратация способствует уменьшению повреждающего действия внутриклеточного кристаллообразования. Предварительная инкубация биообъектов с проникающими криопротекторами, например, с ГЛ или ДМСО, также способствует защите клеток при быстром замораживании. Но они делают это благодаря замещению части внутриклеточной воды и, как следствие, уменьшения количества внутриклеточного льда.

Таким образом, при быстром замораживании повреждающими факторами, главным образом, являются формирование и рост внутриклеточных и внешних кристаллов льда и процессы рекристаллизации.

Преимуществом быстрого замораживания, по сравнению с медленным, является: а) отсутствие обезвоживания клеток, б) отсутствие перемещений клеток фронтом растущих кристаллов льда и в) отсутствие неблагоприятного действия концентрированных солей эвтектики.

6.4. Оптимальная скорость охлаждения

Необходимость подбора оптимальной скорости охлаждения для разных биообъектов обосновывается двухфакторной теорией криоповреждения Мазура, согласно которой на сохранность клеток в процессе кристаллизации клеточной суспензии влияют два типа повреждающих факторов.

Первый тип криповреждений возникает при *кристаллизации внеклеточной среды* и вызывает обезвоживание клеток, повышение концентрации и ионной силы вне – и внутриклеточных растворов за счет превращения части растворителя в лед. При увеличении скорости охлаждения степень повреждений первого типа уменьшается вследствие сокращения времени действия повреждающих факторов.

Другой тип криповреждений клеток обусловлен образованием *внутриклеточных кристаллов льда*, которое кроме обезвоживания вызывает также механическое разрушение мембранных структур, особенно в процессе рекристаллизации внутриклеточных кристаллов при медленном отогреве суспензии. Внутриклеточная кристаллизация, вероятность которой возрастает при высоких скоростях охлаждения, считается максимально губительной для клеток. То есть во время охлаждения биообъектов происходит два наиболее значимых кинетических процесса – рост кристаллов льда и дегидратация клеток. Они происходят как при медленном, так и при быстром замораживании. Но при медленном охлаждении с постоянной скоростью осмотическое равновесие в клетках частично сохраняется с помощью дегидратации, в результате образующихся внеклеточных кристаллов льда. А при быстром охлаждении внутриклеточные кристаллы льда формируются быстрее, чем происходит дегидратация внешним льдом. Поэтому в этом случае осмотическое равновесие на плазматической мембране клеток нарушается более значительно. Очевидно, что клетки повреждаются как при быстром, так и при медленном замораживании, но оптимальная скорость охлаждения увеличивает вероятность выживания клеток.

Таким образом, оптимальная скорость охлаждения может быть определена как наиболее щадящая скорость, при которой происходит умеренная дегидратация биообъектов, достаточная, чтобы предотвратить внутриклеточное кристаллообразование.

Применением криопротекторов можно регулировать процессы дегидратации и кристаллизации. В случае предварительной инкубации с *непроникающими криопротекторами*, дегидратация предшествует замораживанию, что может позволить осуществить неконтролируемое быстрое замораживание. При предварительном использовании *проникающих криопротекторов* дегидратации клеток не происходит, но внутриклеточный раствор понижает температуру и картину кристаллизации. В том случае, когда внутриклеточный раствор после обезвоживания непроникающими криопротекторами сохраняет способность к кристаллизации, применяют другой прием: дегидратация осуществляется смесью проникающего и непроникающего криопротектора.

Итак, можно отметить следующие закономерности:

- С проникающими в клетки криопротекторами можно более успешно применять не только быстрые, но и медленные режимы замораживания.

- С непроникающими криопротекторами лучше применять медленные режимы замораживания.
- Комбинация проникающих и непроникающих криопротекторов позволяет подобрать индивидуальную оптимальную скорость замораживания.

В зависимости от размеров клетки, ее поверхностно-объемного отношения, коэффициента проницаемости плазматической мембраны для воды и его температурной зависимости скорость дегидратации и кристаллизации клеток будет различной. Например, клетки больших размеров с малым поверхностно-объемным отношением и замедленным транспортом молекул воды успевают обезвоживаться только в ходе медленного охлаждения. Следовательно, разные клетки и ткани требуют разную скорость охлаждения. Так, для ооцитов млекопитающих с размером ~ 70 мкм оптимальными считают скорости охлаждения 0,1- 0,3 град/мин, для лимфоцитов с диаметром около 10 мкм – 1град/мин, а для эритроцитов человека, имеющих форму дисков с диаметром 8 мкм и толщиной ~ 2 мкм и характеризующихся высокой проницаемостью для воды – 5000 град/мин.

6.5. Многоэтапное замораживание

Для криоконсервирования клеточных суспензий применяются и так называемые многоступенчатые программы замораживания (Рис.6.2). Эти программы замораживания состоят из нескольких этапов:

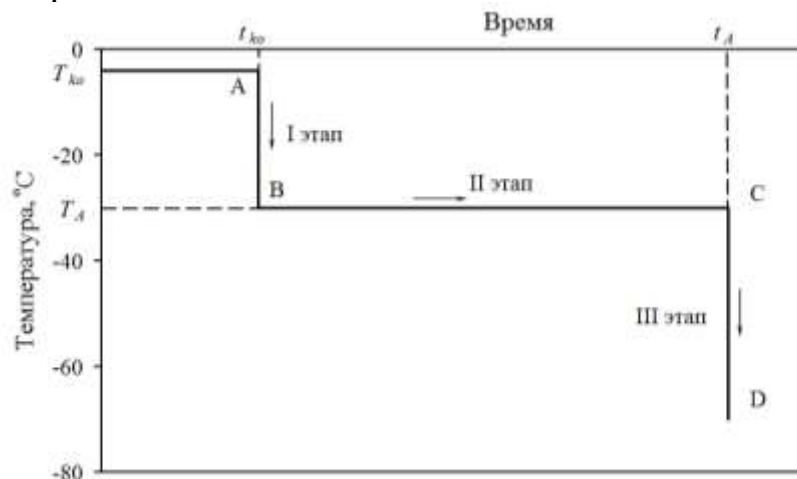


Рис. 6.2. Термограмма идеализированного двухступенчатого режима замораживания: 1 этап – медленное замораживание до температуры эвтектики, 2 этап – изотермическая экспозиция, 3 этап – быстрое замораживание. $T_{к0}$ – температура начала внеклеточного льдообразования; T_A – температура адаптации; $t_{к0}$ время начала внеклеточного льдообразования; t_A – время окончания адаптации.

1) медленное охлаждение биообъектов от температуры, при которой начинается внеклеточное льдообразование (0°C), до эвтектической

температуры внеклеточного раствора (примерно минус 15 – 25°C). Этот процесс осуществляют в парах жидкого азота или в холодильнике;

2) изотермическая экспозиция клеток при этой температуре в течение 5 – 30 минут;

3) быстрое замораживание объекта до температуры жидкого азота путем непосредственного погружения в жидкий азот.

Хотя при таком режиме замораживания внутриклеточные кристаллы могут зарождаться уже на протяжении первого этапа, но размеры этих кристаллов и количество льда еще не достигают критического (летального для клетки) значения. Образовавшиеся на первом этапе охлаждения внутриклеточные кристаллы не повреждают клетку, но являются потенциально опасными для нее. Более глубокое охлаждение на первом этапе при отсутствии температурной остановки привело бы к дальнейшему увеличению размеров внутриклеточных кристаллов и, следовательно, к гибели клетки.

Температурная остановка влечет за собой качественное изменение процесса диффузионного обмена воды между клетками и окружающей их жидкой фазой. Возникшие при замораживании на первом этапе охлаждения внутриклеточные кристаллы рекристаллизуются значительно быстрее, чем перераспределяется растворитель между клеткой и окружающей ее средой.

Таким образом, наряду с оптимальным линейным режимом охлаждения существует не менее эффективный многоступенчатый режим охлаждения, который также обеспечивает высокую сохранность клеток.

Как правило, режим многоступенчатого охлаждения практически можно осуществить, погружая контейнер с клеточной суспензией в заранее охлажденную до определенной температуры жидкость, а затем переносят в жидкий азот.

Двухступенчатый режим замораживания имеет преимущество по сравнению с режимами, при которых скорость охлаждения не изменяется. В частности, при двухступенчатом режиме охлаждения время контакта клеток с окружающим их гипертоническим раствором уменьшается. Поэтому клетки при размораживании в меньшей мере подвергаются постгипертоническому лизису, чем клетки, замороженные с медленной постоянной скоростью. Причем процедура реализации двухступенчатого замораживания существенно проще, чем замораживание с постоянной скоростью.

6.6. Сверхбыстрое замораживание

Скорости охлаждения при сверхбыстром замораживании лежат в диапазоне от 5000 до 10000 град/мин. Экспериментальные основы замораживания с такими скоростями были заложены в свое время физхимиком Г. Тамманом и криобиологом Б. Люйе, которые исследовали процессы кристаллизации при сверхбыстром замораживании различных органических веществ и клеток в тонком слое. При таких условиях

замораживания затвердевание растворов идет очень быстро в единую аморфную массу. Позже была изучена возможность замораживания клеток с помощью сверхбыстрого охлаждения, осуществляемого, например, диспергированием мелких капель клеточной суспензии непосредственно в жидкий азот, распылением на сильно охлажденную металлическую пластину и т. п. Сверхбыстрое охлаждение может обеспечиваться также использованием специальных контейнеров, например, пластиковых соломинок с диаметром $0,5 \div 2$ мм и пакетов из тонкой фольги.

Сверхбыстрые скорости замораживания избегают кристаллизации и приводят к гомогенному застыванию внеклеточного и внутриклеточного содержимого в однородную твердую массу. Происходит *витрификация биологических объектов*.

6.6.1. Витрификация (стеклование)

Витрификация – это физико-химический процесс затвердевания растворов без образования кристаллов льда (стекловидно-аморфное состояние), наблюдающееся при высоких скоростях охлаждения. То есть витрификация – процесс перехода жидкости в твердое аморфное состояние при сверхбыстром замораживании ($10^6 - 10^{10}$ град/с). Однако достижение таких скоростей охлаждения даже применительно к малым объемам биологических объектов довольно проблематично, а применительно к большим – практически невозможно.

Витрификации можно добиться и при более медленном охлаждении, но при условии добавления высоких концентраций криопротекторов, что может предотвратить соединение молекул воды в кристаллы и, соответственно, предупредить образования льда. При этом, чем больше концентрация криопротектора, тем меньшая скорость охлаждения требуется для витрификации и наоборот. Однако стабильность витрифицированного состояния биообъектов относительно невысока, что создает опасность проявления кристаллизационных процессов на этапе отогрева. Относительно стабильным «стеклом» можно считать витрифицированное состояние, полученное в растворах криопротекторов с концентрацией порядка 60 - 70%.

Итак, для полной витрификации внеклеточной жидкости, содержащей умеренные концентрации криопротектора, требуется применение сверхбыстрого охлаждения; при медленном охлаждении происходит витрификация только части внеклеточной жидкости, причем доля аморфной фазы будет увеличиваться при увеличении концентрации криопротектора и увеличении скорости охлаждения. В свою очередь, высокие концентрации криопротектора могут обеспечить полную витрификацию даже при медленном охлаждении.

Преимуществом витрификации является отсутствие основных повреждающих факторов – кристаллизации, дегидратации и концентрации солей. Трудности возникают при витрификации объемных биологических образцов. В больших замороженных объектах могут возникать температурные градиенты, что может приводить к их растрескиванию. И

очевидно, что чем больше объем образца, тем большие температурные градиенты могут возникать при его охлаждении или отопреве.

Наиболее часто и успешно витрификацию используют для криоконсервирования ранних (преимплантационных) эмбрионов человека, лабораторных и сельскохозяйственных животных. В этом случае говорят о «витрификации эмбрионов». Также проводят витрификацию сперматозоидов и ооцитов, что помогает бороться с бесплодием. Сверхбыстрое замораживание используют также для хранения меристимальных (зародышевых) тканей растений.

6.7. Отогрев

В процессе отогрева биологические объекты подвергаются дополнительным негативным воздействиям:

Перекристаллизация. При медленном отогреве быстро замороженных образцов регистрируется «перекристаллизация» внеклеточной, внутриклеточной и тканевой сред – включение части образовавшейся жидкой фазы в кристаллическую структуру, укрупнение кристаллов, изменение их формы и размеров, что сопровождается гиперконцентрацией внеклеточного раствора. Эти превращения не сопровождаются выделением (поглощением) тепла и калориметрически не регистрируются.

Рекристаллизация. Рекристаллизационные изменения во внеклеточной среде могут протекать одновременно с рекристаллизацией и плавлением внутриклеточного льда. Рекристаллизацию относят к факторам повреждения, хотя механизм ее действия остается неопределенным. С негативными последствиями рекристаллизации можно бороться, повышая скорость отогрева.

Механические воздействия. Во время рекристаллизационного укрупнения внутриклеточного льда при отогреве происходит механическое повреждение клеток. Поэтому при быстром отогреве сохранность многих видов предварительно замороженных клеток выше, чем при медленном отогреве, поскольку снижается время пребывания образца в зоне рекристаллизации.

Термомеханические напряжения. При отогреве биообъектов от температуры замораживания до зоны фазовых превращений воды основным повреждающим фактором могут быть термомеханические напряжения.

Осмотические эффекты. После плавления внутриклеточного льда клетки могут обезвоживаться внеклеточным льдом при отогреве. Дальнейшее плавление внеклеточного льда разбавляет концентрированные внеклеточные растворы. Возвращаясь в исходную среду замораживания, клетки восстанавливают свой объем, если их плазматическая мембрана остается неповрежденной. Повышение температуры на этапе отогрева способствует восстановлению исходных свойств биомембран, повышает скорость биохимических реакций.

Постгипертонический лизис. Отогрев замороженной суспензии клеток приводит к резкому уменьшению концентрации растворенных веществ во внеклеточной среде за счет таяния льда. Подобное возвращение клеток в изотонический раствор после контакта с гипертоническим раствором часто приводит к разрушению их мембран. Это явление, как ранее было отмечено, называется постгипертоническим лизисом. Поскольку растворенные вещества, как правило, проникают через клеточные мембраны значительно медленнее, чем молекулы воды, выравнивание значений химического потенциала воды вне и внутри клеток происходит практически только за счет потока воды в клетки, но не за счет выхода накопленных клетками в период замораживания растворенных веществ. Для исключения постгипертонического лизиса перед возвращением клеток в нормальные условия необходимо удалить растворенные вещества, в том числе и криопротектор, из суспензии поэтапно, постепенно (ступенчато) снижая их концентрацию в отмывающем растворе.

Существует три основных метода отогрева замороженных биообъектов:

- отогрев способом теплообмена, например, с помощью нагретой водяной бани, воздуха или другого теплоносителя;
- отогрев в сверхвысокочастотном электромагнитном поле (СВЧ, УВЧ);
- отогрев объектов под давлением.

Отогрев с помощью теплообмена в виде водяной бани в настоящее время наиболее широко применяется в практике криоконсервирования различных биообъектов. В зависимости от вида биообъекта используют различные температуры (37 - 42°C) и скорости перемешивания теплоносителя. Однако такой способ отогрева имеет ряд недостатков. К их числу можно отнести возникновение значительного перепада температур у стенок и внутри размораживаемого контейнера, плохую управляемость процессом отогрева, поскольку осуществлять регулировку поступающего к образцу теплового потока сложно, отсутствие равномерного температурного поля по объему образца, в результате чего возникают локальные перегревы размораживаемого биообъекта.

Теоретический и экспериментальный анализ процессов, протекающих в биообъектах при их замораживании методом внешнего контактного теплоотвода, показывает, что более перспективным является индукционный нагрев с помощью энергии электромагнитного поля. При этом можно получить высокие скорости повышения температуры и добиться ее равномерного распределения по образцу. Однако для получения оптимальных результатов необходимо предварительно выяснить характер изменения диэлектрических свойств биообъекта в зависимости от частоты и мощности его СВЧ-нагрева, выявить характер распределения поглощенного излучения и особенно фазовых переходов в твердом образце в процессе отогрева. Практически это означает, что в каждом отдельном случае необходимо проводить индивидуальные расчеты мощности СВЧ-излучения для отогрева определенного вида биообъекта. Кроме того, оборудование для

СВЧ-нагрева является достаточно дорогостоящим и далеко не совершенным в аспекте получения однородного температурного поля в размораживаемом объекте, что крайне необходимо при разработке метода СВЧ-отогрева. Следовательно, проблема отогрева биообъектов с помощью СВЧ-нагрева во многом остается нерешенной и требует дальнейших разработок.

Третий способ размораживания биообъектов – теплопередачей под давлением – предусматривает изменения одновременно температуры образца и давления, при котором вода не кристаллизуется, несмотря на пониженные температуры. Данный метод замораживания–отогрева наряду с положительными сторонами и перспективностью имеет существенные негативные стороны. Во-первых, высокие давления сами по себе могут оказывать отрицательные воздействия на структурно-функциональное состояние биообъекта. Во-вторых, методические и технические сложности этого способа не позволяют широко использовать его на практике.

6.8. Особенности глубины замораживания

В зависимости от глубины охлаждения биологических объектов, диапазоны температур можно условно подразделить:

1. Гипотермические температуры: 5 – 0°C.
2. Бытовые низкие температуры: минус 1 – 10°C.
3. Минимально низкие температуры: минус 11 – 20 °C.
4. Умеренно низкие температуры: минус 21 – 60 °C
5. Низкие температуры: минус 61-195°C.
6. Ультранизкие температуры: минус 196 -273°C.

1. Гипотермические температуры. При температурах до 0°C вода в биологических объектах, а также в окружающей среде остается жидкой. Такие температуры используют для кратковременного хранения биологических объектов, например, донорских эритроцитов (до 5 суток) или органов для последующей трансплантации (до 3 суток). Понижение температуры от 37 до 0°C приводит к снижению интенсивности биохимических процессов в клетках и тканях в 7–10 раз, что и позволяет хранить их 6–72 ч. Протекающие при этом в тканях процессы аутолиза на протяжении этого времени не достигают критических величин и позволяют использовать биологические ткани для трансплантации. Более длительное выдерживание биообъектов при гипотермических температурах ведет к необратимым структурным изменениям в цитоплазме и плазматических мембранах, митохондриях, лизосомах, генетическом аппарате, мембранах ЭПР в результате усиления процессов ишемии. Факторы, возникающие в ходе этих процессов, ведут к дезинтеграции процессов синтеза веществ и получения энергии в клетке, потере клеткой ионной асимметрии и разбалансировке ферментативных и регуляторных процессов.

Хранение мяса, рыбы, молочных и других подобных продуктов питания в охлажденном виде (от 0 до 5°C) может осуществляться непродолжительное время – не более 1-3 дней. Это объясняется тем, что

микроорганизмы с оптимальной жизнедеятельностью при 15-20°C все же дают рост и при 0°C. По этой причине указанные выше продукты нельзя долго сохранять в охлажденном виде. Однако некоторые плоды и овощи в целом виде и хорошего качественного состояния, обладающие естественными защитными свойствами, могут при низких плюсовых температурах сохраняться довольно продолжительное время (корнеплоды, картофель, семечковые, цитрусовые плоды и т. п.).

2. Бытовые низкие температуры: минус 1 – 10°C. Диапазон температур морозильной камеры бытового холодильника – минус 5 – минус 8°C можно отнести для многих биообъектов к зоне переохлаждения. В этом диапазоне внеклеточная вода и все виды внутриклеточной воды замерзают, но не полностью. Однако метаболические реакции в клетках практически полностью останавливаются. При длительном хранении биообъектов образуются внешние и внутренние кристаллы льда, клетки обезвоживаются, возникают криповреждения мембран и некоторых органелл. Для хранения биологических объектов с дальнейшим использованием в клинической медицине такие температуры практически не используются. Такой диапазон температур используют для относительно длительного хранения продуктов питания. При этих температурах сохраняется возможность развития некоторых микроорганизмов в жидкой среде.

3. Минимально низкие температуры: минус 11-20°C. При этих температурах вся внеклеточная и значительное большинство внутриклеточной воды биологических объектов кристаллизуется. Клетки обезвоживаются и подвергаются негативному воздействию факторов замораживания. Повреждаются мембраны, органеллы и ферменты. Реакции метаболизма останавливаются, не образуются энергия и новые молекулы. Однако остается возможность протекания катаболических процессов. Для хранения биологических объектов с дальнейшим использованием в клинической медицине такие температуры практически не используются.

Замораживание до диапазона минимально низких температур – более надежный способ сохранения пищевых продуктов, так как развитие почти всех микроорганизмов при этом невозможно. При замораживании многие из них гибнут. Кислая среда способствует этому, однако присутствие сахаров, коллоидов оказывает защитное действие. Отмирание бактерий при обработке холодом объясняется разными причинами: непосредственным воздействием холода; механическим повреждением микроорганизмов внутриклеточными и межклеточными кристаллами льда; изменениями содержащихся в клетках белков. Однако споры бактерий при этих условиях хорошо сохраняются.

4. Умеренно низкие температуры: минус 21 – 60°C. При этих температурах основная масса внеклеточной воды и свободная внутриклеточная вода замерзают. Связанная макромолекулами вода (менее 1%) в клетках остается в незамерзшем состоянии. При этой температуре в закристаллизованной матрице сохраняются жидкие микрофазы, содержащие концентрированные растворы солей, которые оказывают отрицательное влияние на состояние плазматической мембраны клетки и мембраны

внутриклеточных органелл. Метаболизм в клетках при этой температуре отсутствует. Однако наблюдаются некоторые разрушительные процессы в микрофазах незамерзшей воды. Поэтому температуры до минус 80°C редко используют для длительного хранения биологических объектов с дальнейшим использованием в клинической медицине. Существуют лишь методики замораживания и хранения в диапазоне этих температур костей и хрящей. Хранение же мягких биологических тканей зачастую приводит к неблагоприятным результатам. Микроорганизмы не размножаются, не растут, многие погибают, что значительно увеличивает время хранения.

5. Низкие температуры: минус 61-195°C. Температура сухого льда (сублимации диоксида углерода), составляющая минус 78,5 °C, температура компрессорных холодильных камер – минус 80°C и температуры паров жидкого азота относят в криобиологии и криомедицине к диапазону *низких температур*. В этом диапазоне температур внеклеточная, свободная и связанная внутриклеточная вода находятся в замерзшем состоянии. Кристаллизация их устойчивая. Прочно связанная молекулами фракция воды в клетках может незначительно сохраняться в незамерзшем состоянии. Метаболизм, как анаболизм, так и катаболизм, полностью отсутствуют. Клеточные структуры находятся в стабильном консервированном состоянии.

Температуры этого диапазона вполне обоснованно используют для длительного хранения тканей и клеточных суспензий. Такие условия криоконсервирования клеток имеют свои преимущества, так как отличаются относительной простотой и возможностью широкого применения. Эта технология позволяет использовать для хранения обыкновенные компрессорные морозильные камеры. Известны технологии криоконсервирования при этих температурах эритроцитов донорской крови. Особенности этой технологии является использование режимов медленного замораживания и необходимость использования криоконсервантов с высокими концентрациями глицерина (конечная концентрация в замороженных эритроцитах около 40% (4.77M).

Технологии медленного замораживания эритроцитов до минус 80°C с большими концентрациями глицерина требуют более сложной процедуры отмывания после отогрева, однако имеют и ряд преимуществ:

- замораживание и хранение эритроцитов осуществляется в камерах электрорефрижераторов и не требует наличия жидкого азота;

- замораживание, хранение и отмывание можно проводить в стандартных пластиковых контейнерах;

- допускается кратковременное колебание температуры, которое не сопровождается значительным повреждением клеток;

- возможно транспортирование крови в замороженном состоянии в сухом льду и изотермическом контейнере.

Рекомендованный срок хранения клеточных суспензий в парах жидкого азота – до 10 лет.

Температуры этого диапазона применяют также для длительного хранения и использования в медицинской практике кровеносных сосудов,

кожи, хряща и костей (см. главу 25) Существуют и методики криоконсервирования клеточных суспензий в парах сжиженного азота для дальнейшего использования в клинике.

6. Ультранизкие температуры: минус 196 - 273°C. Температура жидкого азота. В большинстве случаев для долгосрочного хранения клеточных суспензий и различных биологических тканей используют температуру жидкого азота – минус 196°C, которую относят к диапазону *ультранизких температур*. В этом температурном диапазоне вся вода в клетках замерзает полностью. Все химические и физические процессы полностью остановлены, только осуществляются переходы электронов в атомах молекул с одной орбиты на другую. Микроорганизмы полностью разрушены или дезактивированы. Но основные клеточные структуры биологических объектов сохраняются в стабильном, законсервированном состоянии. Макромолекулы клеток (белки, липиды и нуклеиновые кислоты) находятся в зафиксированном состоянии и после размораживания сохраняют свою структуру и функции. В условиях столь глубокого замораживания биологические объекты могут сохраняться на протяжении многих лет.

На основе ультранизких температур существуют специальные технологии криоконсервирования клеточных суспензий: эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, миелокарицитов, гепатоцитов и др. (см. главу 28), а также различных тканей (см. главу 25) для нужд клинической и экспериментальной медицины.

6.9. Оборудование для замораживания и криоконсервации

Оборудование для замораживания, хранения, перемещения образцов при пониженных температурах и отогрева представляет собой разнообразные группы устройств.

Программные замораживатели – это комплексные электронные устройства, предназначенные для обеспечения заданного и точного охлаждения биологических объектов до низких и сверхнизких температур с целью последующего низкотемпературного хранения с возможностью восстановления прижизненных функций. Программные замораживатели укомплектованы резервуарами жидкого азота высокого давления для выполнения режима заморозки.

CryoMed (Thermo Fisher Scientific) – программные замораживатели для контролируемого охлаждения различных биологических объектов (сперма, эмбрионы, клетки, препараты и компоненты крови). Камера замораживателя выполнена из полированной стали. Для обеспечения герметичности между дверцей камеры и камерой используются две полые прокладки. Два клапана позволяют точно контролировать температуру и увеличивать скорость заморозки. Для максимально равномерного распределения температуры в камере используется принудительная вентиляция. Во время работы предотвращается преждевременное начало процесса кристаллизации и нарастание инея в камере. При открывании дверцы автоматически

прекращается подача жидкого азота. В процессе замораживания осуществляется температурный контроль камеры и образца. Замораживатель имеет шесть стандартных протоколов и десять протоколов, программируемых пользователем (рис.6.3 А, Б).

Программные замораживатели серии Kryo (Planer) оснащены системным контроллером MRV, поддерживающим несколько протоколов. На графическом дисплее отображаются данные о ходе процесса в реальном времени (значения конечной температуры, температуры образца и температуры камеры, стадия программы и текущий профиль температур), которые доступны для просмотра и распечатки на встроенном принтере после завершения протокола. Конечная температура – минус100-180°C обеспечивает целостность образцов при транспортировке до хранилища. Криозамораживатели могут долго выдерживать образец при конечной температуре протокола. Установки защищены паролем доступа, являющимся частью многоуровневой системы защиты образцов. Процесс может быть начат при температуре выше температуры окружающей среды. Нагрев полностью контролируется (рис.6.3 А).

Pressurized Stainless Steel Tank 812 (Thermo Fisher Scientific) – подключаемые к программным замораживателям стальные резервуары высокого давления для жидкого азота. Все резервуары имеют стальную емкость для жидкого азота, вентили и регуляторы давления.



Рис. 6.3. Общий вид программного криозамораживателя (А) и резервуара для жидкого азота (Б). (Объяснения в тексте)

Программный замораживатель СТЕ 220 (Рис. 6.4) работает по принципу «открытого сосуда»: вместо использования закрытой камеры, система погружает соломины вдоль градиента температур, который

устанавливается после заполнения сосуда жидким азотом. Пользователь может сохранить до девяти программ замораживания в энергонезависимой памяти.



Рис. 6.4. Общий вид программного замораживателя STE2200

Транспортные сосуды Дьюара (Рис.6.5.). Настольные контейнеры ThermoFlask (Thermo Fisher Scientific) предназначены для хранения небольших объемов жидкого азота в различных отраслях промышленности, использующих сжиженные газы, а также в медицинских учреждениях. Корпус криоконтейнеров ThermoFlask изготовлен из нержавеющей стали, эмалированной стали или пластика, объем от 200 мл до 10 л. Среди моделей есть переносные криоконтейнеры с ручками и крышками, мелкие контейнеры с широкой горловиной, пластиковые контейнеры и эмалированные контейнеры, с крышками и ручками, и без них. Широкий выбор моделей позволяет выбрать сосуд практически под любую задачу. Например, низкий широкий сосуд с широкой горловиной рекомендован для работ с колотым и сухим льдом.



Рис. 6.5. Общий вид сосудов Дьюара разных размеров

Переносные системы хранения в жидком азоте серии CMR/CMC (Thermo Fisher Scientific) предназначены для длительного и безопасного хранения образцов в контейнерах при минимальном количестве азота. Контейнеры изготовлены из удароустойчивого легкого алюминия и снабжены замком на крышках. В этом оборудовании реализован принцип с вакуумной теплоизоляцией. Контейнеры укомплектованы штативами для образцов, которые имеют разную расцветку для облегчения поиска необходимого биоматериала.

Заключение

Сравнение преимуществ и недостатков возможных режимов замораживания приведены в нижерасположенной таблице 6.2.

Таким образом, стратегия выбора и особенности применения тех или иных режимов замораживания и отогрева основана на минимизации действия на клетку различных криоповреждающих факторов для более полного сохранения ее структурно-функционального состояния. При возможности используют режимы, обеспечивающие витрифицированное состояние замораживаемой клеточной суспензии или многоэтапные режимы охлаждения. Основная стратегия выбора скорости замораживания и крипротекторов состоит в предотвращении кристаллизации, в особенности с крупными кристаллами, и обеспечении мягкой дегидратации клеток перед затвердеванием суспензии.

Таблица 6. 2. Особенности режимов замораживания

Режимы замораживания	Особенности кристаллизации	Особенности дегидратации	Эффекты раствора	Витрификация	Механические повреждения
Медленные	Первоначально внеклеточная	Осмотическая дегидратация	Влияние гиперконцентраций	Отсутствует	Наблюдаются
Быстрые	Внутриклеточная	Отсутствует	Не наблюдаются	Возможна	Наблюдаются
Сверхбыстрые	Отсутствует	Отсутствует	Не наблюдаются	По всему объему	Не наблюдаются
Многоэтапные	Внеклеточная	Осмотическая дегидратация	Минимизируются	Отсутствует	Не наблюдаются

Биологические объекты сильно отличаются по размерам, формам, строению и организации. Поэтому для каждого объекта подбирается наиболее подходящий способ замораживания.

В частности, на результаты криоконсервирования микроорганизмов, как впрочем, и других клеточных суспензий, оказывает влияние скорость охлаждения, поскольку она регулирует уровень дегидратации, степень кристаллообразования, фазовые переходы липидов в мембранах и т. д. При охлаждении для каждого вида микроорганизмов существует своя оптимальная скорость, которая во многом обусловлена проницаемостью

плазмолеммы для воды, а также размерами клеток и их формой. Поскольку проницаемость мембран большинства микроорганизмов для воды низкая, хорошие результаты при криоконсервировании получают, используя медленные скорости охлаждения. Кроме медленных рекомендуются также ступенчатые режимы замораживания, а при консервации с криопротекторами хорошие результаты для некоторых микроорганизмов получают и при достаточно быстром замораживании. На практике при криоконсервировании микроорганизмов (бактерии, микоплазм грибков и др.) наиболее хорошо зарекомендовали себя растворы глицерина с различного рода добавками.

Низкотемпературная консервация эритроцитов может осуществляться путем замораживания клеток до минус 196°C со скоростью 200 – 300 град/мин под защитой 15 – 20%-го раствора глицерина или другого криопротектора, который легко проникает через плазматическую мембрану клеток при комнатной температуре и предотвращает формирование крупных внутриклеточных кристаллов льда. В ИПКиК разработана технология криоконсервирования эритроцитов под защитой криозащитного раствора – пропандиосахароля (1,2-пропандиол, сахароза, хлористый натрий), используя двухэтапный режим замораживания.

Ядерные клетки более чувствительны к действию низких температур, чем безъядерные. Криоконсервирование суспензий ядерных клеток осуществляют под защитой проникающих (глицерин, ДМСО, ДМАЦ) и частично проникающих (ПЭО м.м. 400) криопротекторов с возможным добавлением сахарозы. Наиболее приемлемый двух-, трех- или четырехэтапный режим замораживания с временной экспозицией.

Замораживание естественных белковых смесей (плазма и сыворотка крови, фолликулярная жидкость, водно-солевые экстракты плаценты) с неблагоприятными режимами (от 1 до 7 град /мин) приводит к разрыхлению поверхностных полипептидных цепей и агрегации биомакромолекул. Для сохранения нативных свойств биомакромолекул при криоконсервировании белковых растворов без криопротекторов необходимо использование охлаждения со скоростью не менее 100 град/мин.

Криоконсервация фрагментов биологических тканей осуществляется под защитой проникающих криопротекторов – глицерина, ДМСО, пропиленгликоля, ПЭО м.м. 400 с использованием двухэтапного замораживания.

Наиболее эффективно консервацию органов проводят способом гипотермии, сочетающим охлаждение до 0°C и непрерывную перфузию, что позволяет сохранить их на период времени до 72 час. Криоконсервирование органов млекопитающих и человека (почка, печень, сердце, мозг) в настоящее время невозможна из-за разрушения тканей органов кристаллами льда.

Рекомендуемая литература:

1. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А., Вишневский В.И., Розанов Л.Ф. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. – Киев.: Наук. Думка. – 1977. – 242 с.
2. Франкс Ф. Вода и водные растворы при температурах ниже 0°C. – Киев: Наук, думка. – 1985. – 386 с.
3. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. шк. – 1988. – 21с.
4. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев.: Наук. думка. – 1994. – 432 с.
5. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев.: Наук. думка. – 1994. – 144 с.

Глава 7. Действие низких температур на макромолекулы и ферменты

7.1. Гипотермия. 7.2. Замораживание-отогрев. 7.3. Повреждающие факторы замораживания. 7.4. Криочувствительность мембранных белков и ферментов. 7.5. Действие низких температур на структурно-функциональное состояние гемоглобина. 7.6. Значение скоростей замораживания. 7.7. Действие криопротекторов. 7.8. Действие замораживания на генетический материал.

7.2. Гипотермия

Многие структурные и функциональные белки, а также ферменты в составе клеток и тканей обладают определенной криоустойчивостью. Однако изолированные ферменты в искусственных растворах оказываются весьма уязвимыми к действию низких температур (рис.7.1). Состояние изолированных белков, особенно с четвертичной структурой, изменяется уже при 4°C, поскольку охлаждение до этих температур влияет на некоторые физико-химические свойства воды, например, на ее плотность и вязкость, вследствие чего может изменяться первоначальная конформация белковой глобулы. Такие трансформации сопровождаются нарушениями внутримолекулярных взаимодействий активных участков биополимера, что сказывается на его функции. Эти нарушения заключаются в изменении жесткости полипептидных цепей белка и пространственного расположения отдельных его участков. Методы радиоспектроскопии позволяют наблюдать такие трансформации структуры каталитических белков при температуре около 0°C и, как следствие, ингибирование их функции.

Ряд олигомерных белков испытывают при охлаждении так называемую «холодовую инактивацию» - они диссоциируют (распадаются) на несколько субъединиц после охлаждения до 0°C. Например, это такие ферменты, как глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа эритроцитов, карбамоилфосфатсинтетаза, аденозинтрифосфатаза, пируваткарбоксилаза, рибозо-1,5-бифосфат-карбоксилаза-оксигеназа.

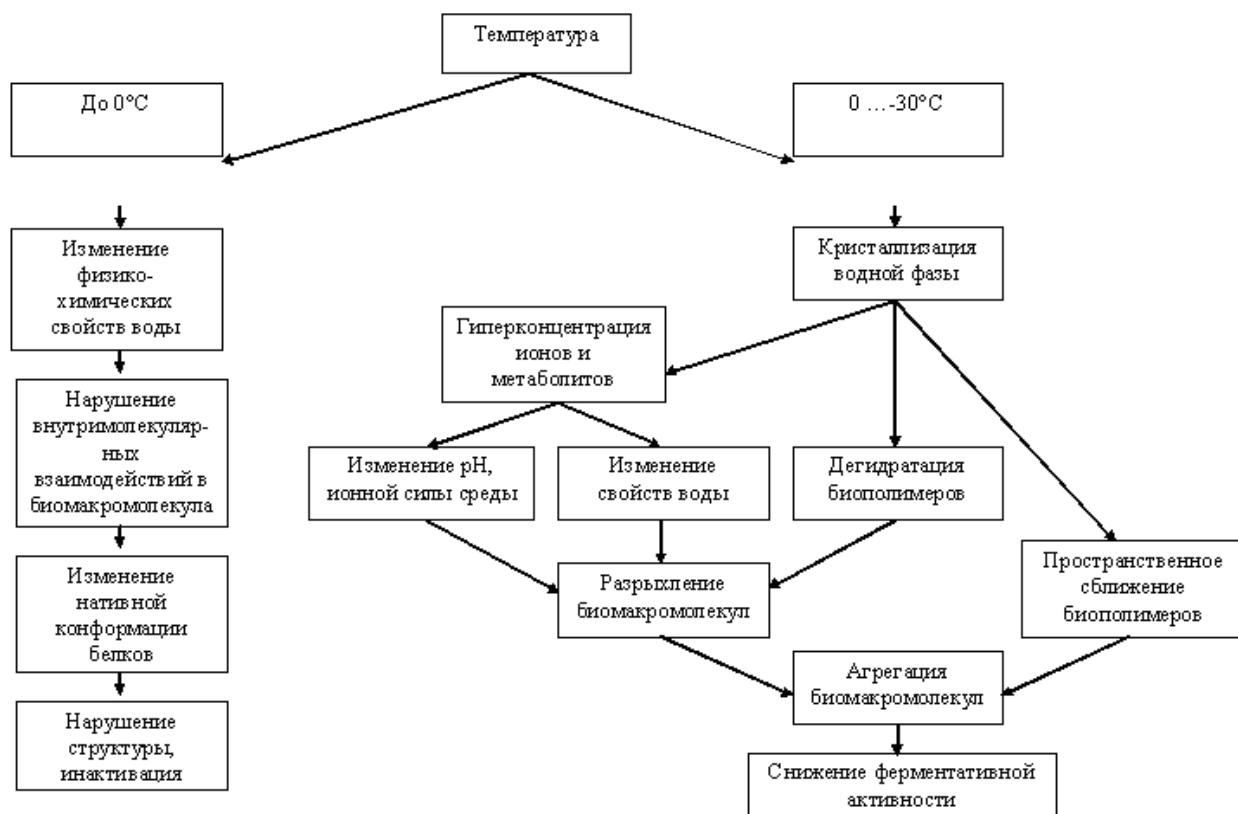


Рис. 7.1. Действие низких температур на биомакромолекулы в средах без криопротекторов. А – гипотермия. Б – замораживание.

В противоположность перечисленным ферментам, другие белки (например, уреазы и 17 β -оксистероиддегидрогеназы) претерпевают при охлаждении агрегацию с другими белками, сопровождающуюся изменением их структуры.

7.3. Замораживание-отогрев

При замораживании изолированных белков до более низких температур и последующем отогреве наблюдаются агрегация, а также изменение конформации – разрыхление белковой глобулы. Например, замораживание-отогрев некоторых белков (глюкозооксидазы, цитохромоксидазы, сывороточного альбумина) с использованием низких скоростей (1–7 град/мин) нарушает внутримолекулярные взаимодействия в биомакромолекулах и влияет на их конформацию, а именно разрыхляет поверхностные полипептидные цепи.

Методом ИК-спектроскопии показано, что замораживание-отогрев бычьего сывороточного альбумина приводит к дегидратации биомакромолекул, связанной с их агрегацией при сохранении вторичной структуры. Криоустойчивость белков, в том числе и мембранных, зависит от

уровня их надмолекулярной организации и среды замораживания (в растворе, в составе мембран, клеток или тканей). Быстрое замораживание (до -196°C) в буферных растворах без значительной потери специфических функций хорошо переносят простые белки (рибонуклеаза, пепсин, трипсин, химотрипсин), имеющие устойчивую конформацию за счет S-S ковалентных связей полипептидной цепи. Однако вследствие многократного замораживания и медленного отогрева активность ферментов снижается.

После быстрого замораживания под защитой глицерина такие гидролитические ферменты, как липаза, амилаза, трипсин и химотрипсин хорошо и длительно сохраняются даже при неблагоприятных температурах от -20 до -25°C . После замораживания сложных белков с четвертичной структурой криповреждения проявляются в большей степени. В церулоплазмине и гаптоглобине после низкотемпературного воздействия наблюдаются нарушения структурных и функциональных свойств. После замораживания-отогрева водных растворов бычьего сывороточного альбумина наблюдали агрегацию отдельных биомакромолекул, которая интерпретируется как образование межмолекулярных S-S связей, или полная денатурация белка. Образование дисульфидных сшивок было также отмечено при исследовании действия замораживания на структуру лактатдегидрогеназы. Под влиянием глубокого охлаждения могут образовываться гибридные комплексы ферментов. Химические процессы, протекающие в водных растворах полимеров при низких температурах, обусловлены силами, возникающими при изменении агрегатного состояния воды. При этом могут происходить разрывы цепей макромолекул с появлением свободных радикалов, а при размораживании – образовываться новые связи и молекулы, отличающиеся от первоначальных. В результате замораживания-отогрева смеси двух фракций изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ₁ и ЛДГ₅) происходит диссоциация фермента на субъединицы, а впоследствии осуществляется спонтанная рекомбинация с образованием гибридных изоферментов. Образование гибридных изоферментных форм, обусловленное внутримолекулярными нарушениями в исходных белках, чаще всего наблюдается при медленных или многократных режимах замораживания до минус $30-70^{\circ}\text{C}$, когда концентрирование солей и метаболитов проявляет свое максимальное повреждающее действие на биомакромолекулы. Если лактатдегидрогеназу замораживать со скоростью $300-400$ град/мин до минус 196°C , а также в бессолевом растворе, то гибридизация не происходит. Методом электрофореза установлено гибридизацию лизоцима, рибонуклеазы, смеси лизоцима и рибонуклеазы под действием замораживания, а также подтверждено криогибридизацию лактатдегидрогеназы.

В результате замораживания-отогрева в разной степени повреждаются в растворе и в тканях цитохромоксидаза (ЦХО), цитохром P-450 и транспортные белки. Показано, что после медленного замораживания тканей сердца крысы и изолированных митохондрий снижается активность цитохромоксидазы. Снижается активность этого фермента и под влиянием

двухэтапного замораживания на клетки костного мозга. Данный гемсодержащий белок соединен с цитозольной поверхностью внутренней мембраны слабыми электростатическими связями, что обеспечивает его высокую латеральную подвижность в мембране. Изменение активности цитохромного участка дыхательной цепи может быть чувствительным тестом холодового повреждения митохондрий.

Охлаждение вызывает изменения молекулярной архитектуры и фазового состояния липидного компонента мембран, что может приводить к повреждениям ферментов, входящих в состав биологических мембран. Активность α -кетоглутаратдегидрогеназы во многом определяется состоянием окружающих мембранных липидов, и ее снижение наблюдается после нахождения образцов в зоне температуры фазовых переходов последних, в то время как изменения активности цитохром-с-редуктазы и цитохром-с-оксидазы в подобных условиях не наблюдаются.

Снижение ферментативной активности каталитических белков после замораживания-отогрева, вплоть до 50% для ЦХО и до 70% для глюкозооксидазы, зависит от скорости охлаждения и солевого состава среды и является результатом изменения структуры белка, вследствие которого наблюдалось увеличение степени гидрофобности в области активного центра. Кроме того, замораживание и последующий отогрев ЦХО приводят к уменьшению размеров липопротеинового комплекса в результате отщепления части ассоциированных с белком липидов. Процедура замораживания-отогрева дестабилизирует структуру фермента, что приводит к снижению устойчивости ЦХО. Это обусловлено конформационными изменениями белковой части и не зависит от количества и свойств связанных с белком липидов. Снижение ферментативной активности ЦХО в результате криоповреждения фермента объясняется изменением конформации внутри белковой глобулы, нарушающим взаимодействие между двумя гемами.

Белки с четвертичной структурой (как изолированные, так и входящие в состав биологических систем) наиболее подвержены влиянию низких температур. Однако наличие криорезистентных белков с четвертичной структурой свидетельствует о частичной универсальности этого утверждения. Не установлена также степень обратимости наблюдаемых изменений структурно-функциональных свойств ферментов после замораживания и последующего отогрева. Механизм структурных изменений белковых макромолекул под влиянием действия низких температур можно использовать для раскрытия природы молекулярной организации и функционирования биомacroмолекул с четвертичной структурой.

Процесс криоденатурации белков, который проявляется в потере исходного структурного состояния белковой молекулы под влиянием холода, в отличие от высокотемпературной денатурации, управляемый, а при использовании криопротекторов возникает возможность еще в большей степени сохранить свойства биомacroмолекул при замораживании. В случае замораживания белков в изолированном виде наблюдается повреждающее действие низких температур, проявляющееся в обратимой денатурации

биомакромолекул. Возможность низкотемпературной денатурации белков определяется природой гидрофобных взаимодействий, которые в глобулярных белках образуют основную систему внутримолекулярных кооперативных связей, а сам процесс низкотемпературной денатурации отличается от обычной тепловой денатурации.

7.4. Повреждающие факторы замораживания

Охлаждение биологических суспензий до температуры фазового перехода растворителя сопровождается рядом физико-химических процессов, которые могут оказывать повреждающее влияние на структуру и функцию белков. Установлено, что повреждающее воздействие на биомакромолекулы при замораживании могут оказывать такие процессы, как концентрирование солей и других компонентов раствора при вымораживании основной массы свободной воды, изменение межмолекулярных взаимодействий и pH среды. Совокупность этих факторов получила общее название «эффекты раствора». Поскольку указанные физико-химические изменения взаимообусловлены и являются следствием вымораживания воды, то влияние этих факторов на биомакромолекулы, по существу, комплексное. Ионы солей в растворе оказывают влияние на белки в основном путем электростатического взаимодействия с полярными аминокислотными остатками, находящимися на поверхности белковой молекулы.

При замораживании-отогреве изолированных ферментов их активность существенно зависит от солевого состава среды. Так, если средой замораживания ЦХО служил фосфатный буфер, то значимого снижения активности фермента после отогрева не наблюдается. А в трис-буфере или в фосфатном, содержащем 0,15M NaCl, активность фермента после замораживания-отогрева уменьшается почти в 2 раза. Инактивация фермента происходит в диапазоне минус 20-30°C в результате действия на ЦХО концентрированных растворов солей после вымораживания свободной воды. Ингибирование ЦХО обусловлено изменением её структуры в зоне активного центра.

Высокие концентрации некоторых катионов и анионов, которые в небольших концентрациях необходимы для поддержания структуры и функции белка, могут оказывать повреждающее действие. Такие ионы, как, например, F^- , NO_3^- , Cl^- , Br^- , способны взаимодействовать с катионом меди, который находится внутри белковой глобулы ЦХО. Изменения третичной и четвертичной структур сывороточного альбумина наблюдаются в растворах с концентрацией LiCl выше 4 M. Необратимые конформационные изменения иммуноглобулинов под действием солей NaCl, KCl, NaBr происходят при концентрациях выше 2-4 M, а денатурация сывороточного альбумина была наблюдалась при концентрации NaCl 4,6 M.

Процессы рекристаллизации, происходящие при оттаивании, дополнительно увеличивают повреждающее действие солей на биологические макромолекулы (рис. 7.2). В низкотемпературном

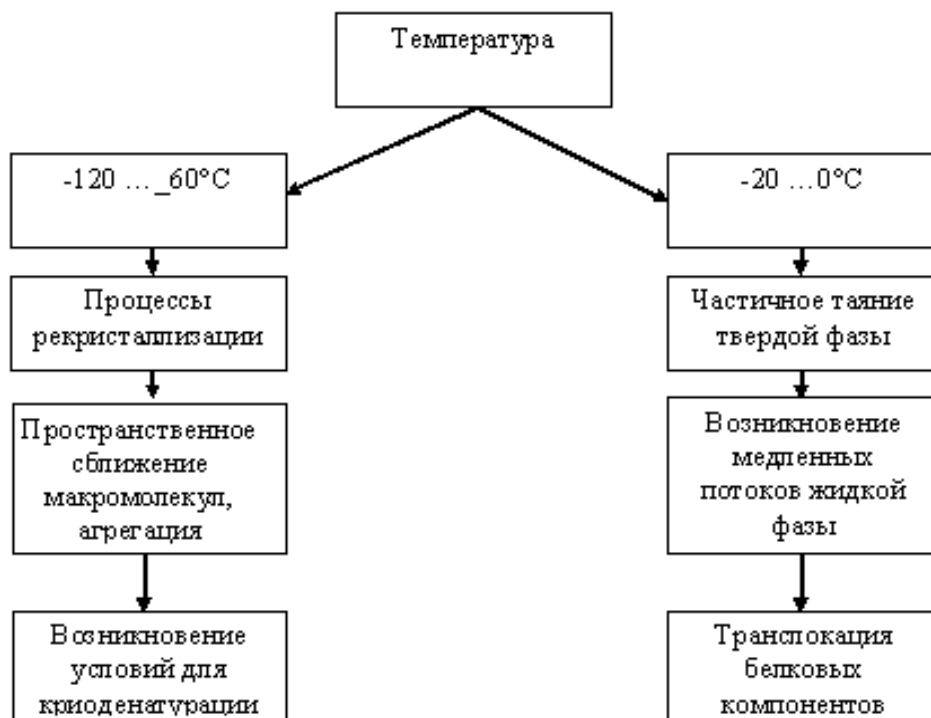


Рис. 7.2. Реакция биомacroмолекул на отогрев после замораживания. В левой колонке отображены процессы, протекающие в диапазоне температур от «низких» до «умеренно низких», в правой – от «умеренно низких» до «нулевых».

повреждении белков с четвертичной структурой существенными факторами являются концентрирование солей в эвтектической области температуры и снижение рН. Наличие концентрированного солевого раствора, который формируется в микрофазах затвердевшей матрицы, уже достаточно для распада белка на субъединицы, как и изменения только рН – для дестабилизации белков с четвертичной структурой. Разная растворимость неорганических солей, в том числе входящих в состав буферных растворов, в процессе замораживания может влиять на значительный сдвиг рН, причем при использовании растворов фосфатных буферов соли калия сдвигают рН меньше, чем соли натрия. Для замораживания ферментов в ряде случаев применяют буферные растворы на основе молекул-цвиттерионов, поскольку изменение рН при кристаллизации водной фазы с охлаждением таких растворов незначительно. При этом причиной повреждения биомacroмолекул может быть концентрирование нейтральных солей.

Роль дегидратации. Дегидратация биомacroмолекул вследствие вымораживания воды, связанной с белком, может существенно влиять на криоповреждение белков при замораживании и последующем отогреве.

Особенности дегидратации в повреждении белковых систем в результате замораживания-отогрева широко изучались на ферментах, и было установлено, что дегидратация биомакромолекул является одной из причин криоповреждения каталитических белков. В частности, было исследовано изменение гидратации при действии замораживания на каталазу и пероксидазу, при этом показано, что именно дегидратация является причиной их криоповреждений.

На основании результатов измерений изотерм адсорбции установлено существование нескольких фракций связанной с белком воды. Наличие нескольких фракций связанной с белком воды подтверждено также такими методами, как ядерный магнитный резонанс, температурно-пертурбационная спектрофотометрия и сканирующая калориметрия. Первая фракция воды находится на отдаленном расстоянии от поверхности биополимеров или компонентов мембран, характеризуется высокой подвижностью молекул и является метаболически активной. Она обеспечивает транспорт веществ и метаболитов, катализ и другие функциональные процессы. Вторая фракция менее подвижна, расположена ближе к поверхности биополимера, локализована в гидрофобных карманах либо других извитых канальцах, существующих около поверхности биомолекул. Вторая фракция имеет более сложную структуру, чем первая, и состоит из клатратгидратов или полиморфнольдopodobных систем. Третья фракция воды составляет би- и мономолекулярный слой и прочно связана непосредственно с поверхностью биомолекул за счет сил взаимодействия с заряженными группировками белка. По мере удаления от поверхности биополимера, переходя от третьей к первой фракции, подвижность молекул воды, как и температура ее кристаллизации, увеличиваются. Методы ЯМР и ЭПР спиновых меток показывают, что вблизи молекул белков существует слой воды толщиной 0,5–0,6 нм, микровязкость которого в 2–3 раза выше, чем у свободной фракции воды. Прочность связи молекул фракций связанной воды с молекулами биополимеров важна в формировании и поддержании нативной структуры биомакромолекул и их функционирования в живых системах. Охлаждение, низкотемпературное воздействие значительно изменяют структуру воды, фракции которой участвуют в стабилизации конформации биополимеров. Важной термодинамической особенностью, связанной с поверхностью биополимера фракции воды, является ее более низкая температура плавления по сравнению со свободной водой, которая продолжает снижаться по мере дегидратации белка. Фракции воды, локализованные вблизи поверхности или в замкнутых полостях биополимеров, при замораживании имеют размытую зону кристаллизации, охватывающую температурный диапазон от 0 до -70°C и даже до -80°C . Еще до более низких температур (-120 или -130°C) сохраняется подвижность молекул в прочно фиксированном би- или мономолекулярном слое воды.

Установлено существование молекул воды, связанных с внутренней поверхностью белковой глобулы. Это свидетельствует о том, что в глубоких

полостях белковой глобулы находится прочно связанная с молекулой белка вода.

Как отмечалось ранее, при охлаждении, и особенно при замораживании, свойства воды, поддерживающей в физиологических условиях нужную конформацию биомакромолекул, подвержены значительным изменениям. Поэтому роль воды в структурной стабильности или нестабильности замороженных биомакромолекул является определяющей как в механизмах криоповреждений, так и в их обратимости в процессе криоконсервирования. Это учитывается также при разработке средств и подходов криозащиты. Для белковой глобулы в воде равновесие сил, поддерживающих ее конформацию, достигается благодаря расположению определенного числа гидрофобных групп не только внутри, но и на поверхности белковой глобулы, наличию молекул воды внутри макромолекул. Равновесие сил осуществляется также благодаря двойственному характеру воздействия воды на структуру белка: стабилизирующему (за счет гидрофобных взаимодействий) и разрыхляющему (за счет эффектов конкуренции молекул воды за межцепочечные водородные связи в пределах белковой глобулы).

Свойства воды около гидрофобных или гидрофильных участков биологических молекул радикально отличаются от ее свойств поведения в растворе. Холодовая денатурация биомакромолекул во многом обусловлена изменениями взаимодействий между молекулами воды и неполярными группами биомолекул. Гидратационный слой, структурно связанный с белковой молекулой, имеет большое значение для стабилизации ее конформации, необходимой для реализации белком специфических функций. Связанную, упорядоченную, или биологическую воду в криобиологии еще называют «незамерзающей водой».

Роль водородных связей. Следствием влияния низких температур на биомакромолекулы является также нарушение водородных связей, которые стабилизируют структуру биополимеров и определяют их пространственную конформацию. Аналогичные выводы о стабилизирующем характере водородных связей были получены при теоретическом рассмотрении переходов спираль-клубок в полипептидах.

Гидрофобные взаимодействия. Кроме водородных связей и гидрофильных взаимодействий важную роль в стабильности белков играют гидрофобные эффекты. Это обусловлено ролью воды в определении стабильности гидрофобных частей белковой молекулы, которые скрыты внутри молекулы. В результате нарушения третичной и четвертичной структуры биомакромолекул после замораживания-отогрева значительное число гидрофобных боковых цепей, скрытых во внутренней части молекул белка, могут открыться и вступить в контакт с водой. Это приводит к усилению нарушений свойств и функций белков и других макромолекулярных комплексов. Кроме этого, следствием воздействия низких температур может быть изменение растворимости белков и их агрегации, что также заметно изменяет их активность и функции.

7.5. Криочувствительность мембранных белков и ферментов

Каталитические и структурные белки, встроенные в мембрану, находятся в липидном окружении, которое является стабилизатором и регулятором их функции. Следовательно, активность ферментов в составе мембран будет в значительной степени зависеть как от структурной целостности активного и аллостерического центра глобулы, так и от физического состояния фосфолипидов, окружающих белок. Липиды, тесно примыкающие к белку, образуют так называемый слой аннулярных липидов, которые содержат большое число насыщенных жирных кислот, фазовые переходы которых из жидкокристаллического состояния в гель-фазу происходят уже при температурах, близких к 0°C.

Поскольку при замораживании происходят фазовые переходы и латеральное разделение основной массы фосфолипидов, создаются условия для непосредственного воздействия «эффекта раствора» на мембранные белки, так как при фазовом разделении липидов белки могут «выдавливаться» из липидного бислоя. Поэтому низкотемпературное повреждение ион-транспортующих либо рецепторных белков плазматических мембран, мембран саркоплазматического ретикулума, ферментных комплексов мембран митохондрий (например, α -кетоглутаратдегидрогеназа, цитохром-С-оксидаза,) особенно сильно возрастает при температурах фазовых переходов липидов. Повреждение мембрановстроенных ферментов особенно усиливается при медленном замораживании до минус 25°C, поскольку в диапазоне этих температур в канальцах льда существуют жидкие микрофазы, в которых находятся гиперконцентрированные растворы солей, изменены тоничность и pH. Все это создает предпосылки для усиления свободнорадикальных процессов ПОЛ в мембранах. Процессы ПОЛ клеток, которые сопровождаются накоплением в мембране конечных (МДА, эпоксиды) и промежуточных продуктов ПОЛ, оказывающих токсическое действие на функции белков. При углублении процессов гидролиза аннулярных липидов может нарушаться конформационное состояние трансмембранных белков.

7.6. Действие низких температур на структурно-функциональное состояние гемоглобина

Замораживание и последующий отогрев растворов гемоглобина человека не приводят к существенным необратимым изменениям его структуры. Это показано методом калориметрии, электронного парамагнитного резонанса спиновых меток и другими. Однако имеются данные, полученные методом ультрафиолетовой спектрофотометрии, о конформационных изменениях молекул гемоглобина А и фетального гемоглобина после замораживания-отогрева растворов этих белков. Об этом свидетельствует смещение максимума спектра поглощения белков в коротковолновую область. Это обусловлено увеличением доступности

молекулам растворителя тирозиновых аминокислотных остатков (изменения первой производной спектра поглощения происходят в области 277 нм), располагающихся в полярных областях молекулы. Таким образом, наблюдавшийся конформационный переход затрагивает полярные области белковых молекул. При этом замораживание-отогрев растворов гемоглобина А и гемоглобина F, находящихся преимущественно в оксиформе, приводит к функциональным изменениям в этих белках. Содержание метгемоглобина в растворах гемоглобина А и гемоглобина F после замораживания-отогрева и последующего хранения в течение 0,5–1 суток при 4°C существенно увеличивается. Таким образом, при замораживании-отогреве создаются условия (возможно, из-за концентрирования солей в процессе вымораживания воды), способствующие окислению железа в белках. Считается, что снижение концентрации восстановленного глутатиона, а также НАД Н₂ в эритроцитах даже при умеренной гипотермии может способствовать окислению гемоглобина в метгемоглобин. Использование криопротекторов в концентрациях 10–40% (глицерина и 1,2-ПД для гемоглобина А и глицерина – для гемоглобина F) позволяет сохранить конформацию гемоглобинов после замораживания-отогрева.

7.7. Значение скоростей замораживания

Большую роль в обеспечении сохранности белков играют скорости замораживания. При охлаждении с умеренными скоростями (~20град/мин) образуются кристаллы с большей поверхностью, по сравнению с кристаллами, которые возникают при замораживании с низкими скоростями (~1–2град/мин). При использовании умеренных скоростей охлаждения могут возникать значительные денатурационные изменения биомакромолекул. Высокие скорости замораживания существенно снижают время пребывания молекул в неблагоприятных условиях, поэтому их использование более предпочтительно. С увеличением концентрации белка его стабильность повышается, это можно объяснить уменьшением относительного количества белка на разделе поверхности лед – концентрированный раствор. В концентрированных растворах белков даже процессы денатурации биомакромолекул обратимы в 85-90% случаев.

Агрегация. Замораживание сыворотки крови, фолликулярной жидкости, водно-солевых экстрактов плаценты со скоростями охлаждения от 1 до 7 град/мин приводит к разрыхлению поверхностных полипептидных цепей и агрегации биомакромолекул. При образовании агрегатов с молекулярными массами 120 и 300 кДа высокомолекулярными белками (альбумин, глобулины) в процессе могут принимать участие и биомакромолекулы с молекулярной массой 12 кДа и ниже. Структурные изменения в белковых компонентах сыворотки плацентарной крови человека, связанные с индуцируемой агрегацией белков, также обусловлены процессами замораживания-отогрева. Возникающее при криоконсервировании нарушение межмолекулярных взаимодействий в

сложных, многокомпонентных системах, в том числе сыворотки крови, может приводить не только к структурно-конформационным изменениям белковых молекул, но и модификации некоторых показателей всей белковой системы. Так, исследование влияния факторов криоконсервирования на стабильность физиологических показателей в образцах сыворотки крови, хранившейся в течение 2 и 25 лет при -25°C , по сравнению с образцами, хранившимися в течение 1 месяца, выявило в них определенные изменения. В частности, уровень одних показателей (натрия, кальция, железа и креатинина) не изменялся, в то время как другие имели значимые отличия (концентрация мочевой кислоты снижалась на 7,6 %, уровень билирубина в пробах – на 59,4 %). Данные нарушения могут быть связаны, в первую очередь, с возможностью изменений во взаимодействии между различными компонентами сыворотки, включая макромолекулы, малые органические и неорганические молекулы. При хранении в криобанке сыворотки крови при минус 25°C изменяются также концентрации альбумина и свободных жирных кислот. Причем в образцах, хранившихся в течение 6–12 лет, данные показатели увеличиваются по сравнению с 3-х летними образцами. Повышение уровня свободных жирных кислот является следствием их высвобождения из липопротеидных комплексов, а увеличение содержания альбумина в образцах сыворотки может быть обусловлено прогрессирующим анфолдингом белка.

На основании многочисленных исследований предложен механизм криоповреждений биомacroмолекул в результате их агрегации при замораживании. Суть его состоит в следующем. Установлено, что при замораживании суспензии макромолекул с низкими скоростями происходит разрыхление поверхностных полипептидных цепей белковых молекул. В результате разрыхления молекул белка формируется такая их конформация, при которой часть неполярных аминокислотных остатков белка переходит из внутренней области глобулы на ее поверхность. Сближение таких макромолекул в процессе вымораживания свободной воды приводит к взаимодействию их гидрофобных участков, обуславливая агрегацию биомacroмолекул.

При использовании высоких скоростей охлаждения агрегация отсутствует или значительно снижается. Это объясняется как недостаточной степенью разрыхления, так и уменьшением времени нахождения системы в условиях, способствующих агрегации, и уменьшением диффузии в граничные области.

Исходя из этого, выработаны рекомендации по криоконсервированию белковых растворов без криопротекторов с использованием режима охлаждения со скоростью не менее 100 град/мин, с целью сохранения функциональных свойств биомacroмолекул.

7.7. Действие криопротекторов

В настоящее время для защиты биологических объектов различного уровня организации при замораживании часто применяется ряд химических веществ - криопротекторов, представленных достаточно широким спектром соединений (см. главу 9). Наиболее вероятные механизмы защиты – это их способность модифицировать структуру растворителя, эффективно предотвращать кристаллизацию, понижать концентрацию солей в среде, образуя комплексы с биологически важными ионами. Кроме того, криопротекторы могут предотвращать структурные перестройки макромолекул, воздействуя на белковую глобулу путем стабилизации системы водородных связей или путем сорбции на их поверхности с частичным замещением связанной воды.

Но смешанные растворители, включающие криопротекторы, ставят ряд сложных проблем, так как становятся неизвестными свойства такого растворителя и его взаимодействие с биомacroмолекулами. Под их действием могут происходить разнообразные конформационные изменения белков, которые переводят их в денатурированное разупорядоченное состояние.

Эффект органических добавок объясняют их влиянием на гидрофобные взаимодействия. В гликолях гидрофобность, по сравнению со спиртами, ниже, что обуславливает менее выраженное денатурирующее действие. Более того, глицерин может оказывать стабилизирующее влияние на белки. Результаты ряда работ свидетельствуют о преимущественном связывании спиртов с белками. При этом происходит замещение внутримолекулярных гидрофобных взаимодействий на гидрофобные взаимодействия с неполярной добавкой, что может нарушать функциональность белков. Гидрофобные взаимодействия усиливаются за счет упорядочения криопротекторами структуры воды.

Криопротекторы могут способствовать разрушению белков с четвертичной структурой. Для сложных белков диссоциация на субъединицы в растворах криопротекторов происходит чаще в случае, если связывание субъединиц происходит за счет гидрофобных взаимодействий. Криопротекторы также способны в значительной степени модифицировать белок-липидные и липид-липидные взаимодействия, непосредственно воздействуя на мембранные белки. Установлена возможность ингибирования целого ряда ферментов, входящих в состав плазматических мембран такими криопротекторами, как глицерин, ДМСО, ПЭГ-1500.

Экспериментально была показана возможность обратимого воздействия криопротекторов на некоторые функциональные параметры биосистем. Так, например, при изучении влияния криопротекторов на дыхательную цепь митохондрий установлено, что при концентрации глицерина выше 75% (9.72М) резко замедляется восстановление цитохрома С, однако после отмывки все параметры полностью приходят в норму. Глицерин не оказывает влияния на скорость восстановления цитохромов

(C+C₁) и цитохрома *a*. Наряду с этим в присутствии глицерина, этиленгликоля, ДМСО, диметилформамида наблюдается подавление активности НАД-Н₂-оксидазы. Имеются также данные о том, что при добавлении в среду инкубации ДМСО происходит ингибирование активности цитохрома Р-450, а глицерин и 1,2-пропиленгликоль, напротив, вызывают увеличение активности фермента.

На изолированном липопротеиновом комплексе цитохромоксидазы показано, что экспозиция фермента в растворах этиленгликоля, диэтиленгликоля, ПЭГ-400, глицерина, 1,2-пропандиола и сахарозы приводила к снижению активности фермента. При этом константа Михаэлиса реакции не изменяется, а уменьшается максимальная молекулярная активность, всвязи с чем предполагают, что снижение активности обусловлено изменением свойств среды, в частности, вязкости, а не изменением структуры цитохромоксидазы или ее субстрата. В частности, было показано, что глицерин и этиленгликоль при использовании их в концентрациях до 40% (4.77М), не вызывают конформационных изменений этого фермента.

В значительной степени могут повышать вязкость микроокружения биомакромолекул полимерные криопротекторы типа ПВП, ПЭГ и декстраны, входя в их первую координационную сферу и образуя связи с находящимися там молекулами. Однако взаимодействие криопротекторов с биополимерами может носить, как уже отмечалось, вполне обратимый характер, поскольку после удаления криопротекторов структура и функция биополимеров восстанавливаются. В развитии и проявлении «псевдотоксического эффекта» важную роль играют природа криопротектора, его концентрация, время экспозиции с биообъектом и температура. Вероятность разрушения биообъекта увеличивается с повышением температуры и концентрации криопротекторов.

Исходя из сказанного, при выборе криопротекторов для сохранения биообъектов при низкотемпературном воздействии, к ним обычно предъявляются следующие общие требования: они должны быть нетоксичными, хорошо растворяться в воде и растворах электролитов, снижать количество вымораживаемой в виде чистого льда воды, образовывать подвижные координационные соединения с «биометаллами». При этом они должны поддерживать в растворенном состоянии соли и белки вплоть до эвтектического перехода в аморфное состояние.

Часто, однако, из-за своей токсичности многие вещества, обладающие этими свойствами, и в особенности низкой эвтектической температурой, не могут быть использованы в реальных условиях. Метанол и этанол, например, не могут быть использованы в качестве криопротекторов, так как они оказывают денатурирующее действие на биологические объекты еще в довольно малых концентрациях, хотя известно, что водные растворы этих соединений имеют наиболее низкие эвтектические температуры. Диметилформамид с эвтектической температурой минус 100°C обладает также достаточно выраженной токсичностью.

Таким образом, изменение состава криопротекторов в среде замораживания может существенно сказываться на структурном состоянии и функциональных характеристиках белков и белок-липидных комплексов.

7.8. Действие замораживания на генетический материал

Так как после замораживания-отогрева клетки сохраняют способность к делению и синтезу белков, значит, сохраняются ключевые молекулярно-генетические процессы: репликация, транскрипция и трансляция. Это, в свою очередь, свидетельствует, что существенных изменений в структуре и свойствах ДНК, РНК, рибосом и ферментов указанных процессов не происходит, несмотря на кристаллизацию, дегидратацию, изменение тоничности среды и pH.

Даже очищенная от структурных белков и ферментов двойная спираль ДНК не повреждается замораживанием и последующим отогревом – ее физико-химические свойства сохраняются.

Уровень синтеза РНК после быстрого или медленного замораживания до минус 196°C практически не изменяется, т.е. матричная активность ДНК, а также такие ее показатели, как молекулярная масса, коэффициент молярной экстинкции и гиперхромизма, после замораживания остаются постоянными. Однако ферменты, участвующие в синтезе РНК, под влиянием низких температур могут терять свою активность. Если заморозить изолированный из печени крыс хроматин до минус 25°C со скоростью ~0,5–1,5 град/мин, то это приведет к уменьшению его матричной активности на 50% в системе синтеза РНК, осуществляемого за счет эндогенной РНК-полимеразы. Это связано с тем, что нарушается взаимодействие нуклеопротеидной фракции ДНК с белками, которые подвергаются криоденатурации и агрегации, что сильно изменяет процесс транспорта РНК-полимеразы по матрице и посадку гистонов на генетические локусы после отогрева системы.

При гипотермии изолированный из клеток или тканей комплекс ДНК, хранимый при температуре 0–4°C на протяжении одного-двух месяцев, практически не меняется. Однако ДНК в составе клеток или органов изменяет свои физико-химические свойства уже через 72 часа после хранения при температуре 0°C. Растворимые нуклеогистоны в чистом виде не изменяют свои свойства на протяжении двух недель после хранения при 4°C.

Хроматин в составе клеток после замораживания тканей может изменять свои свойства. Замораживание изолированного хроматина до минус 10°C сопровождается формированием осадка и повышением вязкости его раствора, снижением молекулярной массы на 30% по сравнению с первоначальной.

Низкотемпературная консервация лимфоцитов или гепатоцитов сопровождается снижением уровня синтеза ДНК и РНК на 60–70%, несмотря на использование эффективных концентраций криопротекторов. Причины подавления синтеза ДНК и РНК в ядре клеток после замораживания–

отогрева весьма разнообразны. В частности, это может зависеть от степени разрушения ядерной мембраны и структурных белков, регулирующих механическую прочность ядра, от уровня повреждения и инактивации ферментных и ядрышковых белков.

Регуляторные системы ядра, включающие ферменты, ядерные белки, являются весьма чувствительными к действию таких факторов замораживания, как процессы дегидратации, гипертония и изменение pH. При медленном замораживании (1–2 град/мин) ядрышковой формы РНК-полимеразы I ее активность существенно снижается, однако быстрые скорости охлаждения (300–400 град/мин) не вызывают изменения активности этого фермента. Активность РНК-полимераз резко снижается при температуре минус 25°C, что примерно соответствует эвтектическому диапазону температур NaCl.

Таким образом, многие крупные биологические молекулы могут повреждаться после криоконсервации биологических объектов. Повреждения структурных белков, например, актина, влечет за собой изменения в структуре, форме и объеме клеток, повреждения функциональных белков, например, миозина, приводит к нарушению двигательной активности, а нарушение ферментов модифицирует многочисленные метаболические процессы катализа, что приводит к нарушению образования энергии, нарушению синтеза десятков разнообразных молекул и нарушению разнообразных функций. Изменения структуры макромолекулярных комплексов, например, рибосом, нарушает синтез регуляторных пептидов, а также структурных и функциональных белков, что также приводит к сбою многих клеточных свойств и функций органов и тканей.

Замораживание и последующий отогрев ДНК млекопитающих не приводит к достоверным изменениям ее физико-химических показателей, а также матричной активности в РНК-полимеразной системе. Однако медленное замораживание РНК-полимеразы вызывает ингибирование ядрышковой формы фермента в результате нарушения его физико-химических свойств. Наиболее значимые изменения выявлены в зоне эвтектических температур. Такое ингибирование приводит к нарушению процесса формирования комплекса РНК-полимераза–ДНК и, соответственно, транскрипции после медленного замораживания, что проявляется, например, в уменьшении включения ^3H –УТФ в синтезируемую РНК. Замораживание и хранение ферментативных препаратов в смеси глицерин–ДМСО при этом, позволяет в значительной мере сохранить функциональные свойства РНК-полимераз. Инкубация клеток (асцитной карциномы Эрлиха, тканевых лимфоцитов, печени) в криозащитных средах, содержащих традиционные криопротекторы, приводит к обратимому ингибированию клеточного метаболизма – снижению уровня биосинтеза белков и ДНК. Указанные изменения проявляются в большей мере в криозащитных средах, содержащих непроницающие криопротекторы.

Нарушения нуклеиновых кислот в криоконсервированных половых клетках встречаются довольно редко, но это несет потенциальную угрозу

нарушения генетических программ оплодотворения и развития, что представляет серьёзную опасность потомству при использовании современных технологий воспроизводства.

Сперматозоиды человека относят к одним из наиболее криоустойчивых клеток, но из-за высокой вариабельности качества спермы после размораживания сохраняется до 50% клеток. На примере же половых продуктов рыб установлено, что как замораживание-отогрев, так и криопротекторы, такие как ДМСО и глицерин в концентрациях 0,6 – 2,5 М, могут повреждать геном сперматозоидов. Считают также, что возможна частичная репарация таких повреждений, зависящая от потенций яйцеклеток самок.

Многими бактериями низкие и даже сверхнизкие температуры переносятся достаточно хорошо. На этой способности, по существу, основаны методы их длительного хранения. Устойчивость к холоду обычно обеспечивается обезвоживанием, повышением вязкости цитоплазмы, а также наличием оболочки, препятствующей проникновению кристаллов льда в клетку. Некоторые бактерии, которые удалось выделить из арктических и антарктических мерзлых пород, находившихся в замороженном состоянии в течение нескольких миллионов лет, при повышении температур до положительных значений были способны к росту, что подтверждает сохранность их генетического материала. Считают, что если генетическая информация бактерий и повреждается частично в этих условиях, она может быть затем восстановлена с помощью специальных клеточных механизмов: подобные недавно были обнаружены в бактериальных спорах. Однако при искусственном замораживании микроорганизмов не всегда удается получить высокую жизнеспособность после отогрева. Так, выявлено, что в результате процессов замораживания-отогрева наблюдается уменьшение числа жизнеспособных клеток дрожжей на 26 %.

Рекомендуемая литература:

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – К.: Наук. Думка.– 1982. – 255 с.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – К.: Наук. думка.– 1994. – 432 с.
3. Волькенштейн М.В. Биофизика. – М.: Наука.– 1981. – 256 с.
4. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наук. думка.– 1994. – 145 с.
5. Дузу П. Криобиохимия. – М.: Мир.– 1980. – 282 с.
6. Жмакин А.И. Физические основы криобиологии // Успехи физических наук. – 2008. – Т. 178, №3. – С. 243–266.

7. Nardid O.A., Dyubko T.S., Repina S.V. A comparative study of the effect of freeze-thawing on peripheral and integral membrane proteins // Cryobiology. – 1997. – Vol. 34. – P. 107–113.
8. Nardid O.A., Pogozhykh D.N., Repina S.V. et al. Influence of low temperature storage on the properties of human placenta // Journal Experimental Integrative Medicine. – 2012. – Vol. 2, №3. – P. 213–217.

Глава 8. Криповреждения клеток

8.1. Структурно-функциональная организация клеток и действие низких температур. 8.1.1. Организация клеток. 8.1.2. Эффекты замораживания. 8.1.3. Роль скорости замораживания. 8.1.4. Основные места криповреждений. 8.1.4.1. Биологические мембраны. 8.1.4.2. Криповреждения биологических мембран. 8.1.5. Цитоплазма. 8.1.5.1. Криповреждения цитоплазмы после замораживания-отогрева. 8.1.6. Ядро. 8.1.6.1. Криповреждения ядра. 8.1.7. Митохондрии. 8.1.7.1. Криповреждения митохондрий, которые проявляются после отогрева. 8.1.8. Лизосомы. 8.1.8.1. Криповреждения лизосом. 8.1.9. Рибосомы. 8.1.9.1. Криповреждения рибосом и синтеза белков. 8.1.10. Аппарат Гольджи. 8.1.10.1. Криповреждения АГ. 8.1.11. Эндоплазматический ретикулум. 8.1.11.1. Криповреждения ЭПС.

8.1. Структурно-функциональная организация клеток и действие низких температур

Известно, что после глубокого замораживания и последующего отогрева подавляющее большинство биологических объектов не выживает. В первую очередь повреждаются элементы, из которых состоят все живые тела, – клетки. Клетки имеют очень сложное строение: биомембраны, органеллы, хромосомы, макромолекулы, ферменты и пр., поэтому цитологические нарушения имеют многокомпонентный комплексный характер.

8.1.1. Организация клеток

Клетки животных и их органеллы имеют принципиально одинаковое строение (Рис. 8.1) и выполняют сходные функции у всех видов организмов, несмотря на уровень их развития.

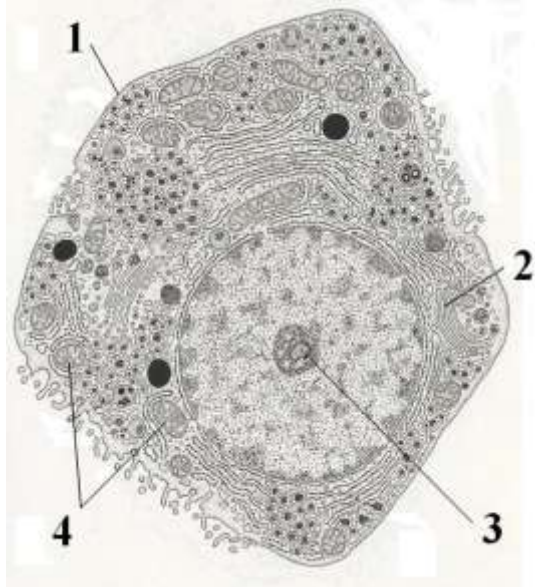


Рис. 8.1. Схема принципиального строения и организации клеток животных на примере гепатоцита. Клетка является автономным сложноустроенным гетерогенным жидким живым телом. Внешняя мембрана отделяет содержимое от наружной среды. Система внутренних мембран расчленяет внутреннее содержимое на множество полуавтономных частей. 1 - цитоплазматическая мембрана, 2 – цитоплазма, 3 – ядро, 4 – клеточные органеллы.

Клетка – это живое автономное физическое тело. Это покрытое мембраной жидкое микроскопическое образование. Его внутреннее

содержимое представляет собой вязкий коллоидный раствор, состоящий главным образом из 70% воды и 20% глобулярных и фибриллярных белков. Остальные 10% внутреннего состава клеток представлены молекулами углеводов, липидов, немного нуклеиновыми кислотами, а также диссоциированными неорганическими и органическими солями. Этот цитоплазматический коллоид разделен мембранами на изолированные, но взаимодействующие отсеки, где протекают специфические биохимические реакции. Расположение отсеков, органелл и макромолекул упорядоченно, хотя они сохраняют относительную динамичность. Практически вся вода в клетке находится в связанном с множеством молекул, или упорядоченном вокруг различных структур состоянии. Но это не мешает постоянному тепловому движению молекул воды и метаболитов, а также диффузии, осмосу и катализу. Организующие свойства клеточного коллоида настолько сильны, что не позволяют какое-то время растекаться клеточному содержимому даже при повреждениях цитоплазматической мембраны.

8.1.2. Эффекты замораживания

При замораживании биообъектов происходит затвердевание всей воды как снаружи, так и внутри клеток. Это является основной причиной последующих криоповреждений любых биологических объектов и их внутренних структур. Вода кристаллизуется, клетки подвергаются механическому воздействию кристаллами льда, их содержимое обезвоживается, нарушается структура и расположение макромолекул, прекращается броуновское движение и диффузия молекул, останавливаются биохимические процессы и метаболизм. Коллоидное содержимое клеток затвердевает и теряет все свои свойства и функции. Прекращаются всякие проявления жизни.

Но нарушения структуры и функций клеток в замороженном состоянии не проявляются, так как они переходят в состояние анабиоза. В таком состоянии клетки и их содержимое без изменений могут находиться довольно длительное время, так как в их твёрдом теле практически прекращаются спонтанные процессы разрушения, характерные для физиологических температур. Последствия действия факторов замораживания проявляются только на этапе отогрева и после возвращения биообъектов в температурную зону жидкой воды. Следствия замораживания могут быть настолько серьёзными, что далеко не все отогреваемые объекты возвращаются к жизни.

Особенности выживаемости и криоповреждений клеток и тканей животных связаны с несколькими условиями: а) разновидностью клеток, б) сложностью их строения, в) размерами, г) нахождением клеток в составе ткани или в суспензии, д) наличием криопротекторов, е) скоростью замораживания, размораживания и др.

8.1.3. Роль скорости замораживания

Скорости замораживания имеют большое значение для успешного

криоконсервирования различных биообъектов (см. главу 6). В частности, при медленном замораживании до минус 196°C вода кристаллизуется сначала во внешней среде, затем внутри клеток, далее внутри органелл, а при быстром замораживании до тех же температур происходит практически одновременное затвердевание воды во всех компартментах клеток. При медленном замораживании происходит дегидратация клеток за счет опережающего роста кристаллов снаружи и вытягивания ими воды из клеток, а при быстром замораживании дегидратации клеток не происходит. При медленном замораживании и постепенном росте внеклеточного льда образуются «канальцы» малых объемов жидкой фазы, куда вытесняются соли, метаболиты и клетки из суспензии, а при быстром замораживании канальцы не формируются, клетки просто вмерзают в лед (см. главу 5).

Однако несмотря на некоторую разницу эффектов во время замораживания при различных скоростях, картина криоповреждений после размораживания создаётся примерно одинаковая. Это связано с тем, что основные повреждающие клетки процессы развиваются и проявляются именно на этапе отогрева биологических объектов: рекристаллизация, механические повреждения, изменения pH, электростатические эффекты, денатурация макромолекул, повреждения мембран, набухание клеток и др.

8.1.4. Основные места криоповреждений

Во время замораживания-отогрева биологических объектов *без криопротекторов* повреждаются, в большей или меньшей степени, практически все компартменты и структуры клеток. Но наиболее уязвимыми являются следующие структуры и органеллы: мембраны, цитоплазма, ядро, митохондрии, лизосомы, аппарат Гольджи и эндоплазматическая сеть. Рассмотрим некоторые основные места повреждений клеток животных при замораживании-отогреве.

8.1.4.1. Биологические мембраны

Биомембраны являются одним из основных элементов клеточной организации, основой структуры и функций всех органов и тканей. Большинство клеточных органелл имеют в основе строения и функций мембранные структуры. Они характерны для эндоплазматической сети, пластинчатого комплекса Гольджи, оболочек и крист митохондрий, лизосом, вакуолей, пластид, ядерной оболочки и наружной клеточной мембраны. Мембраны – сложные молекулярные системы, высокоупорядоченные, ответственные за структурную организацию и процессы жизнедеятельности клеток. Например, это разделение содержимого клетки на специализированные замкнутые отсеки – *компартменты*, благодаря чему в клетке одновременно могут протекать различные, даже разнонаправленные, процессы. Мембранами осуществляется регуляция метаболических путей клетки, поддержание необходимой концентрации веществ (ионов, метаболитов) путем их избирательного перемещения, создание разности электрических потенциалов, участие в ферментативных процессах и др.

Мембраны являются основой для точного размещения ферментов, что обуславливает строгую последовательность биохимических реакций. Например, в шероховатой эндоплазматической сети происходит синтез и модификация белков, в гладкой – жирных кислот; в матриксе митохондрий осуществляется окисление органических веществ, а на внутренних мембранах – синтез АТФ.

У разных организмов мембраны могут иметь различный белковый и липидный состав, отличаться деталями строения. Аналогично, биомембраны разных органелл имеют свои особенности строения. Но принцип организации всех разновидностей мембран у разных животных, растений, грибов, простейших и бактерий один и тот же. Согласно *жидкостно-мозаичной модели* строения, клеточные мембраны – это избирательно проницаемый липидный бислой со встроенными в него белками (Рис. 8.2)

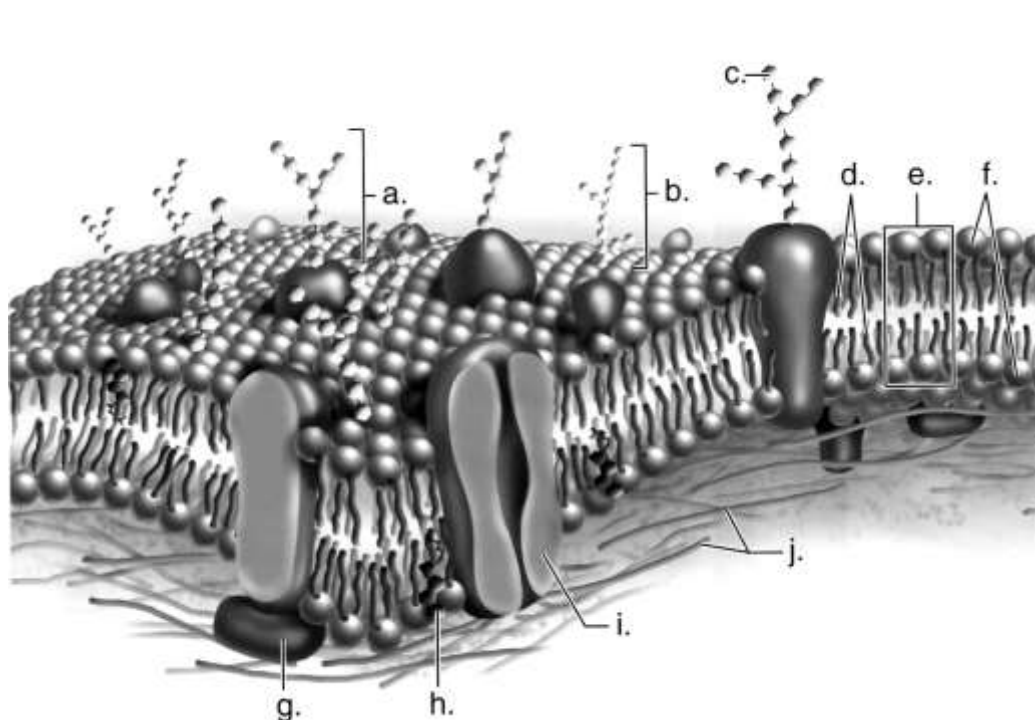


Рис. 8.2. Жидкостно-мозаичная модель биологической мембраны. (Э. Рис, М. Стернберг, 2002). *a, b – олигосахариды, образующие гликокаликс; c – моносахарид; d – гидрофобные хвосты фосфолипидов; e – фосфолипидный бислой; f – гидрофильные головки фосфолипидов; g – субмембранный белок; h – стероид; i – трансмембранный белок-канал; j – субмембранные белковые фибриллы (спектриновая сеть)*

Неодинаковый липидный и белковый состав мембран разных органелл обеспечивает их разнообразные функции. Каждая разновидность мембран содержит около 50% белков. Мембраны имеют также определенный процент углеводов. Например, мембрана эритроцитов содержит ~40 % липидов, 52% белков и 8% углеводов. Белки не образуют слои, а расположены в виде мозаики из глобул; при этом одни из них находятся только на поверхности, другие погружены в липидную фазу частично или полностью, иногда

пронизывая ее насквозь. Липидный бислой представляет собой жидкость, в которой отдельные молекулы липидов способны диффундировать в пределах своего монослоя, а также могут иногда перемещаться из одного монослоя в другой. Вязкость и подвижность липидного бислоя зависят от его состава и температуры.

Цитоплазматическая мембрана. Все без исключения клетки, а также некоторые вирусы окружены мембраной. Цитоплазматическая мембрана (плазмалемма) снаружи покрывает клетки и является важнейшей в системе биомембран, необходимым условием существования любой клетки. Цитоплазматическая мембрана имеет один и тот же принцип строения, как и другие биомембраны. Однако ее строение более сложное, т. к. она является полифункциональной системой и выполняет больше общих, важных для всей клетки, функций. В состав цитоплазматических мембран, кроме липидов и белков, входят также молекулы гликолипидов и гликопротеидов с разветвленными углеводными цепями. Эти разветвленные цепи на поверхности клетки переплетаются друг с другом, образуя как бы каркас с вплетенными в него молекулами белков (гликокаликс), состоящий из олигосахаридов, ковалентно связанных с гликопротеинами и гликолипидами плазмалеммы. Функциями гликокаликса являются: а) межклеточное узнавание, б) межклеточное взаимодействие, в) объединение и цементирование клеток между собой в тканях, г) пристеночное пищеварение.

С внутренней стороны клетки белки и гликопротеины связаны с микротрубочками и белковыми нитями, составляющими элементы цитоскелета. Часто плазматическая мембрана образует множество *микроворсинок*. Это значительно увеличивает поверхность клеток, облегчая перенос веществ через наружную мембрану и их прикрепление к поверхности субстрата.

Цитоплазматическая мембрана выполняет ряд важных функций: отделяет клетку от внешней среды, сохраняет и поддерживает ее внутреннее содержимое, избирательно переносит различные вещества, обеспечивает связь с внешней средой, участвует в ферментативных процессах.

8.1.4.2. Криповреждения биологических мембран

- В результате вымораживания воды ослабляются или даже исчезают гидрофобные и полярные взаимодействия между липидными и белковыми молекулами мембран, что приводит к их разрыхлению и расслоению. Расслоение совершается вдоль всей внутренней гидрофобной зоны мембран.
- Вследствие механического воздействия кристаллов льда повреждается структура и организация мембран, образуются разрывы и сквозные дыры.
- Из-за обезвоживания клеток, уменьшения их объема и сморщивания, нарушается топография распределения молекул белков и липидов, а также специальное функциональное распределение молекул в биологических мембранах.

- Мембрана теряет некоторое количество молекул белков и липидов в результате вымораживания.

Перечисленные структурные патологии приводят к функциональным нарушениям мембран и клетки в целом.

- Нарушается целостность клетки. Она перестает контролировать поступление и выход воды, ионов и других веществ. Клетка набухает.
- Расстраивается как пассивный, так и активный транспорт. Нарушается внутренний структурно-функциональный гомеостаз клеток.
- Расстраиваются процессы метаболизма и их координация из-за нарушения компартментализации клеток.
- Сокращается выработка энергии на мембранах митохондрий.
- Нарушается синтез белков рибосомами на мембранах эндоплазматической сети.
- Теряется или изменяется активность многих мембранно-связанных ферментов.

Все отмеченные структурно-функциональные нарушения биомембран проявляются только после размораживания биологических объектов, в зоне положительных температур и возобновления клеточной активности.

Клетка обладает способностью восстанавливать некоторые нарушения, что обеспечивает ее частичную или даже полную реабилитацию через определенный промежуток времени.

8.1.5. Цитоплазма

Цитоплазма является важнейшим компонентом всех клеток. Она выполняет множество клеточных функций, из которых можно выделить: а) контроль и обеспечение превращений материи и энергии (метаболизм), б) обеспечение разнообразных функций, в) взаимодействие и поддержание функций генома и поверхностного аппарата.

Цитоплазма эукариот составляет основную массу клетки – это все ее внутреннее содержимое, за исключением ядра. Содержит 75-85% воды, 10-20% белков и много других веществ в относительно небольших количествах. При изучении клеток с помощью светового микроскопа цитоплазма представляется гомогенной, бесцветной, прозрачной, вязкой жидкостью. Однако электронный микроскоп позволил увидеть сложную многокомпонентную, полифункциональную, высокоупорядоченную структуру цитоплазмы.

Цитоплазма состоит из цитозоля (цитоплазматического коллоидного матрикса), клеточных органелл и включений.

Цитозоль представляет собой часть цитоплазмы (~55% общего объема клеток), не содержащую органелл. Это структурированный *коллоид*, состоящий из сложной смеси растворенных в воде органических макромолекул – белков, жиров, углеводов, малых органических молекул

(аминокислоты, глюкоза, нуклеотиды, жирные кислоты и т. д.), а также неорганических веществ. Содержит тысячи различных видов белков, главным образом, ферментов.

Клеточные органеллы – это дифференцированные участки цитоплазмы эукариотических клеток, имеющие специфическое строение и молекулярный состав. Это сложные, высокоупорядоченные биологические системы макромолекул, образующие определенную пространственную структуру, способную к выполнению специальных клеточных функций. Клетки животных содержат много внутриклеточных мембран, поэтому почти половина всего коллоидного объема клеток заключена в отдельные внутриклеточные отсеки, которые мы называем «органеллами». Остальное внутриклеточное пространство занято цитозолем, который является важнейшим компартментом клетки.

Клеточные органеллы условно разделяют на *мембранные*, которые окружены типичной биомембраной, и *немембранные*, не имеющие такой оболочки.

8.1.5.1. Криповреждения цитоплазмы после замораживания-отогрева

- В связи с вымораживанием внутренней воды и кристаллизации нарушаются многие свойства и функции цитоплазмы. В первую очередь – ее коллоидно-осмотические характеристики. Цитоплазма теряет свою монолитность и способность связывать и сохранять свое содержимое.
- Нарушается компартментализация клеток и связь между органеллами.
- Изменяются структура и функции практически всех органелл.
- Повреждается система цитоскелета, поддерживающего форму и объём клеток.
- Многие структурные белки и ферменты меняют свою третичную и четвертичную структуру.

Повреждения цитозоля и органелл приводят ко многим функциональным нарушениям.

- В первую очередь страдает взаимосвязь, координация и монолитность процессов метаболизма, так как хуже контролируются потоки веществ и энергии в цитоплазме.
- Ограничивается количество возможных ферментативных реакций и связь между частями клеток.
- Мембранные органеллы хуже выполняют свои специальные функции.
- Изменяется форма клеток и их объём.
- Уменьшается выработка энергии.
- Снижается скорость и качество синтезируемых белков и других веществ.

8.1.6. Ядро

Ядро (Рис.8.3) представляет собой сферическое тело, окруженное оболочкой. Основные функции ядра: хранение генетической информации, репликация ДНК и последующее размножение клеток, транскрипция ДНК, образование РНК, рибосом и последующий контроль синтеза белков и других метаболитов, управление метаболизмом и функциями. Диаметр ядра клеток животных составляют в среднем 2-6 мкм и зависят от типа клеток и их активности. Объем ядра занимает обычно около 10-50% объема клетки. Ядерная оболочка является производным эндоплазматической сети, однако её конфигурация такова, что ядро оказывается покрыто двумя слоями мембран. Нуклеолема (оболочка ядра) пронизана *ядерными порами*. Они представляют собой сложные макромолекулярные комплексы, пронизывающие обе мембраны, основная функция которых – обеспечивать вынос из ядра формирующихся в нем рибосом и молекул РНК, а также поступление в ядро белков, АТФ и других субстратов для синтеза НК и ферментов.

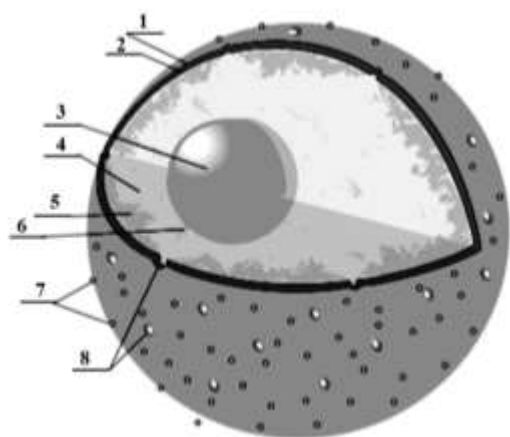


Рис. 8.3. Схема структурной организации ядра. 1 – внешняя мембрана; 2 – внутренняя мембрана; 3 – ядрышко; 4 – кариоплазма; 5 – гетерохроматин; 6 – эухроматин; 7 – рибосомы; 8 – ядерные поры.

Под ядерной оболочкой располагается тонкий слой фибриллярных белков, ответственных за поддержание формы ядра. Этот слой называется *ядерной пластинкой*.

В полости ядра находится жидкая внутренняя среда, называемая *нуклеоплазмой* (*кариоплазмой*). По своим физическим свойствам она жидкая и близка по структуре к коллоидной цитоплазме. В ее составе также присутствуют белковые нити, образующие *ядерный скелет* – внутриядерный аналог цитоскелета. В ядре расположен *хроматин* – совокупность молекул ДНК и сопровождающих их белков. Производным хроматина также является *ядрышко*.

Важнейшими молекулярно-генетическими процессами, протекающими в ядре, являются: репликация ДНК, транскрипция и образование всех видов РНК, процессинг РНК, образование рибосом.

8.1.6.1. Криповреждения ядра

Замораживание-отогрев эукариотических клеток приводит к повреждению ядер и их содержимого. Основным повреждающим фактором является вымораживание воды, образование кристаллов и дегидратация. В замороженном состоянии клетки впадают в анабиоз и никакие нарушения не проявляются. Только на этапе отогрева и после полного размораживания клеток проявляется весь комплекс структурно-функциональных нарушений.

- Повреждается двойная мембранная оболочка ядра и её поры, соединяющие с цитоплазмой, вследствие чего нарушается внутренний состав кариоплазмы ядра. Может изменяться транспорт белков в ядро, РНК и субъединиц рибосом в цитоплазму.
- Повреждения хроматина могут быть связаны с механическими разрывами молекул ДНК и вымораживанием гистоновых белков. Теломерные и центромерные участки хромосом могут отрываться от внутренней оболочки ядра.
- Во время деления клеток кристаллами льда могут повреждаться хромосомы и веретено деления, особенно на стадии метафазы и анафазы. Довольно уязвимыми являются центриоли и микротрубочки. Кинетохорные и полюсные микротрубочки могут «рассыпаться» под действием дегидратации и механического воздействия.
- Затвердевание кариоплазмы может приводить к повреждениям третичной и четвертичной структуры многих ферментов транскрипции, процессинга и репликации.
- Молекулы ДНК также могут получать грубые разрывы в результате затвердевания, механических воздействий и смещений кристаллов льда.

Вследствие повреждения структур ядра могут нарушаться важнейшие процессы: репликация, транскрипция, процессинг и другие. Это, в свою очередь, приводит к нарушению воспроизводства и развития. Повреждения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) и нарушения ферментов репарации могут приводить также к устойчивым мутациям и нарушениям развития.

8.1.7. Митохондрии

Митохондрии – двумембранные органеллы, основная функция которых – *аэробное дыхание*. В присутствии кислорода они превращают продукты расщепления органических веществ в CO_2 и H_2O , при этом *выделяется энергия, накапливающаяся в форме АТФ*. То есть митохондрии преобразуют энергию химических связей органических веществ в энергию фосфатных связей молекулы АТФ, которую клетке удобно использовать для всех видов деятельности. Митохондрии – довольно крупные овальные органеллы (0,2-2,0 мкм). Они встречаются почти во всех эукариотических клетках, за исключением анаэробных простейших и эритроцитов. Митохондрии хаотично распределены по цитоплазме, хотя чаще

обнаруживаются около ядра или в местах с высокими потребностями энергии. Органеллы могут менять свою структуру и форму, способны перемещаться внутри клетки. Количество митохондрий может изменяться, в зависимости от активности клетки, от нескольких десятков до нескольких тысяч. Структура митохондрий может несколько отличаться в различных типах клеток и разных тканях. Однако все митохондрии имеют принципиально одинаковое строение (Рис.8.4).

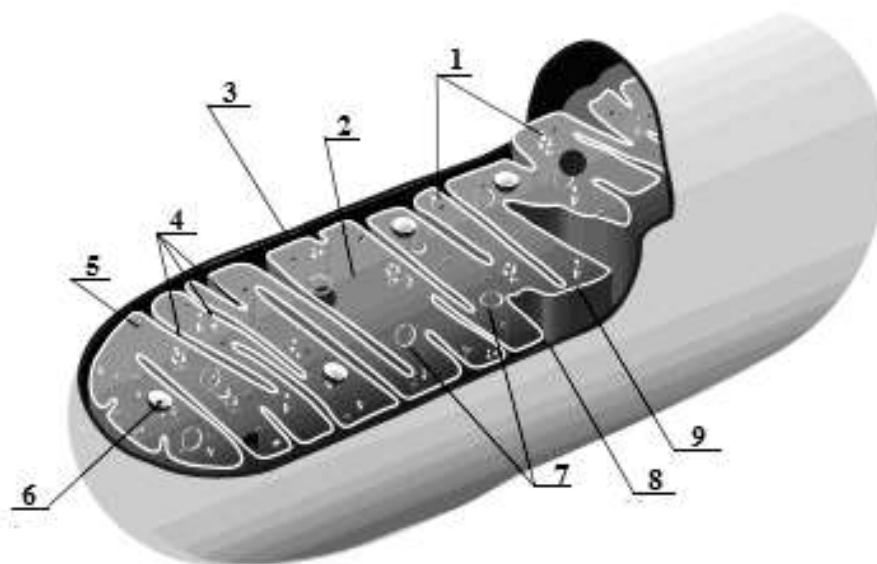


Рис. 8.4. Схема строения митохондрии. Органелла содержит наружную и внутреннюю мембраны с узким межмембранным пространством. Внутри мембрана образует многочисленные выросты – кристы, погруженные в матрикс. В матриксе находится многочисленные ферменты, рибосомы, молекулы ДНК. 1 – молекулы АТФ-синтетазы; 2 – матрикс; 3 – межмембранное пространство; 4 – кристы; 5 – рибосомы; 6 – гранулы; 7 – ДНК; 8 – наружная мембрана; 9 – внутренняя мембрана.

8.1.7.1. Криповреждения митохондрий

- Наиболее уязвимыми являются мембраны митохондрий. Они могут довольно легко повреждаться кристаллами льда, а вымораживание жидкой воды приводит к уменьшению объёма, повреждению структуры и изменению формы.
- Вследствие повреждения мембран происходит нарушение избирательного транспорта веществ, компартментализации и внутреннего гомеостаза митохондрий.
- В частности, внутрь митохондрий бесконтрольно поступает вода, ионы и метаболиты. Они набухают, кристы фрагментируются, а матрикс разжижается.
- Из органелл во внешнюю среду свободно выходят АДФ, Ф, H^+ , ферменты и другие вещества, необходимые для образования АТФ.

- Нарушается управляемый транспорт ионов водорода (H^+) через внутреннюю мембрану и электронов по дыхательной цепи митохондрий.
- Понижается электрохимический потенциал H^+ на внутренней мембране. После этого снижается эффективность работы АТФ-синтетазы, для которой ионы водорода являются источником энергии для синтеза АТФ.
- Нарушается основная функция митохондрий – образование макроэргических связей АТФ.

8.1.8. Лизосомы

Лизосомы - это небольшие (0,2-0,8 мкм), покрытые мембраной округлые тельца, основной функцией которых является внутриклеточное пищеварение. Встречаются во всех клетках животных и растений. Могут находиться в любом месте клетки. Содержимое лизосом составляют различные классы гидролитических ферментов. Всего насчитывается до 40 различных групп ферментов. Например, различные протеазы, нуклеазы, липазы, фосфолипазы и др. (таблица 8.1).

Таблица 8.1. Основные группы ферментов лизосом

Группа ферментов	Субстрат (на что действует)	Продукт (что образуется)
1.Протеазы	Белки	Аминокислоты
2.Липазы	Липиды	Фрагменты липидов
3.Нуклеазы	Полинуклеотиды (РНК, ДНК)	Азотистые основания +фосфат + пентоза
4.Гликозидазы	Полисахариды	Моносахариды
3.Фосфатазы	Фосфоэфирная связь	Монофосфаты

Эти ферменты разрушают крупные молекулы сложных органических соединений, поступающих в клетку (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды). Ферменты лизосом подвергают разрушению захваченные микроорганизмы и вирусы. Лизосомы уничтожают отслужившие структуры клетки, а также погибшие клетки. Эти процессы называются аутофагией. Каждая лизосома покрыта плотной мембраной, изолирующей содержащиеся в ней ферменты от остальной цитоплазмы. Повреждение мембран лизосом и выход из них в цитоплазму ферментов приводит к быстрому растворению (лизису) всей клетки.

8.1.8.1. Криповреждения лизосом

- Мембрана лизосом является основным местом криповреждений. Кристаллы льда, механические деформации и обезвоживание нарушают её барьерную функцию.
- Это ведет к выбросу агрессивных ферментов лизосом в цитоплазму.
- Гидролитические ферменты разрушают практически все органеллы и внутреннее содержимое клеток, что приводит к её гибели.

8.1.9. Рибосомы

Рибосомы — небольшие гранулоподобные сферические тельца, имеющие размеры от 15 до 35 нм, основной функций которых является *синтез разнообразных белков*. В период функционирования состоят из двух субъединиц. Рибосомы расположены в цитозоле или связаны с мембранами эндоплазматической сети.

Субъединицы рибосом образуются в ядрышке, а затем через ядерные поры по отдельности поступают в цитоплазму. Их количество в цитоплазме зависит от синтетической активности клетки и может составлять от сотни до нескольких тысяч на одну клетку. Наибольшее количество рибосом обнаружено в клетках, интенсивно синтезирующих протеины. Встречаются также в митохондриальном матриксе и хлоропластах.

Рибосомы любых организмов — от бактерий до млекопитающих — характеризуются сходством структуры и состава, хотя клетки прокариот имеют рибосомы меньших размеров и в меньшем количестве (рис.8.5). Каждая состоит из нескольких разновидностей молекул рРНК и десятков разновидностей белков примерно в одинаковой пропорции. Маленькая и большая субъединицы находятся в цитоплазме по отдельности, пока не вовлечены в белковый синтез. Они объединяются друг с другом молекулой мРНК при необходимости синтеза и вновь разъединяются с прекращением процесса.



Рис.8.5. Субъединицы прокариотических (а) и эукариотических (б) рибосом

Молекулы мРНК, синтезированные в ядре, поступают в цитоплазму к рибосомам. Из цитозоля молекулами тРНК к рибосомам доставляются аминокислоты, где с участием ферментов и АТФ синтезируются белки. Если с одной молекулой мРНК соединяются несколько рибосом, то образуются *полисомы*, которые содержат от 5 до 70 рибосом.

8.1.9.1. Криповреждения рибосом и синтеза белков

- После вымораживания воды ослабевают водородные связи, гидрофобные и гидрофильные взаимодействия. Это обуславливает ослабление связей между субъединицами рибосом, информационной и транспортными РНК, что приводит к разрушению белоксинтезирующего комплекса или нарушению его функционирования.
- Разрушаются полисомы.
- Нарушается синтез необходимых клетке структурных и функциональных белков.
- Дефицит белков приводит к разносторонним повреждениям метаболизма и структуры клеток.

8.1.10. Аппарат Гольджи

Аппарат Гольджи (АГ) образован комплексом из десятков уплощенных дисковидных мембранных цистерн, мешочков, трубочек и везикул (Рис.8.6). В значительном количестве встречается в секреторных клетках. Внутреннее межмембранное пространство заполнено матриксом, содержащим специальные ферменты.

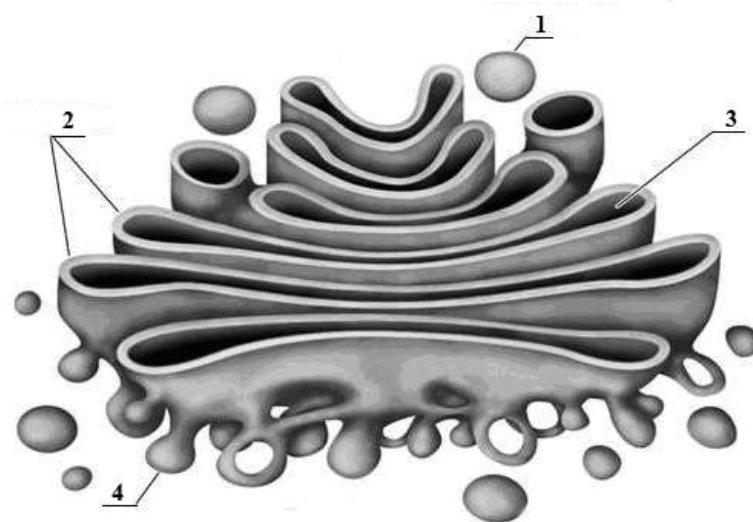


Рис. 8.6. Схема организации аппарата Гольджи. Это система из сложенных в стопку мембранных уплощенных цистерн, участвующих в модификации, сортировке и упаковке макромолекул в везикулы для секреции или использования их в других компартментах. 1 – везикула; 2 – цистерны; 3 – люмен; 4 – образование везикул.

Аппарат Гольджи имеет две зоны: *зону формирования*, куда поступает синтезируемый материал из эндоплазматической сети (ЭПС) с помощью транспортных везикул, и *зону созревания*, где формируется секрет и зрелые секреторные мешочки.

В зону формирования поступают синтезированные в ЭПС вещества, заключенные в мембранные везикулы. Они сливаются с мембраной аппарата Гольджи, и содержимое везикул поступает внутрь комплекса. Вещества обрабатываются ферментами, после этого вновь упаковываются в везикулы и переносятся в зону созревания, где снова модифицируются и объединяются с другими веществами, образуя сложный по составу секрет. Он накапливается на терминальных участках АГ, откуда отпочковываются секреторные везикулы. Обычно такие везикулы переносят секреты за пределы клетки.

Функции Аппарата Гольджи:

1. Накопление и модификация синтезированных в ЭПС макромолекул.
2. Образование сложных секретов и секреторных везикул.
3. Синтез и модификация углеводов, образование гликопротеинов.
4. АГ играет важную роль в обновлении цитоплазматической мембраны путем образования мембранных везикул и их последующего слияния с клеточной мембраной.
5. Образование лизосом.
6. Образование пероксисом.

Таким образом, АГ является *главным «регулирующим» движением* макромолекул в клетке. Собирает синтезируемые белки, жиры, углеводы, распределяет их в транспортные везикулы и распределяет по клетке и за ее пределы.

8.1.10.1. Криоповреждения АГ

- Кристаллизация и дегидратация являются основными факторами криоповреждения АГ.
- В первую очередь повреждаются биомембраны. Нарушается их структура и целостность.
- Вследствие этого цистерны АГ теряют способность синтезировать и накапливать необходимые вещества.
- Нарушаются процессы образования сложных секретов, упаковка их в мембранные везикулы и транспортировка к месту использования.
- Нарушается процесс образования лизосом и пероксисом.
- Нарушается клеточная система сортировки и адресной транспортировки веществ.

8.1.11. Эндоплазматическая сеть

Эндоплазматическая сеть (ЭПС), или эндоплазматический ретикулум (ЭР), образованы комплексом мембранных трубочек, цистерн, овальных везикул и структурно связаны с оболочкой ядра (рис. 8.7). Различают два типа ЭПС: гладкая и шероховатая, хотя они структурно связаны между

собой. Шероховатая ЭПС несет на своей поверхности рибосомы, которых нет на поверхности гладкой. ЭПС образует сеть мембранных каналов, пронизывающих цитоплазму. Она имеет большое значение в процессах метаболизма, так как увеличивает площадь «внутренних поверхностей» клетки, делит ее на отсеки, отличающиеся физическим состоянием и химическим составом, обеспечивает изоляцию ферментных систем, что, в свою очередь, необходимо для их последовательного вступления в согласованные реакции. Образования мембранной системы очень лабильны и могут менять свою форму и размеры в зависимости от физиологического состояния клетки, характера обмена, а также при росте и дифференцировке.

Функции шероховатой ЭПС:

1. Участие в процессе синтеза белков благодаря наличию на поверхности ЭПС рибосом.

2. Накопление и модификация синтезируемых белков. Модификация (изменение структуры) происходит благодаря ферментам матрикса ЭПС. При этом многие белки приобретают функциональную активность.

3. Упаковка синтезированных белков в везикулы и транспортировка к местам использования. Модифицированный материал накапливается на терминальных участках ЭПС, от которых позже отпочковываются везикулы, содержащие секрет.

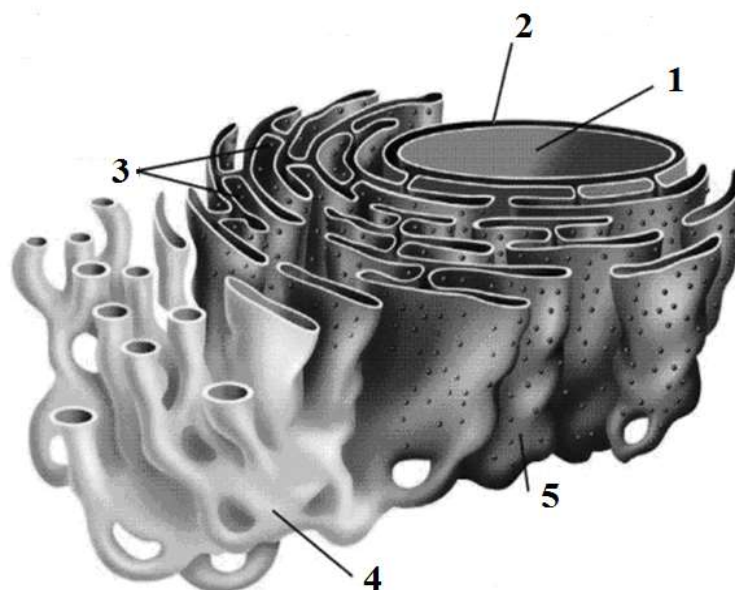


Рис. 8.7. Схема строения эндоплазматической сети (Д. Тейлор и др., 2004). Цитоплазма эукариотических клеток пронизана мембранными слоями, пузырьками, трубочками, ограничивающими в совокупности значительное внутриклеточное пространство. Мембраны ЭР образуют непрерывные структуры с наружной ядерной мембраной. Шероховатая ЭПС выглядит как система плоских цистерн, наружная сторона которых покрыта синтезирующими белки рибосомами. Гладкая ЭПС имеет более выраженное трубчатое строение и лишена рибосом. 1 – ядро, 2 – ядерная оболочка, 3 – рибосомы на шероховатой ЭПС, 4 – гладкая ЭПС, 5 – шероховатая ЭПС.

Функции гладкой ЭПС:

1. Синтез фосфолипидов и стероидов.
2. Синтез некоторых углеводов, в частности, гликогена.
3. Накопление и модификация синтезируемых веществ.
4. Упаковка в везикулы и транспортировка к местам использования.
5. Участие в процессах *детоксикации* путем ферментативного превращения ядов в нетоксичные вещества, удобные для экскреции.

8.1.11.1. Криповреждения ЭПС

- Изменение структуры и функции мембранной сети ЭПС.
- Модификация структуры и функций ассоциированных с мембранами ферментов.
- Нарушение синтеза, активации и накопления белков.
- Нарушение образования, упаковки и транспорта белков и секретов.
- Трансформация синтеза липидов и углеводов.

Ещё раз следует подчеркнуть, что все описанные криповреждения клеток возникают при замораживании, но проявляются и усиливаются только при размораживании и после полного отогрева биологических объектов.

Таким образом, замораживание-отогрев биообъектов (в отсутствии криопротекторов) способствует существенным структурным и функциональным нарушениям клеток. Повреждаются мембраны, органеллы, цитозоль, ферменты и другие компоненты клеток. Это приводит к тому, что образуются грубые механические и осмотические дефекты, происходят множественные нарушения и дискоординация метаболизма. В результате существенно ухудшаются процессы образования энергии и синтеза необходимых макромолекул. В итоге *сразу после размораживания* начинают проявляться все криодефекты, которые со временем усугубляются, что приводит к гибели и некрозу значительной части клеток биологического объекта.

Следствием описанных процессов являются холодовые травмы и обморожения у человека в условиях мороза в зимний период года (См. главу 33). С другой стороны, разрушительный эффект замораживания-отогрева используется в практике медицинской криохирургии (См. главу 34).

Клетки обладают способностью к регенерации некоторых незначительных повреждений, поэтому какое-то количество клеток всё-таки может выжить. Но этого недостаточно, если стоит задача сохранения и долгосрочного хранения биоматериала. Поэтому для криоконсервирования и длительного хранения биологических объектов, с целью их дальнейшего использования в медицинской практике, обязательно применяют специальные защитные вещества и среды – *криопротекторы и криоконсерванты* (См. главы 9,10). Это способствует сохранению большинства клеток и тканей жизнеспособными даже после замораживания до минус 196⁰С, долгосрочного хранения и последующего отогрева.

Применение криопротекторов, умеренно дегидратирующих клетки, понижающих точку замерзания клеточной и окружающей воды и препятствующих образованию крупных кристаллов, способствует предотвращению появления и развития многих криодефектов. Поэтому правильно подобранные криопротекторы могут полностью или частично защитить и восстановить как структуру, так и функции клеток и биообъектов в целом.

Рекомендуемая литература:

1. Албертс, Б., Брей, Д. и др. Молекулярная биология клетки: в 3 т. – М.: Регулярная и хаотическая динамика, Институт компьютерных исследований.–2013.
2. Ченцов, Ю.С., Введение в клеточную биологию. – М.: ИКЦ "Академкнига".–2004. – 495 с.
3. Жегунов Г.Ф., Д.В.Леонтьев, Е.В.Щербак, Е.Г. Погожих - Биология клетки. - Москва, Ленард.–2018.–544 с;
4. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – К.: Наук. думка. – 1982. – 255 с.
5. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – К.: Наук. думка. – 1994. – 432 с.

Глава 9. Криопротекторы

9.1.Историческая справка. 9.2.Классификация криопротекторов. 9.3.Общие свойства криопротекторов. 9.4.Характеристика эффективных криопротекторов. 9.4.1.Глицерин. 9.4.2.Диметилсульфоксид (ДМСО). 9.4.3.Диметилацетамид (ДМАЦ). 9.4.4.Пропиленгликоль (1,2-Пропандиол). 9.4.5.Полиэтиленгликоль (Полиэтиленоксид). 9.4.6.Декстран. 9.4.7.Гидроксиэтилкрахмал (ГЭК). 9.4.8.Оксиэтилированный глицерин (ОЭГ).

Криопротекторы (от греческого *kryos* – холод и латинского *protector* – прикрывающий, защищающий) – группа разнообразных веществ, которые обладают способностью предупреждать развитие повреждений биологических объектов при замораживании-отогреве и обеспечивают их сохранность в жизнеспособном состоянии после долгосрочного хранения при низких температурах.

Криопротекторы являются важнейшей и обязательной составляющей протоколов низкотемпературного консервирования биологических объектов.

9.1 Историческая справка

Защитные свойства глицерина, а также глюкозы и сахарозы при замораживании различных растений были открыты ещё в 1913 г. В 1937 г. глицерин был применен при замораживании спермиев млекопитающих (баран, бык, хряк, жеребец) и птиц. В 1955 г. впервые в качестве криопротектора ученые применили поливинилпирролидон (ПВП) и декстран, в 1959 г. диметилсульфоксид (ДМСО), а в 1963 гидроксиэтилкрахмал (ГЭК).

В Харькове в конце 50-х годов был осуществлен синтез новых химических веществ – полиэтиленоксидов (ПЭО). Исследование полиэтиленоксидов в Физико-техническом институте низких температур НАН Украины и Харьковском институте переливания крови показало, что они обладают криопротекторными свойствами и эффективны при низкотемпературном консервировании клеток костного мозга и эритроцитов человека.

С 1972 года системное изучение криопротекторных соединений осуществляется в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, в отделе криопротекторов. Важным направлением работы отдела явилась реализация идеи создания новых эффективных криопротекторов, обладающих не только высокой криозащитной активностью, но и низкой токсичностью для клеток, тканей и целого организма. С этой целью разработан и использовался экспериментальный подход, заключающийся в химической модификации молекул классических криопротекторов (этиленгликоль, глицерин, ацетамид и др.), включением в их молекулу заместителей различной природы (например, C_2H_5 , CH_3), подборе надлежащих условий синтеза. Такой подход позволил создать новые криозащитные соединения – монометиловый эфир глицерина (1-ММЭГ), оксиэтилированный глицерин (ОЭГ), оксиэтилированный ацетамид и др.,

характеризующиеся высокой криопротекторной активностью при замораживании различных биологических объектов (клетки крови человека, клеточные культуры, спермии животных и т.д.).

Со второй половины XX столетия методы криоконсервирования и долгосрочного хранения клеток и тканей при низких температурах с применением криопротекторов нашли широкое применение во многих областях медицины, биологии, сельского хозяйства. В качестве возможных криопротекторов были апробированы свыше 200 химических веществ, включая различные классы химических соединений (табл.9.1). Однако в группу активных используемых криопротекторов входит не более 10–15 веществ (табл.9.2).

9.2. Классификация криопротекторов

Наиболее общепринятой в настоящее время является классификация, по которой все известные криопротекторы разделяют на проникающие и непроникающие через плазматическую мембрану в цитоплазму клеток.:

1. Проникающие (эндоцеллюлярные)
2. Непроникающие (экзоцеллюлярные)
3. Криопротекторы смешанного типа.

К проникающим криопротекторам относятся низкомолекулярные вещества, принадлежащие к разным классам химических соединений: спирты (глицерин, этиленгликоль, пропиленгликоль), оксиды (ДМСО), амиды (формамид, диметилформамид, ацетамид, диметилацетамид) и др. Непроникающие криопротекторы – высокомолекулярные, длинно-цепочечные искусственные полимеры (декстран, полиэтиленгликоль, гидроксиэтилкрахмал, оксиэтилированный глицерин) и др.

Деление криопротекторов по способности проникать внутрь клеток в определенной степени условно – проницаемость веществ зависит от многих факторов: типа клеток и их видовой принадлежности, свойств (характеристик) мембран объекта, температуры введения криопротектора, состава криозащитной среды – температура и некоторые добавки могут снижать способность вещества проникать через мембраны, и т.д. Следует подчеркнуть, что отнесенные к эндоцеллюлярным криопротекторам вещества проникают в клетки с разной скоростью. Эта скорость определяется не только видом криопротектора, но и видом клеток. Для криопротекторов разной химической природы нет единых границ молекулярной массы, так как криопротекторная активность обнаружена как у низкомолекулярных, так и у полимерных высокомолекулярных соединений.

9.3. Общие свойства криопротекторов

Установлена многофакторная природа криповреждений биологических объектов в процессе замораживания-отогрева (см. главу 5). Большинство факторов криповреждений прямо или косвенно связано с образованием кристаллов льда (вне- и внутриклеточная кристаллизация). По мере снижения температуры большая часть растворителя (воды) превращается в лед. При этом увеличивается концентрация растворенных в жидкой фазе солей, изменяется величина pH и зарядовые характеристики мембран, на клеточной мембране возникает градиент осмотического давления, вызывающий быстрый выход воды из клетки. За этим следует дегидратация и уменьшение объема клеток. Указанные нарушения сопровождаются деформацией и перераспределением липидов и белков мембран, нарушается проницаемость мембран, что усиливает повреждающее действие низких температур.

Защитное действие криопротекторов прежде всего связывают с эффективным снижением количества вымораживаемой в виде чистого льда воды при каждой данной температуре, предотвращением кристаллизации воды из эвтектической смеси «криопротектор-вода», понижением температуры замерзания вне- и внутриклеточной среды, снижением концентрации солей. Эффективный криопротектор должен поддерживать в растворенном состоянии соли и белки вплоть до эвтектического перехода в аморфное состояние, т.е. его растворы должны иметь *низкую эвтектическую температуру*, чтобы сократить температурный интервал воздействия твердой фазы на клетку в процессе замораживания-отогрева.

К общим необходимым свойствам криопротекторов следует отнести:

- хорошую растворимость в воде (гидрофильность);
- способность к образованию сильных водородных связей с молекулами воды, взаимодействию с солями, металлами, компонентами биомембран и биополимерами (протоноакцепторная активность);
- способность эффективно снижать при замораживании количество образуемого льда и концентрацию внеклеточной соли;
- способность к образованию мелкокристаллической структуры льда, т.е. к аморфизации вплоть до стеклования, снижению степени механического воздействия льда на цитоплазматические структуры и мембраны;
- низкую эвтектическую температуру растворов, способность полностью предотвращать доэвтектическую кристаллизацию воды, поддерживать в растворенном состоянии соли и белки до эвтектического перехода незамерзшей фазы в аморфное состояние;
- способность образовывать легкообратимые комплексы с макромолекулами, ионами и другими компонентами околоклеточной среды и клеточными структурами;
- отсутствие токсичности;

- отсутствие повреждающего действия на биологические объекты при их концентрировании на этапах замораживания-отогрева.

Установлена зависимость криозащитной эффективности веществ от их гидратационных свойств. Увеличение количества связанной воды способствует ослаблению процессов кристаллизации и связанных с ним вредных воздействий на биоструктуры. Кроме того, это приводит к стабилизации гидратационных оболочек, окружающих белки, что снижает воздействие различных экстремальных факторов.

Эффективный проникающий криопротектор должен предупреждать возникновение на цитоплазматической мембране высоких повреждающих градиентов концентраций вне- и внутриклеточных растворов, образующихся по мере вымораживания воды и обезвоживания клетки.

Непроникающие криопротекторы оказывают защитное действие благодаря способности вызывать частичную дегидратацию клеток и тем самым снижать возможность внутриклеточной кристаллизации, а также сохранять жидкокристаллическую структуру липидного слоя мембран клеток, стабилизировать структуру биомакромолекул.

Токсичность криопротекторов является одним из главных лимитирующих факторов успешного криоконсервирования. Например, некоторые вещества (метанол, этанол), обладая низкой эвтектической температурой, не могут быть использованы из-за своей цитотоксичности. Криопротекторы могут оказывать неблагоприятное действие ещё до замораживания и таким образом индуцировать изменения и повреждения, в том числе скрытые, быть причиной развития патологии на следующих этапах криоконсервирования.

Токсичность криопротекторов оценивается на уровне клеток и организма. Токсичность на организменном уровне оценивается их летальной дозой – ДЛ-50. Цитотоксичность криопротекторов может быть обусловлена как осмотическим, так и химическим (или биохимическим) их действием на биологические структуры и является существенным препятствием достижения полного восстановления жизнеспособности клеток после криоконсервирования.

Подбор криопротектора для любого конкретного вида клеток определяется, прежде всего, его токсичностью в растворах различной концентрации. После такого предварительного отбора можно приступать к испытанию криопротекторных свойств криозащитного соединения в конкретных условиях эксперимента. Отобранный лучший вариант является основой для разрабатываемого криоконсерванта, обеспечивающего щадящие условия на всех этапах процесса низкотемпературного консервирования.

При определении цитотоксичности необходимо отличать эффекты временного ингибирования от эффектов повреждающего химического или физико-химического действия.

9.4. Характеристика эффективных криопротекторов

9.4.1. Глицерин

Молекулярная формула – $C_3H_8O_3$

Структурная формула – $\begin{array}{c} CH_2 - CH - CH_2 \\ | \quad | \quad | \\ OH \quad OH \quad OH \end{array}$.

Глицерин представляет собой трехатомный спирт.

Молекулярная масса – 92,09 Д.

Плотность – 1,261 г/см³.

Температура кипения – 290 °С .

Температура плавления – 17.8°С.

При комнатной температуре представляет собой бесцветную вязкую жидкость. Благодаря наличию гидроксильных ОН-групп глицерин образует водородные связи с молекулами воды и хорошо растворяется в ней в любых соотношениях. Процесс растворения сопровождается выделением тепла. Глицерин хорошо растворяется в спиртах (метиловом, пропиловом, изобутиловом), этиленгликоле, пропиленгликоле, ацетоне, в смеси спирта и ацетона. Известна способность глицерина растворять многие вещества неорганического происхождения – щелочи, соли, мочевины, сахарозу, газы. Не растворяется глицерин в жирах и органических растворителях: бензоле, бензине, хлороформе, сероуглероде.

Глицерин широко распространен в природе и входит в состав живой материи растительного или животного происхождения. В организм человека поступает с пищей в составе жиров, а также образуется в ходе обмена веществ в печени. Обнаруживается в плазме крови и тканях в свободном и связанном состоянии, главным образом в составе жиров и липидов. Эфиры глицерина и жирных кислот входят в состав клеточных мембран.

Данные токсико-фармакологических исследований свидетельствуют о том, что глицерин является малотоксичным веществом. По общепринятой классификации глицерин относится к веществам с низкой токсичностью: ДЛ-50 глицерина составляет 6,5 г/кг массы животного.

Проявление токсичности глицерина для клеток связано с дозой и временем контакта с ними, а при введении в организм зависит от дозы, состава среды и способа введения. Вместе с тем, в высоких дозах, применяемых для криоконсервирования, способен оказывать цитотоксическое действие, степень которого зависит от концентрации криопротектора и времени контакта с ним. Цитотоксическое действие глицерина проявляется изменением проницаемости клеточных мембран в первые часы после инкубации и достигает максимума спустя 12-48 часов с момента контакта глицерина с клеткой. Этим объясняются рекомендации ограничить время инкубации клеток с глицерином перед замораживанием до 30 мин. Глицерин обладает токсическим действием при введении его в организм в больших концентрациях. Так, инфузия 10-15% глицерина сопровождается временной гемоглобинурией, протеинурией, ознобом.

Глицерин обладает высокой вязкостью, что играет значительную роль в реализации его криозащитных свойств. С повышением концентрации глицерина в растворах их вязкость увеличивается. При переохлаждении глицерина вязкость его возрастает пропорционально падению температуры, что приводит к замедлению осмотических и диффузных процессов, а следовательно, к снижению скорости физико-химических процессов в биологических объектах при их охлаждении в средах, содержащих глицерин.

Глицерин снижает интенсивность процесса кристаллизации растворов и смещает его в зону более низких температур.

Температура замерзания водного раствора глицерина зависит от его концентрации: наиболее низкой температурой замерзания (минус 46,5°C) обладает 66,7% (8.33M) раствор глицерина. Переход такого вязкого раствора в витрифицированное состояние происходит при температуре ниже минус 83°C.

Кристаллографическими, рентгенографическими и термографическими исследованиями показано, что глицерин активно влияет на кристаллизацию растворов, способствует образованию мелкокристаллического льда с переходом в аморфное состояние. При этом центры кристаллизации хотя и многочисленны, но не способны к росту. К числу положительных эффектов глицерина относят способность уменьшать размер кристаллов льда, поскольку его охлаждение сопровождается уменьшением объема клетки, а также его способность поддерживать переохлажденное состояние клетки за счет стабильных водородных связей с молекулами воды. Глицерин препятствует образованию гиперконцентрированных солевых растворов до критической величины, опасной для биологических структур.

Глицерин способен проникать внутрь большинства клеток. Кинетика этого процесса зависит от свойств биологического объекта, состава среды, в которую входит глицерин, и температуры. При обычных температурах (20 - 37°C) глицерин легко проникает в клетки, однако при 0°C проницаемость плазматической мембраны у некоторых типов клеток для глицерина очень снижена и он действует как экзоцеллюлярный криопротектор.

Глицерин в широком диапазоне концентраций (от 2 до 80%, от 0,5M до 10,5M) используется при замораживании клеток крови (эритроциты, ядродержащие клетки, тромбоциты, миелокариоциты); спермы сельскохозяйственных животных (бык, баран и др.) и многих других клеток и тканей. Глицерин является одним из наиболее широкоприменяющихся криопротекторов для замораживания эритроцитов человека с целью последующего клинического использования.

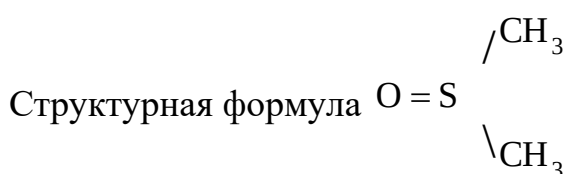
Общей и важной проблемой применения глицерина в качестве криопротектора, как и других проникающих криозащитных веществ, является необходимость их удаления из клеток перед использованием. Все методы отмывания глицерина основаны на принципе постепенного разведения размороженных клеток гипертоническими растворами веществ, не проникающих в клетку – дисахаридов, многоатомных спиртов, электролитов и др. в снижающихся концентрациях вплоть до изотонии.

Методы отмывания – серийное центрифугирование, непрерывное центрифугирование в потоке отмывающих растворов на аппаратах-сепараторах и обратимая цитоагломерация. Последние два метода используются в основном для отмывания клеток крови. В процессе отмывания глицерина в клетках могут возникать дополнительные повреждения.

Вместе с тем, глицерин обладает всеми необходимыми достоинствами классического эндоцеллюлярного криопротектора и широко используется в практической криобиологии и криомедицине.

9.4.2. Диметисульфоксид (ДМСО), (Me₂SO), (димексид)

Молекулярная формула – C₂H₆OS;



Относится к классу оксидов; молекулярная масса – 78,13Д.

Температура кипения – 189°C.

Температура плавления – 19°C.

Плотность – 1,1 г/см³.

ДМСО представляет собой прозрачную бесцветную жидкость. ДМСО хорошо растворяется в воде и большинстве органических растворителей, обладает высокой способностью вступать в реакции с солями и оксидами фосфата, серы, формировать связи с глицерином, сахарозой, мочевиной, стеариновой кислотой и другими органическими соединениями. Отличается повышенной способностью образовывать водородные связи с молекулами воды, а с ионами – комплексные соединения, что влияет на активность окислительных реакций.

Эвтектическая температура раствора ДМСО составляет – минус 66°C с эвтектической концентрацией 70% (9.85М). ДМСО неустойчив, при хранении образует S-содержащие токсичные продукты (диметилсульфид (CH₃)₂S), приобретает специфический неприятный запах. При хранении в морозильнике бытового холодильника срок использования ДМСО без предварительной очистки может быть увеличен. Процесс растворения ДМСО в воде носит экзотермический характер, что следует учитывать при подготовке сред.

Высокие концентрации ДМСО токсичны для клеток как на этапе инкубации, до замораживания, так и на этапе отогрева. Он может необратимо повреждать ткани, имеются доказательства его тератогенного и эмбриотоксического действия.

ДМСО относится к проникающим криопротекторам: хорошо проникает через плазматические и внутриклеточные мембраны, образует комплексы с

солями и другими химическими соединениями. Кримионокроскопические и рентгенографические исследования показали, что ДМСО влияет на процесс зародышеобразования кристаллов льда, замедляет их рост и существенно уменьшает размеры. При содержании 10-15% (1,4М – 2,1М) ДМСО в среде замораживания происходит мелкочаеистая кристаллизация, близкая по своей природе к аморфной.

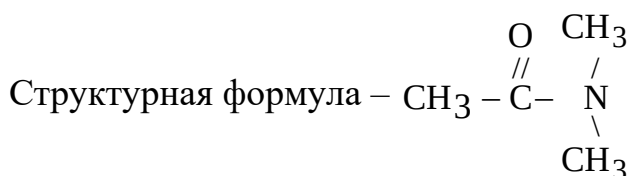
ДМСО нашел применение в практике криоконсервирования гамет и эмбрионов млекопитающих, клеток костного мозга и тромбоцитов человека (преимущественно аутологичного костного мозга и тромбоцитов), спермы птиц и рыб, ткани щитовидной железы, меристемальных тканей растений, гепатоцитов и других клеток.

Вследствие выраженной токсичности существует запрет на внутривенное введение криоконсервированных с ДМСО клеточных суспензий. Вместе с тем, Всемирной организацией здравоохранения в конце XX века принято решение о возможности применения ДМСО в качестве криопротектора с обязательным отмытием криоконсервированных под его защитой материалов до следовых количеств вещества перед использованием.

ДМСО применяется в медицине, в частности, ортопедии и травматологии в виде очищенного фармакопейного препарата димексида. Другие области применения - использование в качестве радиопротектора, основы мазей, растворителя в производстве пластмасс и др.

9.4.3 Диметилацетамид (ДМАЦ)

Молекулярная формула – C_4H_9NO .



Молекулярная масса 87,12.

Температура кипения – 165,5°C.

Температура плавления – минус 20°C.

Плотность – 0,9366г/см³.

ДМАЦ представляет собой прозрачную бесцветную гигроскопическую жидкость. ДМАЦ относится к классу низкомолекулярных криопротекторов эндоцеллюлярного действия. Хорошо проникает через плазматические и внутриклеточные мембраны. Токсичность ДМАЦ изучена для различных животных и человека: при внутривенном введении ДЛ-50 для мышей составляет от 2,58г/кг до 4,2г/кг; для крыс – 3,56 г/кг. Может оказать тератогенное действие.

В качестве криопротектора ДМАЦ используется для криоконсервирования концентрата тромбоцитов (криоконсервант «Тромбокриодмац») и лейкоцитов (гранулоцитов) (криоконсервант «Лейкокриодмац»), донорской крови человека, других клеточных суспензий.

9.4.4. Пропиленгликоль (1,2-Пропандиол; 1,2 ПД)

Молекулярная формула – $C_3H_8O_2$

Структурная формула –
$$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_3 \\ | \quad \quad | \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$$

Молекулярная масса – 76,1.

Плотность – 1,04 г/см³.

Температура кипения – 188,2°C.

Температура плавления – минус 59°C.

Пропиленгликоль представляет собой прозрачную бесцветную вязкую жидкость. Пропиленгликоль адсорбирует влагу, смешивается с водой в любых пропорциях, характеризуется неограниченной растворимостью в воде при 20°C; хорошо растворяет жиры.

Пропиленгликоль легко проникает в клетки. Эффективно связывает воду. При замораживании проявляет свойства, присущие глицерину, способствует формированию мелкокристаллических кристаллов льда, связывает соли. Температура замерзания 60% (8М) раствора 1,2-ПД ниже минус 70°C. Его водные растворы характеризуются низкой эвтектической температурой – минус 57-70°C. Пропиленгликоль обладает более низкой токсичностью, чем глицерин. При внутривенном введении ЛД-50 составляет 13 мл/кг у крыс, 8 мл/кг у мышей и 7 мл /кг у кроликов. При пероральном введении ДЛ-50 у крыс – 30 мл/кг, у мышей – 24 мл/кг, у кроликов – 18 мл/кг.

Как фармацевтический препарат пропиленгликоль применяется в качестве основы гидрофильных мазей, растворителя некоторых лекарственных веществ и стабилизатора растворов.

Эффективность 1,2-пропандиола как криопротектора продемонстрирована при низкотемпературном консервировании клеток крови человека (эритроциты, тромбоциты), клеток культуры ткани почки человека, спермиев быка и птиц, и др.

На основе 1,2-ПД в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины создан криоконсервант «Пропандиосахароль» и разработаны метод и технология криоконсервирования эритроцитов человека для клинического применения. Технология криоконсервирования эритроцитов человека с «Пропандиосахаролем» имеет существенные преимущества перед технологиями криоконсервирования с глицерином и выгодно отличается простотой технологических этапов обработки клеток перед и после криоконсервирования, стабильным воспроизведением результатов, высоким уровнем жизнеспособности и морфофункциональной сохранности криоконсервированных клеток и их клинической эффективности, значительно более низкой стоимостью и доступностью для практического применения.

9.4.5. Полиэтиленгликоль (полиэтиленоксид, ПЭО)

Искусственные полимерные соединения с химической формулой $\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-\text{OH}$, где n – степень полимеризации, которая может варьировать в значительных пределах. В зависимости от средней молекулярной массы полимера, вещество может быть вязкой жидкостью, гелеобразным или твёрдым веществом.

Полиэтиленгликоли получают присоединением окиси этилена к этиленгликолю – отсюда продукт синтеза носит также название полиэтиленоксид (ПЭО). Конечный продукт химического синтеза является полидисперсным и содержит фракции разной молекулярной массы. Молекулярная масса, структура, физико-химические свойства молекулы ПЭО зависят от степени полимеризации.

В ряду этих полимеров известны вещества со средними молекулярными массами от 100 до 20000Д. Полиэтиленоксиды (ПЭО) с молекулярными массами 100÷400Д представляют собой вязкие жидкости, ПЭО 600 и ПЭО 1000Д – мазеподобные вещества, а ПЭО с м.м 1500Д и выше – воскоподобные и твердые вещества.

В качестве фармакопейных препаратов используются ПЭО с м.м. от 400 до 6000Д в качестве основы для лекарственных сред: мазей, глобул, таблеток, а также солубилизаторов и стабилизаторов суспензий и эмульсий. Известно свойство ПЭО(1500÷6000Д) вызывать слияние соматических клеток. Это их свойство используется при получении гибридом. ПЭО 2000 используется для осаждения белков плазмы. ПЭО 20000 известен своей способностью вызывать компактизацию ДНК.

Растворимость ПЭО в воде зависит от молекулярной массы. Криомикроскопические исследования процессов кристаллизации в растворах ПЭО показали, что при замораживании в 10-15% растворах олигомеров ПЭО образуются аморфные структуры и происходит замедление процессов кристаллизации, наблюдается уменьшение размеров кристаллов льда и снижение температуры начала кристаллизации. Методами рентгеноструктурного анализа показано, что ПЭО изменяют характер кристаллизации воды и размер кристаллов, образующихся в среде при замораживании-отогреве.

ПЭО 400В нашел применение в качестве криопротектора клеток костного мозга, крови и роговицы, а ПЭО 1500 применяется в качестве криопротектора эритроцитов человека. Однако он может негативно влиять на плазматические мембраны при температурах 18°C и выше. Это влияние проявляется на этапе удаления криопротектора из среды деконсервированных клеток. Если контакт клеток с криопротектором проводится в условиях глубокой гипотермии (0 ÷ 4°C), негативного действия ПЭО 1500 на эритроциты не наблюдается. Следует заметить, что глубокая гипотермия снижает цитотоксический эффект и других веществ, испытанных в качестве криопротекторов. Токсичность (ДЛ50) криопротекторов ПЭО 400

и ПЭО 1500 для кроликов и крыс невысокая и составляет примерно от 8 и до 11 г/кг веса.

9.4.6. Декстран

Декстраны $(C_6H_{10}O_5)_n$ – класс глюкозных полисахаридов. Это разветвлённые полимеры глюкозы со средней массой цепей от 3 до 20000 кДа.

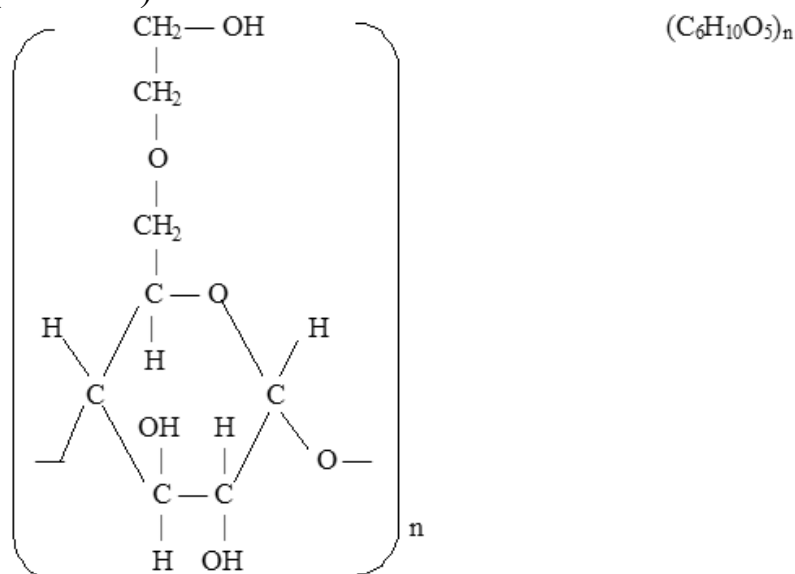
Физико-химические свойства декстранов варьируют в зависимости от молекулярной массы и содержания воды в смесях. Например, для декстрана молекулярной массы 3 000 в случае содержания воды в количестве 74,6 вес.% – температура стеклования – минус 79°C, а при содержании воды 17,3 вес.% – минус 67 °C.

Криозащитные свойства *декстрана* были открыты в 1955 году при замораживании эритроцитов человека. Декстран является одним из первых полимеров, привлёкших внимание криобиологов.

Декстраны с молекулярной массой 60 000÷10 000 и 40 000÷10 000 применяются в качестве лечебных препаратов – кровезаменителей гемодинамического действия (полиглюкин, реополиглюкин). Эти препараты применяются в качестве компонентов в составе сложных криоконсервантов, а также в составе сред на различных этапах восстановления криоконсервированных объектов.

9.4.7. Гидроксиэтилкрахмал (оксиэтилкрахмал) (ГЭК), (HES)

Полимерное соединение, полученное путем оксиэтилирования водорастворимой (амилопектиновой) фракции крахмала. Это высокомолекулярные соединения, состоящие из полимеризованных остатков декстрозы (глюкозы).



Основными характеристиками ГЭК, определяющими их физико-химические свойства, являются молекулярный вес, молярное замещение и

отношение гидроксипроцетилования у определенных атомов углерода - в положении С2 или С6. Молярное замещение определяют как отношение количества гидроксипроцетиловых групп к общему количеству молекул глюкозы.

Препараты ГЭК – полидисперсные соединения (порошки) с молекулярной массой от 60 000 до 500000. Растворы ГЭК формируют водородные связи с молекулами воды, что изменяет её структурированность и влияет на формирование кристаллической решетки льда, повышает способность молекул воды к формированию аморфных кристаллов льда при замораживании. Растворы ГЭК также оказывают стабилизирующее действие на плазматическую мембрану клеток. При охлаждении растворов ГЭК формируются мелкоячеистые структуры льда. Концентрированные растворы ГЭК демонстрируют способность к мицеллообразованию.

Гидроксипроцетилкрахмал (ГЭК) является медицинским препаратом, используется в качестве кровезаменителя с преимущественно гемодинамическим противошоковым действием, который способен включаться в метаболические процессы в организме человека.

ГЭК использовался в качестве криопротектора при разработке методов низкотемпературного консервирования клеток крови, клеток костного мозга, клеток культуры тканей, роговицы и др.

Изучение криопротекторных свойств ГЭК при замораживании эритроцитов крови показало, что этот криопротектор обеспечивает высокую сохранность морфофункциональных свойств клеток в процессе замораживания-оттаивания. В практике криоконсервирования эритроцитов использовали ГЭК со средней м.м. 60000, 120000 и 250000. На основе 40% раствора ГЭК м.м. 250000 был разработан способ низкотемпературного консервирования эритроцитов, который обеспечивает посттрансфузионную приживаемость эритроцитов порядка 70% и не требует предварительного удаления криопротектора из суспензии эритроцитов перед использованием. Существенным недостатком данного способа криоконсервирования является способность ГЭК депонироваться в ретикулоэндотелиальной системе, вызывать нарушения в свертывающей системе крови при переливании эритроцитной массы в количестве более 4 доз.

На основе ГЭК 200 кДа был разработан метод криоконсервирования эритроцитов человека. При использовании ГЭК в 11,7% концентрации удается получить более 90% жизнеспособных клеток после замораживания-оттаивания. Переливание одной дозы таких эритроцитов не вызывает посттрансфузионных осложнений у реципиента.

9.4.8. Оксипроцетилированный глицерин

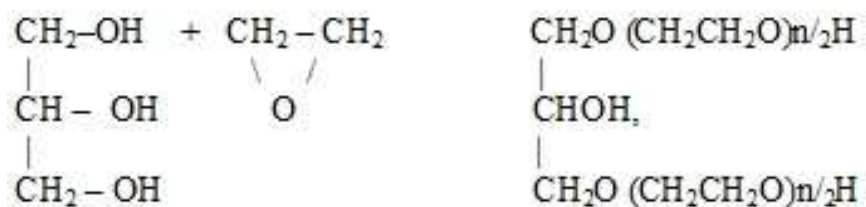
Закономерности, установленные в ряду полимеров полиэтиленгликоля, послужили основанием для создания криопротекторов путем оксипроцетилирования других химических соединений, в частности, глицерина.

Оксипроцетилирование позволило изменять биологические свойства и механизм криозащиты: полученные олигомеры глицерина утрачивали

способность проникать в клетки и, в отличие от исходного вещества, приобретали свойства криопротекторов экзоцеллюлярного действия.

Так, в результате направленной модификации молекулы трехатомного спирта глицерина ($C_3H_8O_3$) путем присоединения оксиэтильных звеньев

($-CH_2-CH_2-O-$) впервые были синтезированы новые вещества – оксиэтильные производные глицерина со степенью полимеризации n от 1 до 50 (ОЭГ $_{n=1-50}$) (молекулярные массы от 130 до 2300):



Скрининг их криопротекторных свойств показал, что олигомеры ОЭГ со степенью полимеризации $n=20-30$ (ОЭГ $_{n=20-30}$) проявляют защитное действие при замораживании эритроцитов, а ОЭГ $_{n=5}$ и ОЭГ $_{n=10}$ – при замораживании тромбоцитов и ядродержащих клеток крови, а также изолированных лизосом.

Установлено, что все изученные полимергомологи ОЭГ являются малотоксичными веществами. Изучение водных растворов ОЭГ $_{n=5}$ (м.м.312), ОЭГ $_{n=25}$ (м.м. 1192) и ОЭГ $_{n=30}$ (м.м.1412) показало, что увеличение степени полимеризации приводит к увеличению способности молекул ОЭГ к гидрофильным взаимодействиям. Исследуемые бинарные системы вода-ОЭГ $_{n=5}$, вода-ОЭГ $_{n=25}$ имеют высокую склонность к стеклованию, при охлаждении представляют собой гетерогенные системы, включающие аморфную и кристаллическую фазы, или гомогенные аморфные. С ростом степени полимеризации ОЭГ (ОЭГ $_{n=30}$) наблюдается возрастание значений температур фазовых переходов и стеклования. В диапазоне высоких концентраций олигомеров ОЭГ (80-90%) вода не способна кристаллизоваться. Высокая склонность к стеклованию (витрификации) объясняется содержанием в составе молекул ОЭГ большого количества полярных групп, способных к формированию водородных связей с водой.

Приведенные данные о физико-химических и криозащитных свойствах оксиэтильных производных глицерина позволяют отнести эти вещества к перспективным криопротекторам, криозащитная активность которых до конца не исследована. Результаты исследований свидетельствуют, в частности, о высокой криозащитной активности олигомеров ОЭГ при замораживании клеток крови (эритроциты, тромбоциты, ядродержащие клетки), спермиев человека и животных, клеточных культур и др., что позволяет рекомендовать эти соединения в качестве непроникающих криопротекторов для разработки на их основе криозащитных сред для замораживания компонентов донорской крови.

В заключение следует отметить, что среди различных классов соединений, обладающих функциональной общностью, определился новый

класс – криопротекторы, применение которых обеспечивает сохранность биологических объектов в жизнеспособном состоянии при замораживании (Табл.9.2).

Таблица 9.2. Основные свойства популярных криопротекторов в их эффективных концентрациях

Криопро- тектор	Раствори- мость	Токсич- ность	Проница- емость	Кристаллизация	Эвтектическая температура, °С
Глицерин	хорошая	низкая	хорошая	снижает	минус 46,5
ДМСО	хорошая	токсич- чен	хорошая	мелкокристал- лическая	минус 66
Пропилен- гликоль	хорошая	низкая	хорошая	мелкокристал- лическая	минус 57
Диметил- ацетамид	хорошая	токсич- чен	хорошая	аморфизация	минус 20
ПЭО-400	хорошая	низкая	слабая	мелкокристал- лическая	минус 43
ОЭГ _{n=25}	хорошая	низкая	не про- никает	склонны к стеклованию	минус 0,15

Именно открытие криопротекторов способствовало успешному развитию низкотемпературного консервирования и долгосрочного хранения многих биологических объектов.

Рекомендуемая литература:

1. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М. и др. Криопротекторы. Киев: Наукова думка.– 1978. – 204 с.
2. Н.Т. Maryman Cryoprotective agents: A review // Cryobiology. – 1971. – Vol. № 2. – P. 173– 183.
3. Синтез, физико-химические свойства оксиэтильных производных глицерина. Криозащитные среды на основе комбинаций криопротекторов для замораживания биологических объектов / Компаниец А.М., Чеканова В.В., Николенко А.В., Зинченко А.В., Пахомова Ю.С. [и др.] // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины: [монография / науч. ред. академик НАН Украины А.Н. Гольцев]. – Х.: «Райдер», 2012. – С. 73-126.
4. Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. Cryobiology 1990. – 27: P.247–68.
5. Acker J.P., Chen T., Fowler A., Toner M., Fuller B.J., Lane N.J., Benson E. E.; In: Life in the Frozen State; CRC Press, Boca Raton, FL; 2004; 563-580.
6. Leibo S.P.; The principle variable of cryopreservation; Fertile Steril.; 2011; 96(2); 269-76.

Глава 10. Криоконсерванты

- 10.1. Общие сведения о криоконсервантах и подходах к их созданию.
- 10.2. Криоконсерванты для замораживания клеток крови.
- 10.3. Криоконсерванты для замораживания спермиев животных.
- 10.4. Криоконсерванты для замораживания микроорганизмов.
- 10.5. Криоконсерванты для замораживания различных тканей и органов

10.1 Общие сведения о криоконсервантах и подходах к их созданию

Перспективным методом долгосрочного хранения различных биологических объектов является их низкотемпературное консервирование. Для сохранения биологических объектов при низких температурах необходимы определенные условия и, в первую очередь, наличие криоконсерванта, который способен защищать биологические объекты от криоповреждений в процессе консервирования.

Криоконсервант – многокомпонентный раствор, состоит из основного компонента, которым является криопротектор, а также вспомогательных веществ природного и синтетического происхождения.

Криоконсерванты классифицируют по их целевому назначению и составу. По назначению их условно разделяют на 4 группы – для замораживания клеток крови и костного мозга, половых продуктов тканей и органов млекопитающих, а также микроорганизмов. По составу криоконсерванты делятся на растворы, созданные на основе проникающих и непроникающих криопротекторов, а также их различных комбинаций. В криоконсервантах на основе проникающих криопротекторов исходным веществом являются низкомолекулярные соединения (ГЛ, ДМСО, ДМФА, ЭГ и др.), а в криоконсервантах на основе непроникающих криопротекторов (ПЭО, ПВП, ГЭК, декстраны) – высокомолекулярные соединения, или олигомеры. Комбинированный криоконсервант может состоять из сочетания проникающих криопротекторов, отличающихся химической природой, а также из комбинации проникающего и непроникающего криопротекторов.

Кроме криопротекторов в криоконсервантах любого состава должны присутствовать вспомогательные вещества.

Вспомогательные вещества – это дополнительные вещества, необходимые для компенсации или предотвращения изменений в биологических объектах, которые возникают на этапах их низкотемпературного консервирования. Во всех криоконсервантах может быть использовано необходимое количество вспомогательных веществ.

С целью систематизации и правильного подбора вспомогательных веществ их классифицируют по функции, выполняемой в составе криоконсерванта: стабилизаторы мембран, комплексообразователи, антибиотики, энергообеспечители, стабилизаторы осмотического баланса, ионного и кислотно-основного равновесия, модификаторы кристаллообразования и соединения, обладающие незначительной

криопротекторной активностью. Эта классификация достаточно условна, так как одно вещество может обладать свойствами разных групп, но она удобна для характеристики и подбора вспомогательных компонентов, составляющих криоконсервант.

Важным требованием, предъявляемым к криопротекторам и вспомогательным веществам, является отсутствие цитотоксического действия в отношении биологического объекта и способность эффективно выполнять предполагаемую функцию в цикле криоконсервирования. Одним из основных показателей качества криоконсерванта является высокая сохранность и жизнеспособность биологического объекта после деконсервирования.

При подборе состава криоконсерванта для замораживания любого биообъекта следует учитывать, что по своему составу и свойствам он должен быть максимально приближен к условиям естественного функционирования клеточных суспензий, микроорганизмов, тканей и органов. Именно поэтому все современные принципы и условия разработки эффективных криоконсервантов основываются, прежде всего, на поддержании основных функциональных потребностей биообъекта, подлежащего замораживанию.

Для разработки оптимального состава криоконсервантов используются два способа: метод эмпирического подбора (скрининг, метод «проб и ошибок») и математический метод планирования эксперимента. Первый способ является весьма распространенным в криобиологии. Знание физиологических особенностей биологического объекта, условий охлаждения-отогрева, типа криопротектора позволяет криобиологам методом подбора и изменения какого-либо из компонентов на неизменном фоне остальных разработать криоконсервант. Однако такой способ очень длительный. Прогрессивным методом в поиске новых криоконсервантов является использование математических методов планирования экспериментов, которые позволяют значительно быстрее найти и обосновать его оптимальный состав.

Следует отметить, что все биологические объекты имеют различия в структуре и функции, а также в присущих им свойствах по-разному реагировать на процессы, происходящие при низкотемпературном консервировании, поэтому возможность создания единого универсального криоконсерванта практически исключена.

10.2. Криоконсерванты для замораживания клеток крови человека

Общие требования к криоконсервантам. Клетки крови человека замораживают, используя криоконсерванты, специально разработанные для их долгосрочного хранения при низких температурах. Для обеспечения высокой сохранности клеток крови в процессе криоконсервирования криоконсерванты должны соответствовать следующим требованиям: иметь определенный химический состав для каждого типа клеток, оптимальный уровень pH (диапазон), способны предотвращать свертываемость крови,

обеспечивать оптимальное осмотическое давление, поддерживать энергетический метаболизм, быть стерильными, но не содержать антибиотиков.

Типы криоконсервантов. По составу криоконсерванты могут быть на основе проникающих и непроникающих криопротекторов, криоконсерванты смешанного действия, комбинированные криоконсерванты.

Составляющие криоконсервантов – криопротекторы и вспомогательные вещества.

Криопротекторы, используемые для замораживания клеток крови, были отобраны из большого количества различных химических соединений – одноатомных и многоатомных спиртов, амидов, сульфоксидов, полимеров, полисахаридов. Для создания криоконсервантов было отобрано не более 15 соединений, обладающих наиболее высокой криопротекторной активностью при замораживании клеток крови (табл.10.1).

Вспомогательные вещества из класса органических и неорганических солей щелочно-земельных металлов, карбоновых кислот, углеводов, многоатомных спиртов, белков, мембранотропных фармакологических препаратов, антибиотиков были исследованы в составе различных криоконсервантов для долгосрочного хранения клеток крови (табл. 10.1).

Выбор вспомогательных веществ основан на том, что они могут предотвращать изменения в клетках крови, возникающие на разных этапах криоконсервирования.

Таблица 10.1. Криопротекторы и вспомогательные компоненты, использованные для разработки криоконсервантов

Вещество	Клетки крови		
	Эритроциты	Тромбоциты	Лейкоциты
<i>Криопротекторы</i>			
<i>Проникающие</i>			
Глицерин	+	+	-
1,2-ПД	+	+	-
ДМСО	+	+	+
ДМАЦ	+	+	+
<i>Непроникающие</i>			
ГЭК (200, 250 кДа)	+	+	-
ПВП (м.м. 12 600, 25 000)	+	-	+
Декстраны	+	-	-
<i>Криопротекторы смешанного действия</i>			
ПЭО-1500	+	-	-
ГМБТОЭМ	-	+	+
ОЭГ _{n=25}	+	-	-
ОЭГ _{n=5}	-	+	-
<i>Вспомогательные компоненты</i>			
<i>Органические и неорганические соли щелочно-земельных металлов, карбоновые кислоты</i>			

Цитрат натрия	+	+	+
Хлористый натрий	+	+	-
Лактат натрия	+	-	-
Фосфат натрия (калия) одно- и двузамещенный	+	-	-
ЭДТА Na ₂	+	+	+
Лимонная кислота	+	+	+
<i>Углеводы</i>			
Сахароза	+	-	+
Глюкоза	+	+	+
Трегалоза	+	+	-
Углеводы	+	-	+
<i>Многоатомные спирты</i>			
Маннит	+	-	-
Сорбит	+	-	-
Дульцит	+	-	-
<i>Белки</i>			
САЧ	+	-	-
Антифризные белки	+	-	-
<i>Мембранотропные фармакологические вещества</i>			
Холин хлорид	+	-	-
Нифидипин	+	-	-
Никотинамид	+	-	-
Флюбипрофен	+	-	-
<i>Антиоксиданты</i>			
Фумарат натрия	-	-	+
<i>Антибиотики</i>			
Левомецитин	-	-	+

Органические и неорганические соли щелочноземельных металлов, карбоновые кислоты используются для поддержания кислотно-основного равновесия, осмотического баланса, в качестве антикоагулянтов и антиоксидантов.

Для коррекции pH криоконсерванта, используемого для криоконсервирования эритроцитов, рекомендуют применять фосфатно-солевой буфер (натрий (калий) фосфат одно- и двузамещенный). Эти буферные системы хорошо переносят стерилизацию. Кроме того, неорганический фосфор стимулирует гликолиз, способствует поддержанию близкого к нормальному уровню 2,3-ДФГ, следовательно, регулирует кислород-транспортную функцию клеток.

Регулирование pH криоконсервантов при замораживании тромбоцитов и лейкоцитов осуществляют за счет введения в криоконсервант цитрата натрия, лимонной кислоты, ЭДТА Na₂. Также эти вещества способны предотвращать коагуляцию клеток крови. Механизм их действия состоит в связывании ионов кальция, что предотвращает свертывание крови. ЭДТА Na₂, кроме ионов кальция, связывает ионы калия и магния, что может привести к гемолизу эритроцитов. Поэтому в составе криоконсервантов для

эритроцитов ЭДТА Na_2 практически не используют. Для этих целей в криоконсервант для замораживания эритроцитов на основе глицерина вводят лактат натрия.

Хлористый натрий используют для поддержания осмотического баланса в криоконсервантах, предназначенных для замораживания эритроцитов.

Антиоксиданты в криоконсервантах для клеток крови не используются, поскольку эту функцию могут выполнять криопротекторы и углеводы. Однако появились работы, в которых доказано, что введение в состав криоконсерванта на основе криопротектора ГМБТОЭМ фумарата натрия позволяет снижать интенсивность процессов ПОЛ при криоконсервировании лейкоцитов.

Углеводы в составе криоконсервантов регулируют осмотичность во внеклеточной среде, стабилизируют белково-липидные комплексы клеточных мембран, поддерживают энергетический баланс, а также проявляют антиоксидантные свойства.

Положительное влияние моно- и дисахаридов установлено при замораживании эритроцитов в составе криоконсервантов на основе 1,2-ПД, глицерина, ПВП и ОЭГ_{n=25}, а при замораживании тромбоцитов и лейкоцитов – ДМАЦ и ДМСО. Также эффективность использования трегалозы в составе криоконсерванта была доказана при лиофилизации тромбоцитов.

Защитный эффект моносахаридов связывают с их стабилизирующим действием на мембраны, который осуществляется путем формирования водородных связей между гидроксильными группами сахаров и полярными группами фосфолипидов и белков клеточной мембраны. Кроме того, положительный эффект моносахаридов связывают с их воздействием на состояние энергетического метаболизма клеток. При исследовании глюкозы, сахарозы и трегалозы в составе криоконсервантов на основе ПВП и 1,2-ПД было установлено, что эти углеводы поддерживают синтез АТФ и покрывают потребность эритроцитов в энергии. При этом глюкоза в составе криоконсерванта на основе ПВП оказалась наиболее эффективным субстратом питания. Еще одно положительное свойство моно- и дисахаридов заключается в их способности увеличивать вязкость растворов и таким образом способствовать их переходу в состояние витрификации. При этом показано, что моносахариды проявляют способность к стеклованию при более низких концентрациях, чем дисахариды. Однако при использовании гипертонических концентраций сахароза способна действовать как осмотический агент, снижающий содержание внутриклеточной воды.

Многоатомные спирты оказывают стабилизирующее действие на мембрану клеток и регулируют осмотичность криоконсерванта. Для этих целей в составе криоконсерванта на основе глицерина для замораживания эритроцитов был использован маннит.

Белки используют в качестве модификаторов кристаллообразования. Применение САЧ в составе криоконсервантов на основе ПВП, ГЭК позволяет получить более высокую морфофункциональную сохранность

эритроцитов человека после криоконсервирования. Однако его использование в криоконсервантах не получило широкого применения, так как альбумин нельзя подвергать тепловой стерилизации, следовательно, его нужно добавлять к стерильному раствору криопротектора, что не соответствует правилам антисептики. Установлена эффективность применения в составе криоконсерванта на основе ГЭК антифризных белков, выделенных из *Pseudopleuronectes americanus*, *Hemitripterus americanus* и *Escherichia coli*. Механизм их защитного действия связывают с ингибированием процесса рекристаллизации при размораживании.

Мембранотропные фармакологические вещества способны оказывать стабилизирующий эффект на клеточную мембрану эритроцитов. Было доказано, что введение нифидипина, никотинамида, флюбипрофена, холин хлорида в состав криоконсервантов на основе ГЭК, ПЭО-1500, ДМСО и ГЛ, позволяет получить высокий уровень сохранности эритроцитов.

Антибиотики оказывают противомикробное действие. Они были использованы в составе криоконсервантов на основе ПВП м.м 12600 при замораживании лейкоцитов.

Криоконсерванты на основе проникающих криопротекторов. В Украине и Российской Федерации для криоконсервирования эритроцитов регламентируют использование криоконсервантов на основе глицерина (ЦНДИГПК 11₄ или 11₅, ЛьвНИИГПК) и 1,2-ПД («Пропандиосахароль», комбинированный криоконсервант 1,2-ПД и ДМАЦ), а для тромбоцитов и лейкоцитов – на основе ДМАЦ («Тромбокриодмац», «Лейкокриодмац»). В США для криоконсервирования эритроцитов и тромбоцитов используют криоконсерванты, основой которых является глицерин и ДМСО соответственно. Аналогичная структура использования криоконсервантов сложилась в странах ЕС (табл. 10.2).

Криоконсерванты на основе непроникающих криопротекторов. Использование криоконсервантов для замораживания клеток крови, которые содержат ПВП м.м. 12 600 или ГЭК м.м. 250 кДа, запрещено из-за высокого токсического действия этих веществ. Криоконсервант для замораживания эритроцитов, содержащий ГЭК м.м. 200 кДа, не вызывает посттрансфузионных осложнений у реципиентов, но до настоящего времени в клинической практике не используется.

Криоконсерванты на основе криопротекторов смешанного действия. Данные криоконсерванты обладают высокой криопротекторной активностью при замораживании эритроцитов и тромбоцитов. При криоконсервировании тромбоцитов с ГМБТОЭМ была доказана их клиническая эффективность.

Криоконсерванты на основе комбинаций криопротекторов. Эти криоконсерванты были разработаны для замораживания эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов. Лучшим комбинированным криоконсервантом, позволяющим замораживать эритроциты при температуре -80°C, является раствор, содержащий комбинацию 10% 1,2-ПД и 37% ДМАЦ.

Таблица 10.2. Состав основных криоконсервантов для замораживания клеток крови человека

Компоненты	Эритроциты					Тромбоциты		Лейкоциты
	ЦНДИГПК 114	ЦНДИГПК 11 ₅ (55)	ЛьвНИИГПК	Криоконсер- вант на основе глицерина (США)	«Пропандио- сахароль»	«Тромбо- криодмац»	Криоконсервант на основе ДМСО	«Лейко- криодмац»
Глицерин	300,0 мл	570,0 мл	791,0 мл	57,0 г	-	-	-	-
Диметилсульфоксид	-	-	-	-	-	-	20,0 мл	-
1,2-пропандиол	-	-	-	-	370, 0 г	-	-	-
Диметилацетамид	-	-	-	-	-	50,0 г	-	200 мл
Манит	40,0 г	20,0 г	-	-	-	-	-	-
Натрия хлорид	7,0 г	4,0 г	-	-	6,0 г	-	1,0 г	-
Натрия фосфат двузамещенный	0,3 г	0,8 г*	-	30 мг**	-	-	-	-
Натрия фосфат однозамещенный	-	-	-	30 мг**	-	-	-	-
Динатриевая соль	-	-	3,0 г	-	-	-	-	4,0 г
Натрия лактат	-	-	-	1,6 г	-	-	-	-
Глюкоза	-	-	90,0 г	-	-	50,0 г	-	20, 0г
Сахароза безводная	-	-	-	-	32,0 г	-	-	-
Вода для инъекций	до 1000 мл	до 1000 мл	до 1000 мл	до 100 мл	до 1000 мл	до 1000 мл	до 100 мл	до 1000 мл
Способ охлаждения	до -196°C	до -80°C	до -40°C	до -80°C	до -196°C	до -196°C	до -196°C	до -196°C

* Натрия фосфат двузамещенный двенадцативодный;

** Натрия фосфат дву- и однозамещенный безводный

Положительный эффект при замораживании эритроцитов и тромбоцитов при температуре -196°C был получен при использовании в криоконсерванте сочетания проникающих и непроникающих крипротекторов, а также проникающих криопротекторов различной химической природы. Так, использование комбинированных растворов, содержащих 20% ПЭО (м.м.1500, 2000), декстраны (м.м. 3500, 10000) в сочетании с 5% ДМСО, 15% ОЭГ_{n=25} в сочетании с 15% ДМАЦ позволяет эффективно повышать осмотическую устойчивость размороженных эритроцитов. В качестве вспомогательных веществ криоконсерванты содержали фосфатно-солевой буфер, сахарозу и хлористый натрий. Использование комбинированных криоконсервантов для замораживания тромбоцитов показало, что такие криоконсерванты, как ДМАЦ/ОЭГ_{n=5}, ДМАЦ/1,2-ПД и ДМАЦ/глицерин, значительно повышают уровень сохранности размороженных тромбоцитов по сравнению с монокриоконсервантами.

Для замораживания лейкоцитов при температуре -80°C разработан комбинированный криоконсервант, содержащий в качестве криопротекторов 8% ГМБТОЭМ и 22% ДМСО, а в качестве вспомогательного вещества 0,2% сукцинат ГОМЭП. Этот криоконсервант позволяет эффективно сохранять клетки, но рекомендован для использования только в научных целях.

10.3. Криоконсерванты для замораживания спермиев животных

Общие требования. Криоконсерванты для половых продуктов животных являются более сложными и разнообразными по составу, чем криоконсерванты, используемые для клеток крови, что обусловлено морфофункциональными особенностями спермиев. Для сохранения биологической полноценности сперматозоидов в процессе их криоконсервирования криоконсерванты должны соответствовать следующим требованиям: иметь определенный химический состав для каждого типа спермиев, оптимальный уровень кислотно-основного равновесия, осмотического давления, ионной силы, поддерживать энергообеспечение, обеспечивать криопротекторную, антиоксидантную и антибактериальную защиту, проявлять комплексообразующую активность.

Типы криоконсервантов. По составу криоконсерванты бывают на основе проникающих криопротекторов и комбинированные криоконсерванты. Криоконсерванты только на основе непроникающих криопротекторов для замораживания спермиев животных не используются.

Составляющие криоконсервантов – криопротекторы и разбавители для спермы, содержащие дополнительные компоненты.

Криопротекторы, обладающие наиболее высокой криопротекторной активностью при замораживании спермиев и используемые в качестве основных при создании криоконсервантов, представлены в табл. 10.3.

Вспомогательные вещества из класса органических и неорганических солей щелочноземельных металлов, углеводов, карбоновых кислот,

Фосфотидилхолин	+	-	-	-	-	-	-	
Фосфатидил-этаноламин	+	-	-	-	-	-	-	-
Фосфотидил-инозитол	+	-	-	-	-	-	-	-
Лецитин	-	-	-	-	-	+	+	+
Желток куриного яйца	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Аминокислоты</i>								
Аланин	+	-	-	-	-	-	-	-
Аргинин	+	-	-	-	-	-	-	-
Валин	+	-	-	-	-	-	-	-
Аспаргиновая кислота	+	-	-	-	-	-	-	-
L-цистеин	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Белки</i>								
БАС	-	-	+	-	-	-	-	-
Казеин	-	+	-	-	-	-	-	-
Овомукоид	+	-	-	-	-	-	-	-
Яичный альбумин	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Неорганические и органические тиоловые соединения, фенолы, витамины, лекарственные препараты</i>								
Тиотриазолин	-	-	-	-	+	-	-	-
Коламин	-	-	+	-	-	-	-	-
(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) Метилендифосфоновая кислота	-	-	-	-	-	-	-	+
Ди-трет-бутил-крезол	-	-	+	-	-	-	-	-
SkQ1	-	-	+	-	-	-	-	-
Восстановленный глутатион	-	-	+	-	-	-	-	-
Бутилокситоулол	-	-	+	-	-	-	-	-
Эмоксиум	-	-	+	-	-	-	-	-
Яблочный пектин	-	-	+	-	-	-	-	-
Крезоцин	-	-	+	-	-	-	-	-
Сукцинат хитозона	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Антибиотики</i>								
Гентомицин	-	-	+	-	-	-	-	-
Стрептомицин	-	-	+	-	-	-	-	-
Спермосан	-	+	+	-	-	-	-	-
Полиген	-	-	+	-	-	-	-	-
Апраген	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Сыворотки</i>								
Кровь карася	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Антифризные белки</i>								
Пурифицированный гликопротеинантифриз TmAFP	-	-	-	-	-	-	+	-

Органические и неорганические соли щелочноземельных металлов, карбоновые кислоты, неорганические и органические буферные растворы используются для поддержания кислотно-основного равновесия, осмотического баланса, в качестве антикоагулянтов и антиоксидантов, обеспечения энергоснабжения.

Для обеспечения кислотно-основного равновесия в криоконсерванте для замораживания спермиев часто используют TES, TEST, TRIS и другие буферные растворы. Энергоснабжение некоторых видов спермиев осуществляют за счет включения в криоконсервант такой соли, как глутамат натрия.

Углеводы (моно- ди- и полисахариды) в составе криоконсервантов регулируют осмотическое давление во внеклеточной среде, стабилизируют белково-липидные комплексы клеточных мембран, поддерживают энергетический баланс.

Глюкоза, фруктоза, раффиноза, содержащиеся в криоконсерванте для замораживания сперматозоидов петухов, оказывает криозащитное действие и позволяют восстанавливать подвижность более 45% клеток после оттаивания. По степени положительного влияния на жизнеспособность сперматозоидов петуха моносахариды расположены в следующем порядке: глюкоза (фруктоза), раффиноза, а дисахариды – лактоза, сахароза, мальтоза, трегалоза.

Сахароза, лактоза, трегалоза и мальтоза способны проявлять криозащитную активность в отношении спермы некоторых видов животных без использования традиционных криопротекторов. При замораживании спермиев барана была обнаружена криопротекторная активность у сахарозы и лактозы, а при замораживании спермы быков в виде гранул – у лактозы и сахарозы. Использование в составе криоконсерванта трегалозы или сахарозы в концентрации 0,2 М также позволило успешно заморозить спермии быка при скоростях охлаждения 100-300°С/мин. При замораживании сперматозоидов быка высокая криопротекторная активность была обнаружена у глюкозы. Считают, что глюкоза поддерживает осмотический баланс в системе «клетка-криоконсервант».

Определенное криозащитное действие на сперму барана оказывают инулин, гликоген, крахмал, гуммиарабик. Так, криозащитный эффект гуммиарабика связывают с его способностью снижать точку эвтектики раствора и оказывать витрифицирующее действие.

Основным источником энергообеспечения спермиев рыб в составе криоконсерванта являются: глюкоза, фруктоза, лактоза и сахароза, а для спермиев собак – фруктоза. При замораживании спермиев псов в составе криоконсерванта использовали также трегалозу, что позволило увеличить морфофункциональную сохранность спермиев. Защитный эффект трегалозы связывают с ее способностью стабилизировать мембрану сперматозоидов собак.

Очищенные липиды, липопротеины, желток куриного яйца, белки и аминокислоты оказывают стабилизирующее влияние на мембрану спермиев.

Очищенные липиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфотидилинозитол) характеризуются высоким стабилизирующим действием и способствуют увеличению сохранности размороженных спермиев. Однако их использование в составе криоконсерванта экономически не выгодно.

Желток куриного яйца часто используют при приготовлении криоконсервантов для замораживания спермиев барана, петуха, рыб. Это обусловлено наличием в нем фосфолипидов и липопротеидов. Стабилизирующий эффект липидов желтка на мембрану спермиев связывают с повышением ее устойчивости к действию осмотического и температурного шока. Однако желток куриного яйца имеет существенные недостатки. Он термолабилен, что исключает возможность качественной стерилизации криоконсерванта, нестандартизирован по липидному составу, иммуноспецифичен и токсичен, поэтому требует обязательного удаления из клеточной суспензии перед осеменением. Кроме того, желток является носителем патогенной микрофлоры, следовательно, криоконсервант, содержащий его, может вызвать микробную контаминацию спермы.

Липопротеины из бобов сои, гомогената плодов облепихи, икры минтая и лосося обладают более слабым мембраностабилизирующим действием при замораживании спермиев, чем куриный желток. Вместе с тем в Институте животноводства НААН Украины было установлено, что липопротеиновая вытяжка из семян сои (растительный фортификант-2) в составе криоконсерванта на основе глицерина обеспечивает выживаемость спермиев быка на высоком уровне. При этом криоконсервант приобретает свойство термостабильности и способен переносить стерилизацию без потери защитных свойств.

В составе криоконсервантов для замораживания спермы петухов используют аминокислоты – аргинин и валин. Высокая эффективность аргинина может быть связана с тем, что при значении рН 6-8 положительно заряженные боковые цепи аргинина могут образовывать комплексы с отрицательно заряженной поверхностью клеточной мембраны гамет. Защитное действие валина может быть обусловлено тем, что он препятствует образованию крупных кристаллов льда за счет наличия в его молекуле гидрофобных боковых групп. При замораживании спермиев быка в составе криоконсерванта был обнаружен криозащитный эффект L-цистеина.

Белки являются эффективной заменой куриного желтка в криоконсерванте, кроме того, они могут обладать комплексообразующей активностью. Так, использование БАС в криоконсерванте в количестве 10-20 мг/мл повышает активность и выживаемость размороженных спермиев барана. Доказано снижение токсического действия ДМФА на сперматозоиды петуха при их гипотермическом хранении в присутствии овомукоида. Механизм стабилизирующего действия белковых добавок на мембрану

клеток объясняют их способностью, поддерживать конформационное состояние белково-липидных комплексов мембран.

Неорганические и органические тиоловые соединения, фенолы, витамины, лекарственные препараты в составе криоконсерванта способны защищать спермии от действия свободно-радикального окисления.

Синтетические антиоксиданты, такие как производные гидрохинонов, вторичных аминов и диаминов, 3-оксипиридинов являются перспективными веществами, которые способны повышать антиокислительную активность липидов мембран на этапах криоконсервирования спермиев. Механизм защитного действия этих соединений связывают с их способностью взаимодействовать с липидами мембран клеток и создавать условия для накопления клетками природных антиоксидантов.

При замораживании сперматозоидов псов в составе криоконсерванта использовали тиотриазолин в концентрации 4 мг/мл, что позволило увеличить их сохранность после отогрева.

При криоконсервации русского осетра использовали фенольные антиоксиданты. Наибольшим защитным действием обладает антиоксидант – фосфоросодержащий пространственно-затрудненный фенол в концентрации 0,1 мМ.

ИХФГАН-3, коламин, обновленный глутатион, ди-трет-бутил-крезол, бутилокситоулол, эхинохром предупреждают повреждения, обусловленные процессами ПОЛ, а также повышают устойчивость спермиев к холодовому шоку. Механизм защитного действия обновленного глутатиона связывают с его способностью образовывать комплекс с белками, благодаря которому свободные радикалы не могут повреждать клеточную мембрану.

Добавление митохондриального адресованного антиоксиданта SkQ1, в криоконсервант ЛХЦЖ способствует лучшей сохранности мембран, акросом и митохондрий в спермиях жеребцов и способствует росту их оплодотворяющей способности.

В криоконсервантах для замораживания спермы хряков использовали такие антиоксиданты как яблочный пектин, сукцинат хитозана, резоцин, эмоксиум. Лучшие показатели воспроизводства получены при использовании в криоконсерванте комплекса антиоксидантов хитозана и эмоксиума.

Антибиотики – препараты, оказывающие антибактериальный эффект на этапах криоконсервации спермиев: гентамицин, стрептомицин, спермицин, полиген, апраген и др.

Непроникающие криопротекторы, антифризные белки, сыворотки выполняют функцию модификаторов кристаллообразования льда.

Например, в составе криоконсерванта Lake в комбинации с глицерином используется ПВП с м.м. 10 000, что позволяет снизить повреждающее действие кристаллов льда на спермии. При замораживании спермы карпа в состав криоконсерванта вводили пурифицированный гликопротеинантифриз TmAFP, полученный из личинок большого мучного хрущака, который позволил увеличить выживаемость размороженных спермиев. Введение сыворотки зимней крови карася в состав криоконсерванта на основе

этиленгликоля улучшило его криопротекторную эффективность при замораживании спермиев белого амура.

Криоконсерванты на основе проникающих криопротекторов (табл. 2). В Украине и Российской Федерации для криоконсервирования спермиев быка регламентируют использование криоконсерванта ЛЖГ, а для спермиев барана разработаны криоконсерванты – ЛЖГТЦ, ЛФРМГЖ, ВИЖ. Сперму хряков и жеребцов замораживают под защитой криоконсервантов Трис-На-ЭДТА и ЛХЦЖ соответственно.

Спермии петуха наиболее часто замораживают под защитой криоконсерванта Lake, содержащий в своей основе криопротектор глицерин. Также для криоконсервирования спермиев был предложен эффективный криоконсервант на основе 1 М раствора ДМФА.

Криоконсервирование спермы псов осуществляют под защитой криоконсерванта на основе глицерина, его уникальный состав позволяет поддерживать на высоком уровне подвижность спермиев после оттаивания. Также для замораживания спермиев собак был предложен криоконсервант на основе ДМФА, который сохраняет высокую функциональную активность сперматозоидов и позволяет получить здоровое потомство при искусственном осеменении.

Для долгосрочного хранения спермиев быка был разработан эффективный криоконсервант на основе МЦ.

Криоконсерванты на основе комбинаций криопротекторов (табл. 10.4). Для криоконсервирования спермы птиц доказана эффективность использования криоконсервантов на основе смеси амидов и диолов. Применение таких комбинаций в криоконсерванте позволило снизить цитотоксическое действие криопротекторов и не удалять их из клеточной суспензии перед осеменением.

Низкотемпературное консервирование спермы рыб семейства карповых успешно проводят в криоконсерванте, содержащем комбинацию двух криопротекторов – этиленгликоля и метанола или этиленгликоля и половинилового спирта.

Высокая жизнеспособность спермиев баранов была получена при замораживании в ГЖУК-трис-буферном криоконсерванте с добавлением декстрина. Положительное действие декстрина связывают с его способностью повышать вязкость растворов, что может затруднять взаимодействие ионов многовалентных катионов с субстратами окисления в мембранах спермиев и способствовать ингибированию процессов ПОЛ.

Таблица 10.4. Комбинированные криоконсерванты для замораживания спермиев сельскохозяйственных животных

Вещество	Петух		Пес	Бык	Баран	Хряк	Жеребец	Рыба		
	Lake	Криоконсервант на основе ДМФА	Криоконсервант на основе глицерина	ЛЖГ	ЛФРМЖГ	Трис-Na-ЭДТА	ЛХЦЖ	Карп	Осетровые	Лососевые
Глицерин	13,64 г	-	8,0 г	5,0 г	5,0 г	4,0 г	3,5 г	-		
ДМФА	-	1 М	-	-	-	-	-	-		
ДМСО	-	-	-	-	-	-	-	-		
ЭГ		-	-	-	-	-	-	19,6 мл		
ПВП м.м. 10 000	0,30 г	-	-	-	-	-	-	-		
ПВС	-	-	-	-	-	-	-	0,005 г		
Сахароза	-	-	-	-	1,95 г	5,0 г	11,0 г	0,137 г		
Лактоза		3,0 г	-	11, 5 г	8,05 г	0,80 г	-	-		
Фруктоза	0,80 г	0,5 г	25,0 г	-	1,20 г	0,8 0г	-	-		
Глутамат натрия	1,92 г	2,2 г	-	-		-	-	-		
Натрий цитрат	-	-	-	-	-	0,30 г	0,089 г	-		
Калий хлористый	-	-	-	-	-	-	-	0,006 г		
Магний сернокислый 7-водный	-	-	-	-	0,01*	-	-	0,062 г		
Маннит	-	-	-	-	-	-	-	1,5 г		
Кальций хлористый 6-водный	-	-	-	-	-	-	-	0,018 г		
Натрий хлористый	-	-	-	-	-	-	-	0,420 г		

Трис-буфер	-	-	-	-	-	0,06 г	-	-		
Трис-оксимтил-аминометан	-	-	-	-	-	-	-	1,697 г		
Лимонная кислота	-	-	3,4 г	-	-	-	-	-		
Гуммиарабик	-	-	-	-	-	-	-	-		
Трилон Б	-	-	-	-	-	0,40 г	0,1 г	-		
Желток куриных яиц	-	-	20,0 г	20 мл	20,0 мл	5,0 мл	1,6 мл	12,0 мл		
Овумокоид	-	0,5 г								
Натрий двууглекислый	-	-	-		-		0,008 г	0,28 г		
Аммоний сернокислый	-	-	-	-	-	0,2 г	-	-		
Ацетат магния	0,08 г	-	-		-	-	-	-		
Ацетат калия	0,5 г	0,6 г	-	-	-	-	-	-		
TRIS			6,06 г	-	-	-	-			
Трицеллин			0,5 г	-	-	-	-			
ЭДТА			-	-	-	0,40 г	-			
Вода дистиллированная	до 100 мл	до 100 мл	184 г	до 100 мл	до 100 мл	до 100 мл	до 100 мл	до 100 мл		

*Магний сернокислый безводный

10.4. Кριοконсерванты для замораживания микроорганизмов

Общие требования к кριοконсервантам. Выбор компонентов кριοконсерванта для микроорганизмов в значительной степени зависит от их индивидуальных особенностей – видо- и штаммоспецифичности. Состав кριοконсервантов для микроорганизмов, как и для спермиев животных, является сложным и содержит значительное количество разнообразных вспомогательных компонентов, которые создают оптимальные условия для их роста, размножения и жизнедеятельности. Для обеспечения длительного и успешного хранения микроорганизмов в замороженном состоянии кριοконсерванты должны отвечать определенным стандартам: поддерживать энергетический метаболизм, оптимальный уровень кислотно-основного равновесия, окислительно-восстановительного потенциала и осмотического давления, иметь оптимальные физико-химические показатели (вязкость, плотность, прозрачность), а также быть стерильными. Значимость соблюдения этих условий подтверждает, например, корреляцию между криорезистентностью пивных и пекарских дрожжей *S* и кислотностью среды культивирования. Так, при pH 4,2 дрожжи росли быстрее, но их выживаемость после лиофилизации оказалась минимальной.

Типы кριοконсервантов. По составу кριοконсерванты могут быть на основе проникающих и непроникающих криопротекторов, комбинированные кριοконсерванты.

Составляющие кριοконсервантов – криопротекторы и вспомогательные компоненты, содержащиеся в питательной среде.

Криопротекторы, которые являются самыми эффективными для кριοконсервирования широкого круга микроорганизмов – ГЛ, ДМСО, декстран и сахароза.

Вспомогательные вещества из класса органических и неорганических солей щелочноземельных металлов, аминок- и карбоновых кислот, углеводов, многоатомных спиртов, белков, гликопротеинов, сложных субстратов, анионных ПАВ были исследованы в составе различных криоконсервантов для долгосрочного хранения микроорганизмов (табл. 10.5).

Выбор вспомогательных веществ основан на том, что они могут удовлетворять пищевые и энергетические потребности микроорганизмов, предотвращать изменения микроорганизмов, возникающие на разных этапах кριοконсервирования, а также способствовать их росту и размножению после отогрева.

Таблица 10.5. Криопротекторы и вспомогательные компоненты, использованные для разработки криоконсервантов микроорганизмов

Вещество	Микроорганизмы				
	Вирусы	Бактерии	Грибы	Водоросли	Простейшие
Криопротекторы					
<i>Проникающие</i>					
ДМСО	+	+	+	+	+
Глицерин	+	+	+	+	+
Метанол	-	+	+	+	+
ЭГ	-	+	+	+	+
Бутофосфан	+	-	-	-	-
<i>Непроникающие</i>					
ПВП	-	+	+	-	+
Декстран	+	+	+	+	+
ПЭГ	-	+	+	+	+
Вспомогательные компоненты					
<i>Моносахариды</i>					
Глюкоза	+	+	+	-	+
<i>Дисахариды</i>					
Сахароза	+	+	+	+	+
Лактоза	-	+	+	-	-
Мальтоза	-	-	-	+	+
Трегалоза	+	+	+	-	-
<i>Полисахариды</i>					
Фиколл	-	+	+	+	+
<i>Аминокислоты и карбоновые кислоты</i>					
Глутамат натрия	-	+	-	+	-
ЭДТА Na ₂	-	-	-	+	-
Лимонная кислота	-	+	-	-	-
<i>Протеины, пептиды, полипептиды и гликопротеины</i>					
САЧ	+	+	+	+	+
БАС	+	+	-	-	+
Дефибринированная кровь	-	+	-	-	+
Желатин	-	+	+	-	-
Пептон	+	+	+	+	+
<i>Сложные субстраты</i>					
Экстракт дрожжей	-	+	+	-	+
Экстракт солода	-	+	+	-	-
Обезжиренное молоко	+	+	+	+	+
Мясопептонный бульон					
<i>Многоатомные спирты</i>					
Сорбитол	+	-	+	+	+
<i>Анионные поверхностно-активные вещества</i>					
Твин 80	-	+	+	-	-
<i>Органические и неорганические соли щелочных и щелочноземельных металлов</i>					
Хлорид магния, кальция	+	+	-	-	-
Калий одно и дву-	-	+	-	-	-

замещенный					
Натрия хлорид	-	+	-	-	-
Цитрат натрия	-	+	-	-	-

Органические и неорганические соли щелочных и щелочноземельных металлов, карбоновые кислоты используются для поддержания кислотно-основного равновесия, окислительно-восстановительного потенциала, осмотического давления, а также энергетического метаболизма, т.е. они являются источником фосфора, серы и других микроэлементов.

Для коррекции окислительно-восстановительного потенциала криоконсервантов используют дихромат калия или другие окислители. Осмотическое давление в криоконсерванте часто регулируют с помощью введения хлористого натрия.

Углеводы являются лучшим источником углерода для большинства гетеротрофных микроорганизмов и оказывают криозащитный эффект.

Эффективность использования глюкозы, трегалозы и сахарозы была доказана при замораживании дрожжей, фагов, грибов. Некоторые штаммы грибов успешно были заморожены в криоконсерванте, содержащем 10% (1,41M) ДМСО в комбинации с 8% (0,46M) глюкозой. Наибольшей криозащитной эффективностью из всех углеводов обладает сахароза. Ее используют в составе криоконсервантов на основе глицерина и ДМСО. Показано, что использование криоконсерванта, содержащего 5% (0,7)M ДМСО и 5% (0,149M) сахарозу, увеличивает сохранность *S. Boulardii* в процессе криоконсервирования. Мальтоза является эффективной в составе криоконсерванта на основе глицерина при замораживании водоросли *Scenedesmus* spp. Сахароза и глюкоза были успешно использованы в составе криоконсервантов на основе глицерина при замораживании молочнокислых бактерий и культур дрожжей. Они позволили значительно увеличить жизнеспособность этих микроорганизмов в процессе хранения.

Аминокислоты и карбоновые кислоты в составе криоконсерванта выполняют функцию факторов роста, а также некоторые из них служат основным источником серы.

При замораживании *E.coli* было установлено, что ЭДТА регулирует проницаемость мембраны для ионов K^+ и Na^+ . Введение 1-5% глутамата натрия в криоконсервант на основе глицерина позволило повысить его криопротекторную эффективность при замораживании водорослей *Scenedesmus*, *Chlorella* и др.

Протеины, пептиды, полипептиды и гликопротеины поддерживают энергетический метаболизм и являются основными источниками углерода и азота.

Универсальным источником питательных веществ являются экстракты из белков животного и растительного происхождения, белковые гидролизаты. Для микробов с более сложными пищевыми потребностями в состав криоконсервантов включают БАС, САЧ, дефибринированную кровь.

В качестве криоконсерванта для замораживания вирусов и некоторых видов бактерий использовали сывороточный альбумин человека. Криопротекторная эффективность 0,5% САЧ при замораживании *L. interrogans* была выше, чем у 5% (ДМСО), но ниже, чем у 10% (1,1М) глицерина. Для замораживания *S. platensis* был разработан эффективный криоконсервант на основе ДМСО, содержащий 4% БСА. В состав криоконсервантов на основе ДМСО и глицерина при замораживании различных микроорганизмов была включена инактивированная сыворотка животных (собака, овца, теленок, курица) в концентрации 10-20%, что позволило повысить их сохранность после размораживания. Защитный эффект САЧ и сыворотки инактивированной крови, помимо криопротекторной активности, связывают со способностью снижать токсическое действие криопротекторов. Наиболее эффективным криопротектором при замораживании культуры лептоспир до -60°C является желатин. Однако для криоконсервации других микроорганизмов его рекомендуют применять в сочетании с ГЛ и ДМСО. Пептоны в концентрации 0,4-20% также проявляют криозащитную активность в процессе криоконсервирования различного вида микроорганизмов. Пептон вводят в состав криоконсервантов на основе глицерина при замораживании дрожжей *S. Cerevisiae* Л-1 и *Candida milleri* Чернореченский. Положительный эффект пептона в составе криоконсерванта был доказан при замораживании *Bifidobacterium bifidum* 791.

Сложные субстраты выполняют функцию энергообеспечения и обладают криопротекторной активностью.

В составе криоконсервантов на основе МПБ для замораживания плазмидных штаммов *Enterobacteriaceae* вводили ДМСО, глицерин, сыворотку крупного рогатого скота и сахарозу. Установлено, что сохранность плазмидных штаммов не зависела от состава криоконсерванта и была на уровне сохранности плазмид, замороженных только в МПБ. При лиофилизации *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 установлена эффективность введения вместо воды 5% обезжиренного молока в криоконсервант, содержащий 1% лактозу и 2% сахарозу.

Анионные поверхностно-активные вещества, в частности, твин-80 использовались в качестве диспергирующего агента в составе криоконсерванта, но его роль как криопротектора пока не ясна.

В некоторых работах показано, что использование твин-80 в криозащитных средах, например, на основе глицерина позволяет увеличивать жизнеспособность микроорганизмов.

Комбинированные криоконсерванты. Для замораживания дрожжей *Saccharomyces boulardii* был предложен криоконсервант, содержащий комбинацию 5% (0,7М) ДМСО с 5% (0,15М) сахарозой, а для криоконсервирования некоторых штаммов молочнокислых бактерий был разработан криоконсервант, содержащий 30% (3,5М) глицерина и 17% (0,53М) сахарозы. Для таких штаммов молочнокислых бактерий, как *L. acidophilus*, *Str. thermophilus*, *B. adolescentis* создан сложный криоконсервант

на основе фосфатного буфера, содержащий 20% (2,27М) глицерин, 20% (0,89М) лактозу, 5% желатин, 4% (0,48М) лимоннокислый натрий. Для замораживания и последующей лиофилизации *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 был разработан криоконсервант, который представляют собой комбинацию 2% (0,059М) сахарозы с 1% (0,045) лактозой и 5% обезжиренным молоком.

10.5. Криоконсерванты для замораживания различных тканей и органов

Общие требования к криоконсервантам. При замораживании тканей и органов наиболее важной и сложной задачей является выбор компонентов криоконсерванта и их количества. Это обусловлено тем, что строма клеток является плотной, а органы имеют крупные размеры, поэтому входящие в состав криоконсерванта криозащитные компоненты должны хорошо проникать сквозь строму, и распределяться в толщу органа по всему объему. Как и для других биологических объектов, состав криоконсерванта определяется типом ткани или органа. Следует отметить, что в данном разделе основное внимание будет уделено криоконсервантам для замораживания различных тканей, поскольку проблема разработки криоконсервантов для органов – наиболее трудная и сложная задача для криобиологии. Доктор Fahy G. в течение 20 лет работал над этой проблемой, но так и не смог заморозить орган, который был бы пригоден для трансплантации.

Состав криоконсервантов для низкотемпературного хранения тканей и органов довольно сложный и представляет собой сбалансированную среду, которая улучшает состояние физиологических и метаболических систем клеток на этапах их криоконсервирования.

Несмотря на трудности криоконсервации этих биологических объектов, особенно органов, можно выделить требования, которым должны отвечать криоконсерванты для их успешного замораживания. Криоконсерванты должны обеспечивать оптимальное осмотическое и онкотическое давление, уровень кислотно-основного равновесия, ионного гомеостаза, поддерживать энергетический баланс и ингибировать токсические метаболиты, содержать мембраностабилизирующие вещества, быть стерильными.

Типы криоконсервантов. По составу криоконсерванты могут быть на основе проникающих (моно- и бикриоконсерванты) и комбинированные криоконсерванты (бикомбинированные криоконсерванты проникающего и непроникающего действия). Во всех криоконсервантах может быть использовано необходимое количество вспомогательных компонентов

Составляющие криоконсервантов – криопротекторы и вспомогательные компоненты.

Криопротекторы, которые являются наиболее эффективными для криоконсервации тканей и органов, – ДМСО, 1,2-ПД, ДМАЦ, ПЭО-400.

Вспомогательные компоненты из класса органических и неорганических солей щелочных и щелочноземельных металлов, аминокислот, углеводов, многоатомных спиртов, белков, гликопротеинов, антибиотиков, а также сыворотки были исследованы в составе различных криоконсервантов для долгосрочного хранения тканей и органов. Следует отметить, что в качестве вспомогательных компонентов наиболее часто используются солевые среды и среды для культивирования.

В табл. 10.6 представлены некоторые криопротекторы и вспомогательные компоненты, используемые в составе криоконсервантов для замораживания тканей и органов.

Таблица 10.6. Криопротекторы и вспомогательные компоненты, использованные для разработки криоконсервантов тканей и органов

Вещество	Ткани				Органы	
	Кожа	Роговица	Эндокринная	Овариальная	Почка	Сердце
<i>Проникающие криопротекторы</i>						
ДМСО	+	+	+	+	+	+
Глицерин	+	+	+		+	+
1,2-ПД	-	-	-	+	-	-
ДМАЦ	-	+	-	-	-	+
ПЭО-400	+	+	+	+	-	-
ЭГ	-	-	-	-	-	+
<i>Непроникающие криопротекторы</i>						
ПВП м.м. 12600	+	+	+	-	+	-
ПЭО-1500	-	-	+	-	-	-
ГЭК	-	-	-	-	+	+
<i>Вспомогательные компоненты</i>						
<i>Сыворотки</i>						
ЭТС	-	-	+	+	-	-
ФТС	-	-	+	-	-	-
Сыворотка крови (аутологичная)	-	-	+	-	-	+
<i>Среды солевые и среды для культивирования</i>						
Среда Хенкса	-	-	+	-	-	-
Среда 199	-	-	+	-	-	-
Среда RPMI	-	-	+	-	-	+
Среда DMEM	-	-	-	+	-	-
<i>Белки</i>						
БАС	-	+	-	+	+	+
<i>Углеводы</i>						
Сахароза	-	+	+	+	-	-
Гепарин	-	-	-	-	-	+
Раффиноза	-	-	-	-	+	+
<i>Органические и неорганические соли щелочных и щелочноземельных металлов</i>						
Хлористый натрий	+	-	-	+	-	-

Йодид калия	-	-	+	-	-	-
<i>Антиоксиданты</i>						
Восстановленный глутатион	-	-	-	-	+	+
Аллопуринол	-	-	-	-	+	+

Органические и неорганические соли щелочных и щелочноземельных металлов, солевые среды, буферные растворы, непроникающие криопротекторы, трикарбоновые кислоты используются для поддержания кислотно-основного равновесия, регулирования мембранного потенциала и осмотического давления, являются источником микроэлементов.

В основном для поддержания pH в криоконсервантах для замораживания или гипотермического хранения тканей и органов используют калий или натриевый фосфатный буфер.

Углеводы в составе криоконсервантов являются лучшим источником энергообеспечения тканей и органов, а также оказывают криозащитный эффект.

Большинство криоконсервантов для замораживания тканей содержат такие углеводы, как сахароза и глюкоза, иногда включают в их состав мальтозу и фруктозу.

Белки выполняют комплексообразующую и транспортную функцию.

Наиболее часто в составе криоконсерванта используют альбумин.

Сыворотки в составе криоконсервантов служат источником витаминов, белков и аминокислот, обладают буферными свойствами.

Среды солевые и среды для культивирования обладают многофункциональным действием и могут заменить любой из отдельно взятых вышеперечисленных вспомогательных компонентов, поскольку содержат их в себе в сбалансированном количестве.

Антиоксиданты – вещества, защищающие ткани и органы от свободнорадикального окисления.

Для гипотермического хранения органов эффективными антиоксидантами являются аллопуринол, восстановленный глутатион, ретинол, токоферол, аскорбат. В процессе ГХ печени активную защиту от ПОЛ оказывает 10-(6-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний (SkQ₁).

Криоконсерванты на основе проникающих криопротекторов для замораживания тканей. На основе ДМСО разработано несколько криоконсервантов для замораживания кусочков щитовидной железы. В ИПКиК НАН Украины был разработан криоконсервант, содержащий ДМСО в сочетании со средой Хэнкса и стабилизатором биосинтеза тиреоидного гормона йодида калия. Также был разработан криоконсервант на основе 15% (2М) ДМСО с добавлением 25% ЭТС, который позволил получить 100% конфлюэнтность монослая размороженной культуры щитовидной железы новорожденных поросят при перенесении в среду культивирования. В Японии создали криоконсервант, содержащий 10% (1,4М) ДМСО в

сочетании с 10% ЭТС, который позволяет успешно замораживать фрагменты ткани щитовидной железы.

Для замораживания овариальной ткани был создан эффективный криоконсервант на основе криопротектора ПЭО-400. Этот криоконсервант позволяет хранить овариальную ткань в течение длительного времени без значительных изменений морфофункциональной целостности.

Для криоконсервирования клеток семенников (гормонпродуцирующих клеток Лейдига) наиболее эффективным является криоконсервант на основе 15% (2М) ДМСО. После размораживания сохраняется 75% клеток Лейдига, которые способны к базальной и ХГ-стимулированной секреции тестостерона.

Комбинированные криоконсерванты для замораживания тканей. Криоконсервирование щитовидной железы животных осуществляют под защитой комбинированного криоконсерванта, содержащего ПВП, ПЭО-400 и сахарозу.

Консерванты для гипотермического хранения органов. На современном этапе развития криобиологии ученым не удалось разработать такой криоконсервант, с помощью которого удалось бы успешно заморозить человеческие органы. Однако для сохранения функциональной полноценности человеческих органов (почки, сердце, печень, легкие, поджелудочная железа), предназначенных для трансплантации, существует классический метод – гипотермическое хранение при температуре 4°C в течение 4-16 ч.

Существующие консерванты для ГХ органов: Рингер-лактат, «Euro-Collins», «Custadiol», «UW», «Celsior». В ИПК и К НАН Украины на основе сахарозы была создана среда ССР для ГХ печени, сердца и почек. Однако ее клиническое применение лимитировано из-за присутствия в растворе БАС и Трис-HCl-буфера, которые обладают, соответственно, высокой иммуногенностью и цитотоксичностью.

Несмотря на все трудности криоконсервирования органов, для замораживания сердца крыс все-таки был создан криоконсервант на основе ДМАЦ, под защитой которого размороженное сердце сохраняет свою сократительную функцию.

Рекомендуемая литература:

1. Белоус А. М., ШрагоМ. И., Пушкаръ Н. С. Криоконсерванты.— Киев: Наук, думка, 1979.— 196 с.
2. Т.П. Линник, И.Н. Мартынюк Подходы к созданию криозащитных сред при криоконсервировании спермы птиц // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т.20, № 2. – С. 109-122.
3. Пахомова Ю.С. Криозащитные свойства растворов на основе непроникающего ОЭГn=25 в комбинации с проникающими криопротекторами при замораживании эритроцитов человека / Ю.С. Пахомова, В.В. Чеканова, А.М. Компаниец // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, № 1. – С. 26-39.

4. Петренко Ю.А. Криоконсервирование клеток эмбриональной печени человека с использованием ДМСО и высокомолекулярных полимеров / Ю.А. Петренко // Проблемы криобиологии. – 2003. – № 1. – С. 80-88.
5. G.B. Quan, L. Zhang, Y.Guo Intracellular sugars improve survival of human red blood cells cryopreservation at -80°C in the presence of polyvinylpyrrolidone and human serum albumin / G.B. Quan, L. Zhang, Y.Guo [et al.] // Cryo Letter. – 2008. – Vol. 28, № 2. – P. 95-108.
6. Lakey, J.R.T., Rajotte, R.V., Fedorow, C.A., and Taylor, M.J., Islet cryopreservation using intracellular preservation solutions, Cell Transplant.– 2001.–10.–P. 583–589.
7. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. Cryobiology.– 2017.–76.–P.74–91.

Глава 11. Криоконсервирование эритроцитов и костного мозга ЖИВОТНЫХ

11.1.Криоконсервирование эритроцитов млекопитающих. 11.1.1.Цель криоконсервирования. 11.1.2.Особенности структуры и функций. 11.1.3.Особенности строения мембран. 11.1.4.Форма эритроцитов. 11.1.5.Криоповреждения эритроцитов. 11.1.6.Криопротекторы. 11.1.7.Методы криоконсервирования эритроцитов животных. 11.1.7.1.Методы криоконсервирования эритроцитов животных на основе проникающих криопротекторов. 11.1.7.2.Методы криоконсервирования эритроцитов животных на основе непроникающих криопротекторов. 11.2.Криоконсервирование костного мозга. 11.2.1.Клеточный состав костного мозга. 11.2.2.Применение криоконсервированных ККМ в ветеринарии. 11.2.3.Методы криоконсервирования ККМ. 11.2.3.Получение и процедура замораживания клеток костного мозга. 11.2.3.2.Криоконсервирование ККМ под защитой глицерина. Защитные свойства глицерина. 11.2.3.3.Криоконсервирование ККМ под защитой ДМСО. 11.2.3.4.Криоконсервирование ККМ под защитой ПЭО-400. 11.2.3.5.Эффективность криопротекторов и чувствительность популяций клеток.

11.1. Криоконсервирование эритроцитов млекопитающих

11.1.1. Цель криоконсервирования

Криоконсервирование эритроцитов является технологией, позволяющей сохранять их длительное время *ex vivo* с сохранением биологических функций. В замороженном состоянии структура и функции гемоглобина, мембраны, энергетический потенциал клетки остаются практически неизменными в течение длительного времени. Необходимость криоконсервирования эритроцитов животных объясняется огромной клинической потребностью в переливании компонентов крови при различных заболеваниях. Часто возникает надобность в проведении гемотрансфузии при острой потере крови, различных анемиях, тромбоцитопении. Этот метод является также высокоэффективным способом интенсивной терапии, незаменимым при лечении тяжелых форм бабезиоза и ряда инфекционных заболеваний, таких как чума или инфекционный энтерит. Однако долгосрочное хранение эритроцитов животных является недостаточно разработанной технологией чем, например, замораживание эритроцитов человека. Развитие таких технологий дает возможность создать банк крови животных и всегда иметь запас криоконсервированных клеток разных пород животных и разных групп крови.

11.1.2. Особенности структуры и функций

Основную массу форменных элементов крови млекопитающих представляют красные кровяные тельца - эритроциты. В 1 мм³ насчитывается 4-8 миллионов клеток. Эритроциты — высокоспециализированные клетки, функцией которых является перенос кислорода из лёгких к тканям тела и транспорт диоксида углерода (СО₂) в обратном направлении.

Типичной формой эритроцитов большинства млекопитающих является форма равномерно закругленных двояковогнутых безъядерных пластинок (Рис.11.1). У верблюда, оленя и ламы эритроциты циркулирующей крови имеют овальную форму, а эритроциты птиц, кроме того, имеют ядро.

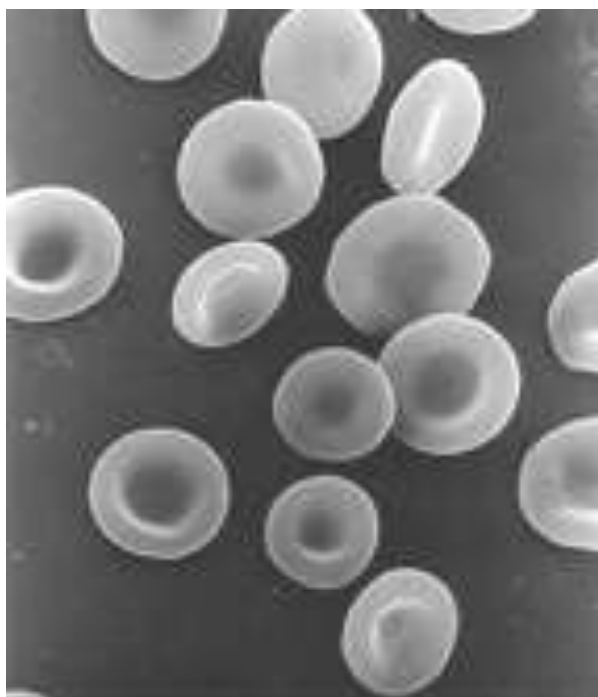


Рис.11.1. Эритроциты млекопитающих под сканирующим микроскопом.

В мазке крови на предметном стекле эритроциты часто имеют вид монетных столбиков, в которых каждый эритроцит наполовину прикрывает рядом с ним лежащий. Величина эритроцитов различных животных неодинакова (Табл.11.1).

Таблица 11.1. Величина диаметра эритроцитов некоторых животных (мкм)

Вид животного	Диаметр эритроцита (мкм)		
	Средний	Минимальный	Максимальный
Крупный рогатый скот	5,0	4,4	5,6
Овца	4,1	3,0	4,9
Лошадь	6,75	5,0	8,5
Свинья	7,2	4,2	10,2
Собака	6,2	4,2	8,2
Кошка	6,0	5,0	7,0
Человек	8,5	7,0	10,0

Эритроцит представляет собой клетку, в которой высокая специализация привела к изменениям структуры и метаболизма. У него отсутствуют ядро и другие органеллы. Синтетические процессы отсутствуют.

Энергия в виде АТФ вырабатывается в основном путем гликолиза, примерно 85 % глюкозы утилизируется через гликолиз и 15 % через пентозофосфатный путь. Глюкоза - главный и единственный субстрат энергетического обмена. Снабжение тканей всего организма кислородом обеспечивается наличием гемоглобина, которым полностью заполнена клетка. Гемоглобин способен транспортировать в 100 раз больше кислорода по сравнению с плазмой. Уникальная форма двояковогнутого диска является оптимальной для микроциркуляции эритроцита и обмена газов через мембрану (Рис.11.1).

Глюкоза является субстратом для гликолиза эритроцитов всех видов млекопитающих, кроме клеток свиней. Эритроциты свиней не способны утилизировать глюкозу, так как у них отсутствует белок-переносчик глюкозы. Для этого вида эритроцитов важным субстратом является инозит. Скорость превращения глюкозы у разных видов животных различна и составляет для эритроцитов человека 1,18 – 1,59; для собаки – 2,24-2,99; для лошади ~0,64; быка ~ 0,56 мкмоль/час/мл. В клетке глюкоза превращается в глюкозо-6-фосфат в гексокиназной реакции. Активность гексокиназы также видоспецифична и составляет для эритроцитов человека ~178; собаки ~14; лошади ~48,4; быка ~35,7 мкмоль/ мин/ 100г Нб. Глюкозо-6-фосфат метаболизируется в гликолизе или пентозофосфатном пути.

Эритроцит является единственной клеткой, содержащей значительное количество 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ). 2,3-ДФГ является главным физиологическим регулятором сродства гемоглобина к кислороду, он фактически обеспечивает выполнение эритроцитом своей основной функции. Эритроциты млекопитающих могут быть разделены на две группы. Одни из них содержат высокий уровень 2,3-ДФГ и имеют высокое сродство гемоглобина к кислороду (эритроциты человека, лошади, собаки, верблюда). Другие (эритроциты жвачных, жираф, кошек, гиен) имеют очень низкий уровень 2,3-ДФГ, что отражается в пониженном сродстве гемоглобина к кислороду.

Концентрация АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах различных животных видоспецифична. Содержание АТФ в эритроцитах человека - 90-150; лошади – 19 - 28; быка – 20 – 63; собаки – 40 - 61 мкмоль/100 г Нб. Концентрация 2,3-ДФГ составляет в эритроцитах человека – 400-630; лошади – 500 – 800; быка – 1.34; собаки – 500 - 800 мкмоль/100 г Нб.

Таким образом, очевидно, что, несмотря на большое сходство в принципах организации и функционирования, эритроциты разных видов млекопитающих имеют существенные особенности. Это обуславливает необходимость специального подхода в каждом случае для удачного криоконсервирования клеток крови определенных животных.

11.1.3. Особенности строения мембраны эритроцитов

В основе эритроцитарной мембраны лежит сложная структура, состоящая из множества разнородных компонентов, которые связаны между собой (Рис.11.2). В структурном отношении она представляет собой липидный бислой со встроенными в него белками и цитоскелетной сетью.

Основу мембраны составляют следующие классы химических соединений: липиды, углеводы и белки. Липиды в мембране представлены в виде двух фосфолипидных монослоев, где полярные головки липидных молекул направлены во вне- и внутриклеточную среду, а гидрофобные углеводородные цепи расположены внутри мембранного бислоя. В бислое липиды распределены асимметрично. Фосфатидилхолин и сфингомиелин, которые являются нейтральными молекулами, расположены, в основном, во внешнем монослое, а отрицательно заряженные молекулы фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и минорного фосфолипида фосфатидилинозита – во внутреннем монослое. Однако небольшая часть (около 20%) фосфатидилэтаноламина находится во внешнем бислое липидов. В эритроцитах млекопитающих наиболее широко представлен фосфатидилхолин из всех фосфолипидов мембраны. Фосфатидилхолин присутствует в следовых количествах в мембране эритроцитов быка, в то время как в эритроцитах собаки, лошади и человека содержится 46,9 %; 42,4 %; 29,3 %; соответственно. Особенностью эритроцитов жвачных является также то, что фосфатидилэтаноламин находится во внутреннем монослое мембраны. Эритроциты жвачных содержат высокий уровень сфингомиелина. По уменьшению содержания сфингомиелина во фракции фосфолипидов эритроцитарных мембран млекопитающих можно разместить в ряд: бык – 46,2 %; человек – 25,5 %; лошадь – 13,5 %; собака – 10,8 %. Хотя в ряду млекопитающих изменяется относительное содержание фосфатидилхолина и сфингомиелина, их суммарная доля (а, следовательно, отношение кислых фосфолипидов к нейтральным) остается приблизительно постоянной.

Оба монослоя мембраны красных кровяных телец содержат холестерин. Он обуславливает упаковку, динамичность липидных молекул, текучесть липидного бислоя. Холестерин в эритроцитах собаки составляет 29,5 %; лошади – 28,6 %; быка – 28,8 % от общего количества липидов. Общее молярное соотношение холестерина к фосфолипидам в эритроцитарной мембране составляет примерно 0,8 для человека, 0,92 для быка и лошади, и 0,96 для собаки.

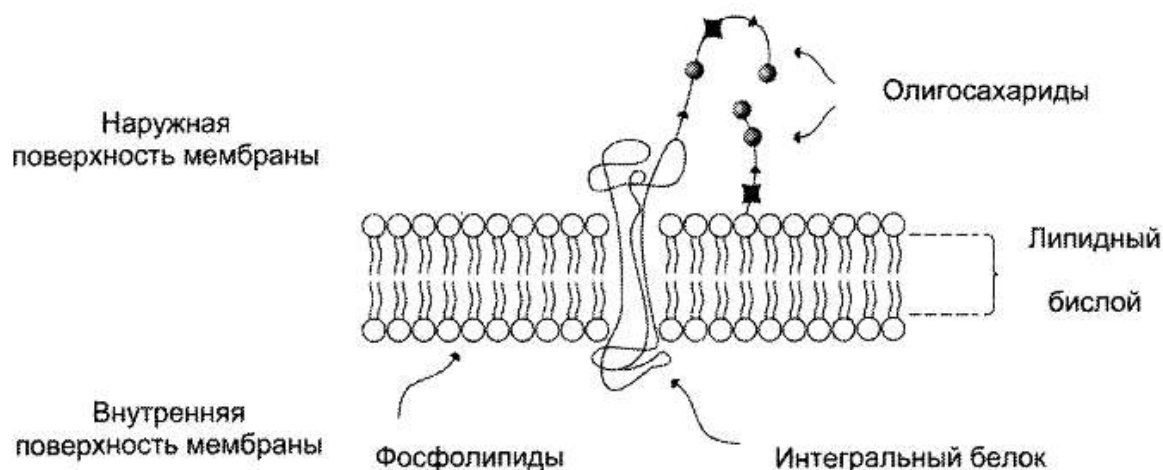


Рис. 11.2. Схема организации мембраны эритроцита

Помимо этого, в эритроцитах перечисленных животных наблюдают вариации по спектру и распределению жирных кислот, входящих в состав эфиров холестерина, триглицеридов и фосфолипидов, и фракции свободных жирных кислот (табл. 11.2). Степень ненасыщенности жирных кислот имеет наибольшее значение в эритроцитах лошади и уменьшается в ряду: лошадь $\longrightarrow$ собака $\longrightarrow$ бык $\longrightarrow$ человек, а индекс двойных связей имеет большее значение для эритроцитов человека. В эритроцитах лошади три жирных кислоты (C 16:0, C18:0, C18:1) найдены в равных количествах и составляют 72,17 % от общего количества, причем насыщенные жирные кислоты составляют 67,2%. Эритроциты собаки имеют низкое содержание C18:2 и высокое C20:4, и в отличие от клеток человека имеют низкое содержание C22:6. По представленным показателям можно судить о довольно высокой текучести мембраны, так как известно, что чем больше ненасыщенных жирных кислот, выше соотношение фосфотидилхолина к сфингомиелину и ниже содержание холестерина, тем значительно повышается текучесть мембраны, а значит и скорость диффузии гидрофильных молекул.

Таблица 11.2. Характеристика липидного состава мембран эритроцитов

Фракция	Лошадь	Бык	Собака	Человек
Ненасыщенные жирные кислоты (моль % от суммы жирных кислот и сфингозина)	62,4	49,4	51,2	45,6
Холестерин (% всех липидов мембраны)	28,6	28,8	29,5	30
Молярное соотношение холестерина к фосфолипидам	0,92	0,92	0,96	0,8
Молярное соотношение фосфотидилхолина к сфингомиелину	3,14	—	4,34	1,04
Индекс двойных связей для всех липидов мембраны	1,12	1,01	1,32	1,44

Класс углеводов представлен гликолипидами и гликопротеинами. Углеводные участки данных молекул, локализованные на наружной поверхности мембраны, ответственны за адгезивные свойства клеток, формируют гликокаликс. Многие из них являются специфическими рецепторами для связывания различных регуляторов, антител, вирусов. Наличие углеводных цепей в гликокаликсе определяет отрицательный заряд поверхности эритроцита.

Мембранные белки можно условно разделить на интегральные и периферические. Интегральные белки в той или иной мере погружены в липидный бислой. Для них характерно высокое содержание неполярных аминокислотных остатков, с помощью которых они удерживаются в мембране за счет сил гидрофобного взаимодействия с жирнокислотными

цепями фосфолипидного бислоя. Большая часть гидрофобных аминокислот в полипептидной цепи интегрального белка структурирована в форме α -спиральных участков, пронизывающих толщу липидного бислоя, часто неоднократно. Периферические белки, в отличие от интегральных, слабо связаны с мембранным матриксом и легко удаляются из него. Такие белки удерживаются в мембране относительно слабыми нековалентными связями (в основном электростатическими), не вступая с липидами в гидрофобные взаимодействия.

К цитоплазматической стороне мембраны прилегают особым образом организованные периферические белки, которые составляют цитоскелет эритроцита (Рис.11.3). Цитоскелет эритроцитов представляет белковую сетевую структуру, расположенную под клеточной мембраной. Он играет значительную роль в определении и поддержании формы эритроцитов, их деформируемости, определяет механические свойства мембраны. Мембранный скелет включает такие белки: 76 % спектрина, 5 % актина, 5 % белка полосы 4.1 (по массе) и небольшое количество других белков.

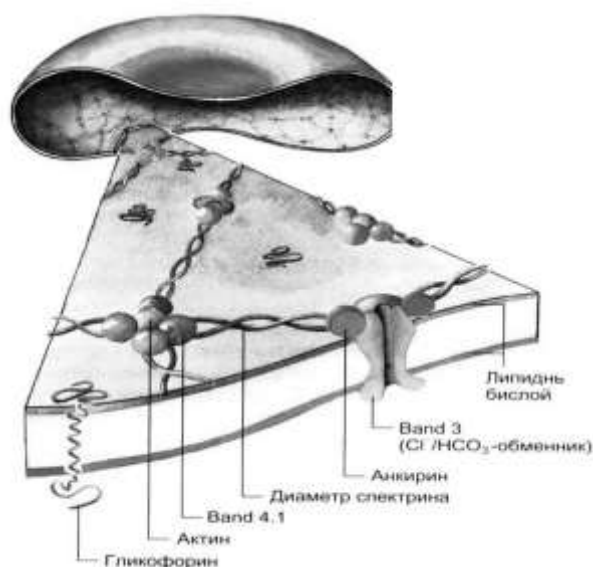


Рис. 11.3. Схема организации и белковый состав цитоскелета эритроцитов.

Цитоскелет соединяется с эритроцитарной мембраной при помощи двух типов «вертикальных» связей: первый включает спектрин, анкирин и белок полосы 3, второй – белок полосы 4.1, гликофорин С и спектрин/актин. Связь белок полосы 3 – анкирин – спектрин является определяющей для механической прочности мембраны (Рис.11.3).

Молекулярная масса, относительные размеры, аминокислотные последовательности мембранных цитоскелетных компонентов являются видоспецифичными, хотя в общем плане строения и функциях - сходны.

Анализ мембранных белков эритроцитов млекопитающих с помощью электрофореза показал некоторые различия. Главные мембранные белки, включающие полосы 1, 2, 3, и 5 эритроцитов коня, быка, собаки и человека имеют почти идентичные молекулярные массы. У эритроцитов человека, быка и собаки хорошо выражены две отдельные полосы 4.1 и 4.2, а в

эритроцитах лошади отсутствует белок полосы 4.2 в мембранах. Белок полосы 4.2 рассматривается как компонент системы стабилизации эритроцитарных мембран, и дефицит этого белка обычно характеризуется сфероцитозом и увеличенной “хрупкостью” мембраны. Эритроциты лошади, лишенные белка полосы 4.2, имеют высокую тенденцию к формированию эхиноцитов. Белок полосы 6 обнаружен в эритроцитах человека, но отсутствует в клетках лошади. В эритроцитах лошади в большем количестве присутствуют белки полосы 4.5 и 4.9. Таким образом, очевидно, что несмотря на единый принцип строения мембран и цитоскелета эритроцитов разных животных, они существенно могут отличаться особенностями молекулярной организации и свойств. Эти особенности требуют разработки специальных методов для криоконсервирования эритроцитов разных видов животных.

11.1.4. Форма эритроцитов

При циркуляции крови эритроциты, соприкасаясь друг с другом и стенками сосудов, могут принимать самые разнообразные формы и совершать амебоидное движение. В отсутствии внешних механических воздействий обычной формой является двояковогнутый диск, т.е. эритроциты являются *дискоцитами (нормоцитами)*. Если их отделить от плазмы, то в зависимости от среды и условий, в которые они переводятся, клетки способны принимать различные формы (Рис.11.4).

После инкубации эритроцитов в условиях, приводящих к снижению концентрации АТФ в клетках, наблюдается появление на них «шипов» в виде «тупых» конусов (кренирование клеток) и происходит общая трансформация из диска в сферу. Обычно на поверхности эритроцита образуется 20-30 распределенных случайным образом шипов, имеющих сходные размеры. Кренированные эритроциты называются *эхиноцитами*. Образование эхиноцитов наблюдается при ряде химических воздействий на дискоциты: в присутствии анионных детергентов, отрицательно заряженных анестетиков, при повышении рН среды. После перевода клеток в физиологические условия они восстанавливают форму диска. В присутствии положительно заряженных веществ, связывающихся с поверхностью мембраны (катионных детергентов, локальных анестетиков), или при понижении рН эритроциты принимают форму односторонне вогнутых дисков – *стоматоциты*. Эти изменения также обратимы. После длительного выдерживания эритроцитов в нефизиологических условиях происходит постепенная трансформация от эхиноцитов или стоматоцитов к сферической форме. *Сфероциты* представляют предгемолитическое состояние клеток, и через короткий промежуток времени наблюдается их гемолиз.

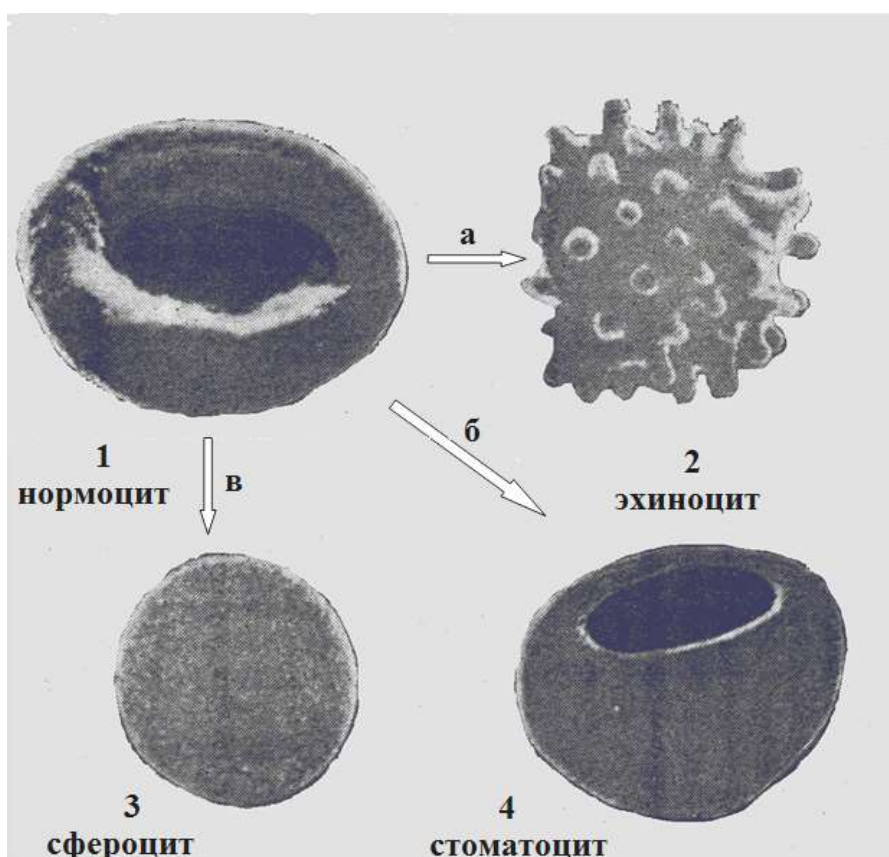


Рис. 11.4. Формы эритроцитов, появляющиеся после действия факторов криоконсервирования

Эритроциты млекопитающих, так же как и эритроциты человека, представляют собой клетки, характеризующиеся формой двояковогнутого диска. Диаметр, площадь поверхности и объем эритроцитов имеют видовые отличия. Размеры эритроцитов лошади и быка меньше, чем эритроцитов человека и составляют $\sim 5,5$ нм; $\sim 5,7$ - $5,8$ нм; $\sim 8,0$ нм, соответственно. Объем эритроцитов человека, собаки, быка и лошади составляет 90, 70, 50, 45 мкм^3 , соответственно, а площадь поверхности 98,4; 82,7; 60,7; 54,6 мкм^2 , соответственно. Число эритроцитов в единице объема крови у этих животных также варьирует. Если у человека в 1 мм^3 содержится примерно 5,0 млн. эритроцитов, то у собаки – 5,5 – 8 млн., у лошади – 6 - 9 млн., быка 5 – 7 млн. клеток. Большая общая поверхность эритроцитов, их поверхностно-объемное соотношение и своеобразная форма обеспечивают эффективное выполнение основной их функции – транспорт дыхательных газов. Постоянному и бесперебойному выполнению этой функции способствует своевременная замена и обновление старых, “износившихся” эритроцитов. Время жизни эритроцитов данных животных приблизительно сходно и составляет для быка 130 - 162; лошади 140 - 160; собаки 97 - 133; человека ~ 120 суток.

11.1.5. Криповреждения эритроцитов

Для успешной разработки методов криоконсервирования эритроцитов для клинических и исследовательских целей необходимо знать причины повреждений, возникающих при низкотемпературном воздействии, а также механизмы защиты клеток криопротекторами. В настоящее время для объяснения процессов, происходящих при замораживании эритроцитов, руководствуются двухфакторной теорией П. Мазура. Согласно этой теории, *при медленном охлаждении* происходит формирование внеклеточных кристаллов льда, и вода выходит из эритроцита, что приводит к уменьшению объема клетки. Эти физические процессы приводят к механическим повреждениям, нарушению проницаемости мембраны, потери воды и ионов. Дегидратация клеток приводит к увеличению концентрации веществ внутри клеток. В результате возникает повреждающее действие концентрированных растворов и внутриклеточный рост кристаллов льда. Вследствие дегидратации эритроцитов возникает их сморщивание (появляются эхиноциты). Степень повреждений при медленном замораживании зависит также от качественного состава раствора и свойств криоконсервирующей среды. Эритроциты могут поддерживать осмотическое равновесие до достижения минимального объема клеток, после чего происходят необратимые изменения в целостности мембраны.

. При *быстром замораживании* кристаллы льда формируются внеклеточно и концентрация внеклеточных растворов увеличивается намного быстрее, чем поток воды из клеток. При охлаждении цитоплазмы клетки ниже точки замерзания происходит формирование внутриклеточных кристаллов льда. Внутриклеточные кристаллы льда обуславливают разрушение эритроцитов. Помимо этого определённую негативную роль могут играть: перекристаллизация и рост кристаллов льда, осмотический стресс и рекристаллизация во время оттаивания.

Дегидратацию, увеличение концентрации растворов и повреждения мембраны при замораживании можно уменьшить, используя специальные условия охлаждения. В частности, это можно сделать путем подбора криопротекторов и их концентраций, способа их введения и инкубации, оптимальной скорости охлаждения. Эти мероприятия могут привести к минимальному повреждению клеток крови. Замораживание эритроцитов без криопротекторов приводит в полному гемолизу после размораживания. Использование криопротекторов не спасает при медленных скоростях замораживания, после отогрева гемолиз составляет 80-95%. При быстрых скоростях замораживания с использованием соответствующих криопротекторов уровень гемолиза существенно понижается и может составлять 15-20%.

11.1.6. Криопротекторы

Криопротекторы, используемые для криоконсервирования эритроцитов, по их химическому действию и проницаемости через мембрану

классифицируются на две группы: проникающие и непроникающие через мембрану внутрь клетки (см. главу 9).

Непроникающие криопротекторы – сахара, полимеры и крахмалы (полиэтиленгликоль – ПЭГ, гидроксипропилированный крахмал – ГЭК, поливинилпирролидон – ПВП). Эти вещества эффективны в миллимолярных концентрациях и обеспечивают защитный эффект с помощью дегидратации клеток перед замораживанием, тем самым снижают формирование внутриклеточных кристаллов льда, и при быстрых скоростях охлаждения клетки замерзают еще до достижения критического уровня увеличения растворов солей. Также они стабилизируют мембрану и поддерживают клетки в нормальном состоянии.

Проникающие криопротекторы – глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО) – проникают внутрь клетки. Они предотвращают уменьшение объема клеток и увеличение летальной концентрации электролитов, снижая температуру, при которой достигается критическая концентрация солей, т.е. они снижают точку заморзания раствора, что приводит к снижению количества кристаллов льда.

Глицерин является классическим криопротектором для эритроцитов человека, так как он нетоксичен даже при высоких концентрациях и быстро проникает в клетки при 37°C. Однако перед применением в клинической практике его, также как и ДМСО, нужно обязательно удалять из клеток для избегания внутрисосудистого гемолиза, что усложняет процедуру подготовки деконсервированных клеток к трансфузии.

11.1.7. Методы криоконсервирования эритроцитов животных

Методы криоконсервирования эритроцитов различаются по применению криопротекторов (проникающие и непроникающие), а также по скоростям охлаждения клеток. Поэтому условно делят методы криоконсервирования на основе проникающих и непроникающих криопротекторов, а также криопротекторов смешанного типа. В зависимости от концентрации криопротектора методы могут быть с использованием быстрого или медленного замораживания.

11.1.7.1. Методы криоконсервирования эритроцитов животных с проникающими криопротекторами

Первые работы по криоконсервированию эритроцитов животных были проведены в середине 20 века. Изучались криопротекторные свойства глицерола и диметилсульфоксида (ДМСО) в отношении эритроцитов быка. Показано, что глицерол не способен оказать защитного действия при низкотемпературном воздействии. Низкая сохранность клеток после замораживания под защитой глицерола коррелирует с низкой проницаемостью его в клетки. Скорость диффузии глицерола через мембрану зависит от состава жирных кислот (текучести мембран) и наличия специального водного канала – аквапорин 3 (AQ 3). Текучесть липидного бислоя выше в эритроцитах человека, поэтому и скорость диффузии

глицерола через их мембрану более высокая. Некоторые вещества проходят через клеточные мембраны со скоростью, значительно превышающей скорость диффузии через липидный бислой. Обеспечение и регуляция их переноса осуществляется водными каналами (аквапоринами), которые имеют избирательность к проходящим молекулам. Среди 13 известных аквапоринов (AQP) млекопитающих были выделены AQP3, AQP7, AQP9 и AQP10 как семейство акваглицеропоринов, способных к переносу глицерола. AQP3 идентифицирован как важный канал для транспорта глицерола в эритроцитах человека и крыс. Эритроциты мышей не имеют AQP3, но главным каналом для транспорта глицерола в этих клетках является AQP 9. Возможно, у других видов животных отсутствуют данные белковые каналы или они не являются акваглицеропоринами, что может обуславливать низкую проницаемость их мембран для молекул глицерола.

Показано, что 20%-й (2,27М) глицерин способен обеспечить приемлемый уровень защиты эритроцитов лошади при минус 150°C на протяжении 5 лет. Также показана сохранность (87%) эритроцитов макака с 40% (4,77М) глицерином при замораживании до минус 80 ° С. При использовании этого метода пострансфузионная выживаемость в течение 24 часов составляет 85%, а продолжительность жизни деконсервированных эритроцитов - 13 дней.

Глицерин также эффективен для эритроцитов собак при использовании его в 40 % (4,77М) концентрации и замораживании до минус 80°C. Оценка морфо-функциональных показателей таких эритроцитов свидетельствует о том, что основные функциональные параметры – уровень 2,3-ДФГ и АТФ сразу после размораживания не отличаются от контроля, а форма клеток представлена нормальными дискоцитами. Однако при использовании этого метода требуется высокая концентрация криопротектора (40 %), что влечет за собой более сложную многоступенчатую процедуру добавления криопротектора перед замораживанием и удаления криопротектора из клеток перед проведением трансфузии. Применение такого подхода резонно в экспериментальных условиях, однако экономически и технически малоэффективно в условиях криобанка. Известно, что глицерин в концентрации 5 – 20 % (0,55М – 2,27М) не способен обеспечить защиту эритроцитов лошади и собаки при быстром замораживании до минус 196°C.

Высокая сохранность эритроцитов собаки, лошади, быка при воздействии низкотемпературных факторов достигается с использованием 20% (2,8М) ДМСО. При этом кратковременная инкубация в растворе криопротектора до замораживания сохраняет больший процент целых клеток. Эритроциты, замороженные с ДМСО до минус 196°, сохраняют 80 % сохранность клеток, высокую устойчивость в физиологических условиях с поддержанием нормальной осмотической хрупкости. Однако возможно проявление токсического действия ДМСО, поэтому нужно обязательно удалять криопротектор перед трансфузией.

Применение проникающих криопротекторов создает определенные технологические проблемы при использовании в практике криобанков. Их

осмотическая активность и токсичность обуславливает необходимость удаления перед перенесением в изотонические условия в целях предотвращения лизиса клеток. В связи с этим активно разрабатываются безотмывочные технологии — изучаются различные соединения на их пригодность в качестве непроникающих криопротекторов.

11.1.7.2. Методы криоконсервирования эритроцитов на основе непроникающих криопротекторов

Непроникающие криопротекторы в силу малой токсичности в небольших количествах могут быть внесены в кровеносное русло реципиента в процессе трансфузии деконсервированной крови. В качестве таких криопротекторов чаще используют гидроксипропиловый крахмал (ГЭК) и полиэтиленгликоль м.м. 1500 (ПЭГ-1500).

Гидроксипропиловый крахмал (ГЭК) м.м. 200 применяют для защиты эритроцитов собак от низкотемпературных повреждений в концентрации 25 – 35 %. Замораживание осуществляют погружением контейнеров с кровью в жидкий азот (минус 196 °С). При этом после размораживания остается до 80% сохранных клеток. Для эритроцитов кур также показана высокая выживаемость клеток после криоконсервирования с ГЭК в концентрации 15 – 25 %.

При использовании ПЭГ-1500 в качестве криопротектора для замораживания эритроцитов лошади, быка и собаки достигается высокая сохранность клеток. Криопротектор добавляют постепенно в течение 40 минут в условиях холодной камеры. Выживаемость клеток при этом составляет до 97%. Однако показано значительное нарушение их механических свойств — они становятся более хрупкими и менее эластичными.

11.2. Криоконсервирование костного мозга

11.2.1. Клеточный состав костного мозга

Гемопоетическая популяция клеток костного мозга (ККМ) представляет собой совокупность разнообразных клеток (Рис. 11.5). Стабильность этой системы обеспечивается постоянной, строго регулируемой дифференцировкой клеток. Выделяют пять классов клеток системы гемопоэза. Первый класс стволовых клеток является гетерогенной клеточной популяцией, в которую входят различные по пролиферативному потенциалу стволовые кроветворные клетки (СКК). Второй класс — ближайшие потомки родоначальных клеток — это полипотентные и бипотентные (коммитированные) клетки-предшественники, обладающие более низким дифференцировочным потенциалом. Полипотентные клетки способны дифференцироваться в нескольких направлениях. Регуляция пролиферации и дифференциации на этом этапе кроветворения осуществляется гемопоэтическими факторами роста или колониестимулирующими факторами. Третий класс — унипотентные клетки-

предшественники, дифференцирующиеся только в определенном направлении. Клетки первых трех классов морфологически неразличимы. Четвертый и пятый классы — это классы морфологически распознаваемых клеток — созревающих и зрелых.

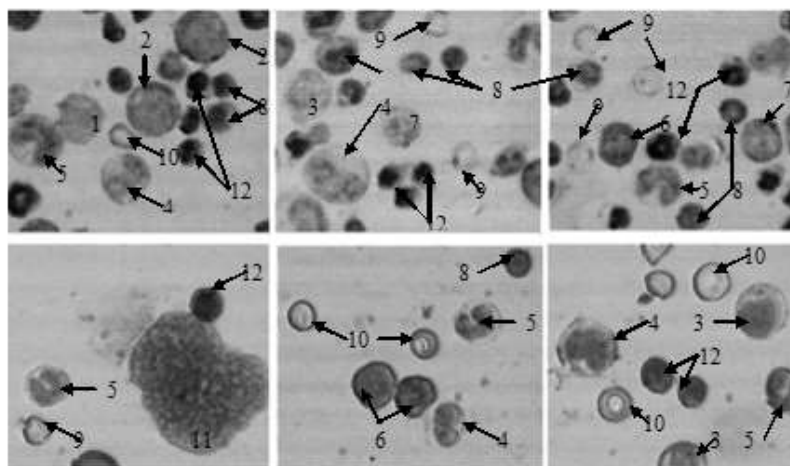


Рис. 11.5. Свежевыделенный КМ собак. 1 - миелобласт, 2 - промиелоцит, 3 - миелоцит, 4 - метамиелоцит, 5 - палочкоядерный гранулоцит, 6 - пронормоцит, 7 - нормоцит базофильный, 8 - нормоцит полихроматофильный, 9 - нормоцит оксифильный, 10 - эритроцит, 11 - мегакариоцит, 12 - лимфоцит. Окраска азур II-эозин по Романовскому-Гимза, $\times 250$.

Известно, что все типы клеток костного мозга происходят из СКК, которые характеризуются способностью к дифференцировке во все виды. К стволовым клеткам (СК) относятся клетки, обладающие, по крайней мере, тремя основными свойствами: способностью делиться и самоподдерживаться в течение жизни всего многоклеточного организма, способностью к превращению в специализированные типы клеток, т. е. в дифференцированные, а также чувствительные к типу регуляции, характерному для данного класса СК (за счет которой обеспечивается поддержание их общего числа в организме на стабильном уровне).

СКК не имеют характерных морфологических признаков и по строению похожи на малые лимфоциты. Их количество может варьировать и зависит от различных факторов. Их можно выделить из гетерогенной популяции ККМ, но зачастую они трансплантируются вместе с другими клетками костного мозга, однако являются наиболее ценным источником, восстанавливающим кроветворение.

В процессе дифференциации у СКК снижается выраженность свойств, характерных для стволовых элементов, и приобретаются свойства, присущие следующему классу клеток, стоящему в цепи развития за ними, т. е. с каждым делением морфологически нераспознаваемых клеток-предшественников в них все четче проявляется дифференцировка. СКК сохраняют высокий, чувствительный к регуляции пролиферативный потенциал, в результате чего количество их делений и число их потомков

зависит от запроса организма. Такая регуляция основана на функционировании специальной системы биологически активных веществ, каждое из которых стимулирует образование из клеток-предшественников только одного вида специализированных клеток (эритропоэтин, лейкопоэтин, тромбопоэтин, лимфопоэтин). Выделение этих биологически активных веществ, в свою очередь, обусловлено потребностью организма в клетках определенного типа. Этот вид регуляции является дистантным и захватывает все имеющиеся в организме млекопитающего участки кроветворения.

11.2.2. Применение криоконсервированных ККМ в ветеринарии

До некоторых пор в ветеринарной практике отсутствовала необходимость в долгосрочном хранении гемопоэтических клеток, так как не было разработано эффективных способов лечения животных с различными нарушениями гемопоэза путем трансплантации.

В настоящее время трансплантация костного мозга применяется для восстановления дефицита иммунной системы и коррекции гомеостаза организма после химио- и радиотерапии онкологических, а также терапии различных заболеваний кроветворной системы животных. Это обуславливает создание резерва клеток костного мозга животных. Данная задача может быть решена с помощью криоконсервирования.

Направление криобиологии по изучению действия криоконсервирования на ККМ домашних животных находится на начальной стадии разработки. Применение в ветеринарии методик, разработанных для ККМ человека невозможно, так как костный мозг животных имеет свои морфо-функциональные особенности (характеристики миелограмм, антигенный состав, биохимические параметры), определяющиеся продолжительностью жизни животного, породной принадлежностью и др., а это во многом определяет специфичность их реакции на действие факторов криоконсервирования.

11.2.3. Методы криоконсервирования ККМ

Криоконсервирование гетерогенных популяций, таких как суспензия костного мозга, имеет ряд сложностей, так как условия, оптимальные для одних клеток, могут оказаться неподходящими для других. В таких случаях необходимо ориентироваться на сохранение того типа клеток, который является наиболее ценным в трансплантируемом материале.

Процесс замораживания-отогрева без криопротектора оказывается очень неблагоприятным для клеток костного мозга собак. После указанного воздействия сохраняется только 6% клеток (Рис.11.6). Это обуславливает применение криопротекторов для замораживания.

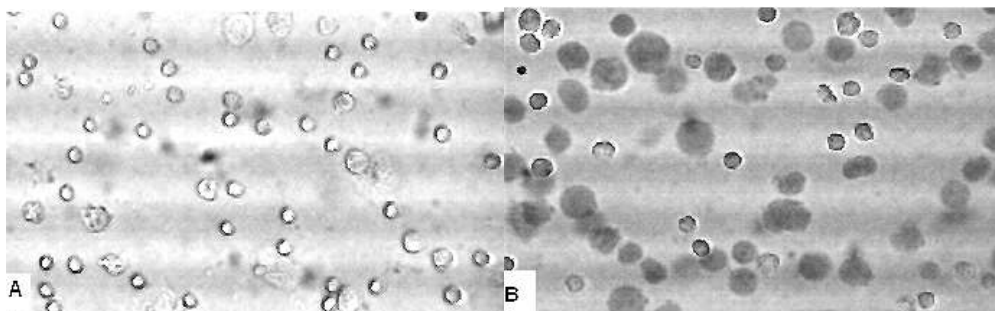


Рис.11.6.Сохранность клеток костного мозга собак. *А – в свежеполученной суспензии клеток, В – в суспензии после замораживания-отогрева без криозащиты. Оценка сохранности ККМ путем прижизненной окраски трипановым синим. Поврежденные клетки окрашиваются в синий цвет, жизнеспособные (сохраненные) клетки неокрашены.*

Для сохранения КМ важен состав криоконсерванта. В общем виде он может быть представлен как система, в которую входят различные компоненты, применяемые при заготовке биоматериала, обеспечивающие осмотические соотношения, нормализующие метаболизм и проницаемость мембран, а также криопротектор, от которого главным образом зависит эффект криозащиты.

В настоящее время насчитываются десятки химических соединений различных классов, которые по-разному действуют на клетку. Среди них наиболее выраженными криозащитными свойствами обладают полиэтиленоксиды, пропиленгликоль, этиленгликоль, глицерин, диметилсульфоксид и др.

По способности криозащитных соединений проникать внутрь клетки все известные криопротекторы делятся на экзо- и эндоцеллюлярные (непроникающие и проникающие). Обе группы криопротекторов имеют свои преимущества и недостатки, но провести сравнительную оценку различных криопротекторов чрезвычайно сложно, так как условия криоконсервирования не стандартны.

В настоящее время продолжают разработки, направленные на поиск оптимального криопротектора для низкотемпературного консервирования КМ. В частности, достаточно хорошими защитными свойствами для криоконсервирования КМ обладают ДМСО, глицерин, ПЭО-400 и др.

11.2.3.1. Получение и процедура замораживания клеток костного мозга

Получение КМ у собак проводят путем введения в бедренную кость двух игл, соединенных со шприцами (рис.11.7).

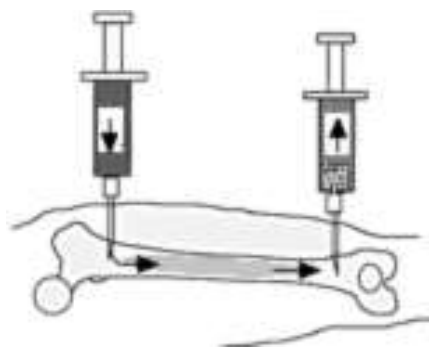


Рис. 11. 7. Схема получения клеток костного мозга. Шприц №1 содержит 199 среду, шприц №2 содержит сложнocomпонентный раствор (199 среды, эмбриональной телячьей сыворотки крови, раствора цитрата натрия). Среда 199 мягко вводится через шприц №1 в полость кости, вымывая клетки костного мозга в шприц №2.

Маточные растворы криопротекторов готовят на 0,9 % NaCl на фосфатном буфере 0,1 М (рН 7,4). Инкубация клеток с растворами ДМСО проводится в течение 10 минут, с ПЭО - 400 и глицерином – 30 минут при 4°C. Замораживание КМ проводят в стандартных пластиковых контейнерах объемом 1,5 мл, двухступенчато: первый этап - погружение в пары азота (минус 80°C, температура контролируется термopарой), второй этап – погружение в жидкий азот (минус 196°C). Размораживание проб производят на водяной бане при 41°C в течение 1 - 3 минут.

Удаление криопротектора из суспензии проводят с помощью рабочей среды, добавленной в 5-10 кратном объеме к суспензии. Затем суспензию клеток центрифугируют при 4°C, при 900g. Надосадочную жидкость удаляют. Клетки ресуспензируют в 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки крови.

11.2.3.2. Криоконсервирование ККМ под защитой глицерина. Защитные свойства глицерина

Глицерин модифицирует структуру воды и способен стабилизировать мембрану, что защищает внутриклеточные структуры от повреждающего действия «эффекта раствора» и кристаллов льда. Проникая в клетки, он разбавляет солевые растворы и создает благоприятные условия для воссоздания осмотического равновесия.

Для криоконсервирования ККМ глицерин применяют в 20-30% (2,27М – 3,5М) концентрации, их инкубируют в течение 30 мин. при 4°C. Криопротектор сам по себе не оказывает повреждающего действия на клетки. Далее замораживают путем погружения пробирок с суспензией клеток в жидкий азот. Однако глицерин не дает достаточно высокого уровня защиты клеток костного мозга собак при криоконсервировании. Сохранность клеток составляет примерно 50%.

11.2.3.3. Криоконсервирование ККМ под защитой ДМСО

Высокая защитная эффективность ДМСО способствует широкому использованию этого криопротектора для консервирования разнообразных биологических объектов. Это соединение изменяет физическое состояние воды, растворимость солей и органических растворителей, обладает противоишемическим и антиоксидантным свойствами, что повышает устойчивость клеток к повреждающему действию.

В практике используют невысокие концентрации ДМСО (7-10%, 0,9М – 1,4М), так как, обладая высокими криопротекторными свойствами, это вещество, в более высоких концентрациях, неблагоприятно действует на клетки. Например, известно, что ДМСО в концентрации выше ~ 8% (1 М) обладает токсическими свойствами для клеток. Кроме того, для уменьшения его токсического действия в среду консервирования вводят дополнительные компоненты.

При инкубации ККМ с ДМСО температура 4 °С более благоприятна для клеток, чем комнатная. При этом эквilibрация КМ с растворами ДМСО происходит в первые 10 минут инкубации. В последующие сроки скорость проникновения резко снижается. ДМСО в 7%, 10% концентрации обеспечил сохранность до 80% всех видов клеток костного мозга собак после замораживания-отогрева.

Хотя проникающие криопротекторы обеспечивают достаточно высокую защиту клеточных структур по сравнению с непроникающими, они имеют недостаток в том, что их необходимо удалять из клеток после отогрева, поскольку при трансплантации клеток, содержащих внутри ДМСО или глицерин, возможно поражение почек реципиента. Процесс удаления таких криопротекторов из клеток приводит к дополнительному повреждению клеточных мембран и внутриклеточных структур. Поэтому перспективным направлением в разработке методов криоконсервирования ККМ является разработка безотмывочных методов криоконсервирования с использованием непроникающих криопротекторов.

11.2.3.4. Криоконсервирование ККМ под защитой ПЭО-400

Эффективными криопротекторами, не требующими удаления из размороженных клеточных взвесей и не вызывающими значительного осмотического дисбаланса при трансплантации, являются полиэтиленоксиды. При их использовании упрощается техника трансплантации и исключается дополнительная потеря клеток в процессе отмывания. Проведенные исследования криопротекторных свойств ПЭО различной молекулярной массы показали, что выраженный криозащитный эффект для КМ проявляется у ПЭО-400. Этот криопротектор способен сохранять структуры биополимеров мембран в процессе замораживания-отогрева, а также изменять характер кристаллизации водного раствора с образованием аморфного льда. Он связывает ионы и соли в растворе, повышает вязкость среды при охлаждении, что препятствует изменению ее pH и действию «эффекта раствора». По криопротекторным свойствам ПЭО-400 в 15% (0,42М)

конечной концентрации обеспечивает морфологическую и функциональную сохранность 80 - 85% клеток костного мозга.

11.2.3.5. Эффективность криопротекторов и чувствительность популяций клеток

При исследовании различных концентраций криопротекторов и влияния низкотемпературного консервирования на сохранность, морфологические и биохимические показатели ККМ собак было установлено, что после замораживания-отогрева костного мозга собак без криопротекторов сохраняется незначительное количество бластов, лимфоцитов и гранулоцитов, что составляет менее 6% от показателей натива. ДМСО в 7% (0.9М), 10% (1.4М) концентрации и ПЭО-400 в 10% (0.28М) и 15% (0.42М) концентрации обеспечили сохранность до 80% всех видов клеток костного мозга собак после замораживания-отогрева. Глицерин дает недостаточно высокий уровень защиты клеток костного мозга собак при криоконсервировании, что составляет от 50% до 60% от показателей контроля. Наиболее устойчивыми к криоконсервированию, в присутствии криопротекторов (ДМСО, ПЭО-400, глицерин), являются клетки костного мозга, находящиеся на ранних стадиях развития. Наиболее чувствительны - зрелые клетки, а из них гранулоциты и мегакариоциты. Замораживание-отгрев клеток костного мозга собак приводит к снижению уровня фосфолипидов мембран. Использование криопротектора ДМСО препятствует этим изменениям и сохраняет показатели на уровне контроля, ПЭО-400 и глицерин были менее эффективны. Замораживание-отгрев без криопротектора приводит к снижению энергетических субстратов в клетках костного мозга собак. Криоконсервирование клеток с ДМСО в 7% (0.9М) концентрации позволяет сохранить запас гликогена, уровень АТФ, Г-6-Ф и ПВК на уровне контроля.

Рекомендуемая литература:

1. Денисова О.Н. Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля, глицерина / О.Н. Денисова, Г.Ф. Жегунов, Л.А. Бабийчук // Проблемы криобиологии. — 2005. — № 2. — С.195-201.
2. Exploring the Possibility of Cryopreservation of Feline and Canine Erythrocytes by Rapid Freezing with Penetrating and Non-Penetrating Cryoprotectants / [D. Pogozhykh, Y. Pakhomova, O. Pervushina, G. Zhegunov] // PLoS One. — 2017. — С.1-2. — Режим доступа: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169689>
3. Scott K.L. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future / K.L. Scott, J. Lecak, J. Acker // Transfusion Medicine Reviews. — 2005. — Vol. 19, № 2. — С.127-142. — Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887796304000811?via%3Dihub>

4. Kaneko J. Clinical biochemistry of domestic animals / J. Kaneko, J. Harvey, M. Bruss. — New York: Academic Press.— 1997. — 932 с.
5. Жегунов Г.Ф. Проницаемость эритроцитов млекопитающих для молекул глицерина и ДМСО и степень сохранности после замораживания-оттаивания / Г.Ф. Жегунов, О. Н. Денисова // Доповіді національної академії наук України, 2010. - № 12. – С. 139-143.
6. A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation / [H. Kim , S. Tanaka , S. Une та ін.] // J. Vet. Med. Sci. — 2004. — № 66. — С.1543-1547. — Режим доступа: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/66/12/66_12_1543/article
7. Comparison of the effects of glycerol, dimethyl sulfoxide, and hydroxyethyl starch solutions for cryopreservation of avian red blood cells. / J. Graham , D.M. Meola , N.R. Kini, N.M. Hoffman // Am J Vet Res.. — 2015. — № 76 (6). — С.487-493. — Режим доступа: https://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.76.6.487?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed

Глава 12. Криоконсервирование половых клеток и эмбрионов животных

12.1.Криоконсервирование спермиев. 12.1.1.Криоконсервирование спермиев млекопитающих 12.1.2.Криоконсервирование спермы птиц 12.1.3. Криоконсервирование спермы рыб. 12.2.Криоконсервирование ооцитов. 12.2.1. Криоконсервирование ооцитов млекопитающих. 12.2.2. Криоконсервирование ооцитов рыб, птиц и земноводных. 12.3.Криоконсервирование эмбрионов. 12.3.1.Криоконсервирование эмбрионов млекопитающих. 12.3.2.Криоконсервирование эмбрионов рыб и птиц

Животный мир нашей планеты очень разнообразен и насчитывает примерно 1,6 миллионов видов. Несмотря на это, многие редкие виды находятся на грани исчезновения. На сегодняшний день в международную Красную книгу занесено более 1000 видов животных. Способом сохранения исчезающих видов животных является создание заповедников и заказников, широкое задействие природоохранных мероприятий. В последнее время все большее значение приобретают методы криоконсервирования половых клеток и эмбрионов для сохранения генетического разнообразия, экологически и экономически важных видов диких, домашних и сельскохозяйственных животных. Криоконсервирование половых клеток также имеет большое значение для разведения и селекции домашних и сельскохозяйственных животных.

12.1. Криоконсервирование спермиев

Технология замораживания спермиев – одна из наиболее разработанных. Успешные эксперименты И. В. Смирнова по глубокому замораживанию спермиев кролей, баранов, быков в 1947-1950г.г. с использованием жидкого кислорода, а позже жидкого азота создали предпосылки для создания промышленных технологий криоконсервирования половых клеток для широкого применения в животноводстве. Первое в мире рождение живых ягнят, а затем телят после искусственного осеменения спермой, хранившейся при температурах сжиженных газов, осуществлено этим ученым в Институте животноводства НААН Украины, г. Харьков.

В настоящее время метод разработан для млекопитающих (более 80 видов), птиц (более 10 видов), рептилий, амфибий, рыб и некоторых беспозвоночных - иглокожих, моллюсков, ракообразных. Наибольшее практическое применение метод имеет при разведении крупного рогатого скота, лошадей, овец, коз, кролей, кур, индеек, уток, гусей, ряда видов промысловых рыб. Активно совершенствуется метод криоконсервирования спермы хряков, что в случае успеха позволит широко применять его в свиноводстве.

Для спермиев каждого из видов животных существуют свои оригинальные методы замораживания. При этом могут варьировать скорости охлаждения, рецептуры криозащитных сред, способы размораживания, но во многих случаях этапы криоконсервирования для всех видов подобны.

Для успешного криоконсервирования спермы необходимо выбрать:

- 1) оптимальный раствор для разбавления спермы;
- 2) эффективные криозащитные компоненты;
- 3) температурные режимы криоконсервирования;
- 4) температурные режимы отогрева;

5) метод удаления криопротекторов, снижающих физиологические характеристики спермы после отогрева.

Для криоконсервирования спермиев млекопитающих применяют криозащитные среды, разработанные для того или иного вида животного с учетом биохимических особенностей спермы (рН, осмотическое давление и др.) В качестве защитных и антишоковых компонентов применяются растворы желтка куриного яйца и/или молока, экстракты семян сои, очищенный соевый лецитин и др. Эти компоненты имеют в своем составе фосфолипиды и липопротеиды, чем обеспечивают фортификацию и стабилизацию мембран половых клеток, повышая их устойчивость к действию температурных градиентов. В качестве криопротектора в большинстве случаев используют 5-10% (0.55М – 1.11М) раствор глицерина или его комбинации с другими проникающими и непроникающими криопротекторами. Для замораживания применяют различные режимы охлаждения, медленные (0,5-3 град/мин) скорости до момента кристаллизации среды (до температуры минус 5°C - 10 °C) и затем более высокие скорости – до температуры минус 80°C, после чего сперматозоиды погружают в жидкий азот (минус 196°C). Для криоконсервирования используют программные замораживатели или специально оснащенные резервуары с жидким азотом. Спермии в жидком азоте можно хранить длительное время (40 и более лет) без существенного снижения их потенциальных физиологических функций.

Во многих странах мира криоконсервированную сперму (спермодозы) используют при воспроизводстве домашних и сельскохозяйственных животных, а также для сохранения исчезающих видов и пород путем искусственного осеменения.

В некоторых случаях получение эякуляторных спермиев может быть проблематичным, например, для определенных видов диких животных. В связи с этим альтернативой может быть использование спермиев, полученных при аспирации или экстракции из семенника, придатка семенника.

Видовые различия (рис.12.1) в размерах, форме, структуре акросомы, составе жирных кислот и соотношении классов липидов в спермиях определяют особенности методов криоконсервирования половых клеток самцов.

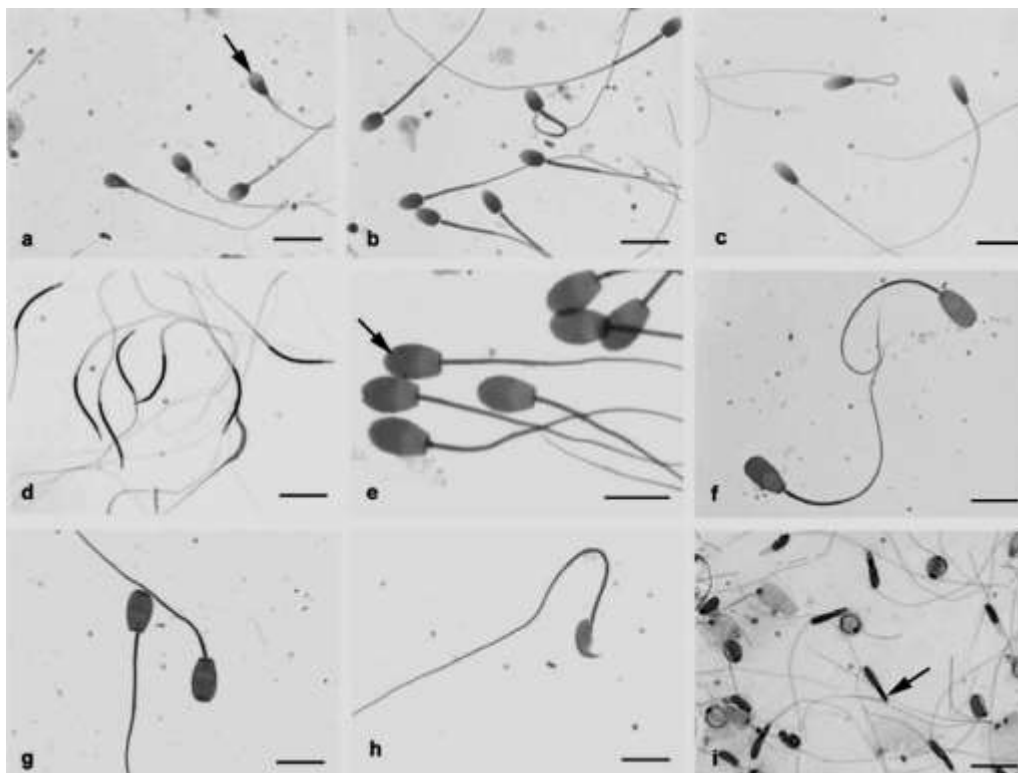


Рис. 12.1. Фенотипические особенности спермиев: а) человека, б) обезьяны, с) жеребца, d) петуха, е) барана, f) хряка, g) быка, h) мыши, i) моллюсков. Фиксированные препараты. Окраска *Sperm Blue*. (масштаб обозначен в правом нижнем углу каждой фоторафии).

Потеря жизнеспособности половых клеток самцов после криоконсервирования может быть вызвана механическими повреждениями кристаллами льда, осмотическими эффектами, повреждением мембраны вследствие перекисного окисления липидов радикалами активных форм кислорода, возникающими в процессе замораживания. Липидный состав мембраны спермиев, содержание в нем холестерина и других веществ, влияющих на текучесть мембраны и проницаемость, имеет классовые и видовые различия, которые определяют криорезистентность клеток, выбор криозащитных сред и программ охлаждения для гамет различных классов животных (млекопитающие, птицы, рыбы). После замораживания может изменяться липидный состав мембран спермиев, что тоже отражается на их оплодотворяющей способности. Также на функции спермиев могут влиять повреждения ДНК. Даже несмотря на то, что хроматин спермиев высококонденсирован, в процессе криоконсервирования возможно повреждение ДНК (возникновение одно- и двуцепочечных разрывов).

Криоконсервированные спермодозы отогревают в водяном термостате при температуре 35°-39°С (точная температура определяется технологическим регламентом). В ряде случаев существуют рекомендации по удалению после оттаивания из спермы криопротекторов путем центрифугирования и добавления среды инкубирования. Однако в современных промышленных технологиях криоконсервирования и

использования спермы многих видов сельскохозяйственных животных (быки, жеребцы, бараны и др.) удаление криопротекторов не производят, и отогретая сперма вводится в половые пути самки в той же среде, в которой замораживалась.

Жизнеспособность спермиев после замораживания-отогрева оценивается по их подвижности, которая должна составлять, не менее 30-40 % клеток с прямолинейно-поступательным движением. Для оценки деконсервированной спермы основных видов сельскохозяйственных животных существуют специальные стандарты биологического качества, созданные с учетом видовой и породной принадлежности самца.

12.1.1. Криоконсервирование спермиев млекопитающих

В современных условиях ведение племенного дела в животноводстве невозможно без применения криоконсервирования спермы производителей. В 1952 году английский ученый К. Полдж, используя защитное действие глицерина при охлаждении спермиев, значительно усовершенствовал метод длительного хранения спермы быка в жидком азоте. Многолетний опыт показал, что наиболее технологически приемлемым является замораживание спермы производителей в полимерных соломинках – пайетах объемом 0,25 мл (рис. 12.2). Пайеты были предложены французским ученым Р. Кассу и затем многократно усовершенствованы. Технология замораживания семени в пайетах имеет ряд преимуществ, главное из которых – достижение оптимальных скоростей замораживания биоматериала. Пайеты выпускаются разноцветными, с возможностью нанесения на них маркировочных надписей, необходимых для идентификации спермы.



Рис. 12.2. Полипропиленовые пайеты с замороженно-отогретой спермой, объем 0,25 мл.

Также достаточно часто используется метод криоконсервирования в пайетах объемом 0,5 мл, конструктивно аналогичных пайетам объемом 0,25 мл.

Широко апробированной на многих племенных предприятиях является технология криоконсервирования спермы производителей в герметично закрытых мягких контейнерах (так называемых закрытых гранулах), которые изготавливаются из тонкостенной полиэтиленовой трубки диаметром 3,8 мм (Рис 12.3). Данный метод известен как Харьковская технология асептического получения и криоконсервации спермы быков-производителей и был разработан коллективом харьковских ученых Института животноводства под руководством академика Ф.И. Осташко.



Рис. 12.3. Полиэтиленовые мягкие контейнеры с заморожено-отогретой спермой, объем 0,25 мл.

Бык. Сперма быка достаточно криорезистентна по сравнению с другими видами сельскохозяйственных животных, в связи с чем метод ее глубокого замораживания получил наибольшее распространение.

Примерный протокол криоконсервирования спермы быка:

1. Эякуляты быков оценивают под микроскопом по подвижности и отбирают те, в которых не менее 70% спермиев имеют прямолинейно-поступательное движение.

2. В нативную сперму, с учетом концентрации и подвижности спермиев, добавляют разбавитель – сахаро-цитратно-желточную среду с 5-10% (0,55M – 1,11M) глицерина. Среду добавляют из расчета получения после замораживания-отогрева не менее 10 млн спермиев с прямолинейно-поступательным движением.

3. Разбавленную сперму расфасовывают в полимерные контейнеры - пайеты или пробирки.

4. Контейнеры выдерживают в бытовом холодильнике 2-4 час при температуре 2-5°C.

5. Для осуществления процесса криоконсервирования контейнеры со спермой помещают в камеру охлаждения программного замораживателя или замораживают в специальных резервуарах в парах азота на расстоянии 4 см от зеркала жидкого азота.

Пробирки со спермой предварительно размещают в металлических кассетах специальной конструкции, а затем погружают их в жидкий азот в широкогорлых сосудах Дьюара или специальных криостатах.

Используется несколько режимов замораживания спермы. Так, например, при использовании программного замораживателя охлаждение пайет со спермой можно вести по следующему режиму: со скоростью 0,5 град/мин: от 0 до минус 15°C; 2-3 град/мин – от минус 15 до минус 50°C; от минус 50 до минус 80°C со скоростью 5-7 град/мин.

При использовании непрограммных устройств выдерживают контейнеры со спермой в парах азота в течении 5 мин при температуре минус 120-130°C.

6. После этого спермодозы в контейнерах переносят в сосуды Дьюара с жидким азотом для длительного хранения.

7. Перед искусственным осеменением спермодозы оттаивают в водяном термостате. Пайеты объемом 0,25мл оттаивают в течение 20 с, пайеты объемом 0,5 мл – 40с при температуре 35-37°C.

8. При применении криоконсервированной спермы для оплодотворения яйцеклеток сперму отмывают от криопротекторов путем постепенного разбавления (добавления к спермиям среды культивирования) и поэтапного центрифугирования. Надосадочную жидкость, содержащую криопротектор, удаляют, а осевшие на дно пробирки клетки разбавляют средой инкубации.

Жеребец. Сперму жеребца часто используют в племенном деле как в свежеразбавленном и охлажденном состоянии, так и в криоконсервированном виде. Однако следует учитывать, что в чистопородном разведении некоторых пород лошадей (английская чистокровная верховая и др.) криоконсервирование спермы является запрещенным приемом из-за консервативности законодательства стран-оригинаторов этих пород.

Примерный протокол криоконсервирования спермы жеребца:

1. Из свежеполученного эякулята удаляют путем фильтрации семенную плазму, негативно влияющую на половые клетки.

2. Собранную сперму оценивают под микроскопом по подвижности и отбирают эякуляты, в которых не менее 60-70% спермиев имеют прямолинейно-поступательное движение

3. Дополнительно отмывают сперму от плазмы методом центрифугирования в специальных отмывочных средах.

4. Для криозащиты спермиев жеребца при замораживании используют в качестве разбавителей сложные синтетические среды, преимущественно на молочной или молочно-желточной основе с добавлением глицерина в концентрации 3-5% (0,3М – 0,55М) или комбинации глицерина с диметилфосфорамидом, диметилацетамидом или другими криопротекторами группы амидов.

5. Разбавляют сперму с таким расчетом, чтобы достигнуть общей концентрации спермиев - 100 млн. клеток в 1мл.

6. Расфасовывают сперму. Для этого могут применяться различные технологические формы контейнеров для спермы жеребца. На практике наиболее широко используют 0,5 мл пайеты, а также используют 5мл макропайеты, 1мл шприц-тубы, 5мл шприц-тубы, плоские алюминиевые 13 мл тубы (рис.12.4, 12.5).



Рис.12.4. Полимерная шприц-туба с замороженно-отогретой спермой жеребца, объем 5 мл.



Рис.12.5. Алюминиевая туба с замороженно-отогретой спермой жеребца, объем 13 мл.

7. Криоконсервирование разбавленной спермы осуществляют с использованием замораживающих устройств различных конструкций после одночасовой выдержки в холодильной камере при 2-5°C. Пайеты криоконсервируют, разместив их на специальных зубчатых штативах в камере охлаждения замораживателя с активной подачей паров азота. Шприц-тубы замораживают путем прямого погружения в жидкий азот специальных металлических термоблоков, в которые они предварительно помещены. Плоские алюминиевые тубы выдерживают над поверхностью жидкого азота.

8. После достижения температуры минус 80°C контейнеры переносят в жидкий азот.

9. Для оценки эффективности криоконсервирования контрольные (выборочные) контейнеры деконсервируют и исследуют под микроскопом. Подвижность размороженной спермы должна быть не менее 30 – 50%.

10. Отогрев производится в водяном термостате при температуре 37°C. Для создания одной дозы (4-5 мл), необходимой для осеменения кобылы, отогревают и объединяют сперму из нескольких контейнеров. Одна отогретая шприц-туба со спермой (5 мл) является разовой дозой, необходимой для осеменения кобылы. Аналогично поступают со спермой, замороженной в плоских алюминиевых тубах (Рис. 12.4, 12.5).

Баран. Сперму барана успешно криоконсервируют по общепризнанной схеме, с применением медленных режимов охлаждения и использованием 5-10% (0,55М – 1,11М) глицерина. Особое влияние на криорезистентность спермы этого вида животных оказывает сезонность.

Козёл. Метод, подобный вышеописанным, применяется и для криоконсервирования спермиев козла. Особенностью для данного вида животных является необходимость предварительного отделения спермиев от семенной плазмы. Это связано с тем, что плазма содержит фермент, который вызывает негативные изменения плазматических мембран спермиев.

Хряк. Для криоконсервирования спермы хряков используют криозащитную среду на основе лактозно-желточного разбавителя и глицерина, применяют медленные скорости охлаждения. Однако ввиду низкой криорезистентности спермы у большинства хряков ее криоконсервирование на практике производится крайне редко, полностью уступая широкому применению метода охлаждения и хранения при температуре 15-17°C.

Кроль. Спермии кроля могут проявлять низкую криорезистентность при использовании таких криопротекторов, как глицерин, ДМСО, этиленгликоль. Применение криозащитных сред в сочетании проникающего и непроникающего криопротекторов (ацетамид, тергалола и метилцеллюлоза) позволило повысить жизнеспособность криоконсервированной спермы кроля.

Собака. Успешное осеменение криоконсервированной спермой кобелей было впервые применено в 1969 г. в США. В качестве криопротекторной среды для половых клеток данного вида обычно используют растворы на основе трис-буфера, 20% куриного желтка и 5-10%

(0,55M – 1,11M) глицерина. Установлено, что охлаждение со скоростью 10-50 град/мин в диапазоне от минус 15 до минус 60 °С является оптимальным. Быстрая (99 град/мин) и очень медленная (0,5 град/мин) скорости охлаждения негативно влияют на жизнеспособность и подвижность спермиев кобелей. После оттаивания подвижность спермиев кобеля может составлять порядка 50-70%.

Дикие животные. Состав криозащитной среды для спермиев диких животных готовят индивидуально, в зависимости от вида, на основе трис-буфера с куриным желтком и 5% р-ром глицерина. Медленный способ охлаждения позволил успешно криоконсервировать спермии некоторых видов обезьян, оленей и других представителей дикой природы.

12.1.2. Криоконсервирование спермы птиц

Создание криобанка семени имеет большое значение для птицеводства, поскольку позволяет сохранить отличительные адаптивные или «полезные» для сельского хозяйства гены исчезающих пород.

Применение криоконсервированной спермы в птицеводстве имеет ряд технических трудностей. Прежде всего, это относится к методу замораживания спермы и выбору криоконсервантов. Для замораживания спермы птиц предложены различные по составу защитные среды, включающие аминокислоты, углеводы (моно-, ди- и полисахариды), органические (глутаматы, лактаты, цитраты, ацетаты) и неорганические (хлориды, сульфаты, фосфаты, карбонаты) соли, некоторые биологически активные соединения (альбумины, липиды, ферменты, гормоны, антиоксиданты и др.).

Частота оплодотворения после использования криоконсервированной спермы птиц остается низкой и составляет до 30%. Более высокие показатели фертильности были получены при быстром охлаждении спермы с диметилацетамидом (ДМА) в качестве криопротектора, в этом случае оплодотворенность яиц составляла 50 – 60 %.

12.1.3. Криоконсервирование спермы рыб

Эффективность криоконсервирования спермиев рыб также видоспецифична. Причем криоконсервирование половых клеток морских видов рыб оказалось более успешным по сравнению с пресноводными.

Разработаны методы криоконсервирования спермы осетровых, карповых. В качестве криопротекторов чаще всего используют ДМСО, глицерин, этиленгликоль и метанол, применяют также 1,2-пропандиол и диметилацетамид в объемных концентрациях от 5 до 15%. Насыщение криозащитным раствором проводят в течение 10 - 15 мин при температуре 4°С, после чего образец замораживают, как правило, медленно до температуры жидкого азота. Отогрев проводят быстро при температуре 40°С, после чего немедленно используют для искусственного оплодотворения, так как со временем снижается подвижность и оплодотворяющая способность спермы.

12.2. Криоконсервирование ооцитов

Ооциты животных характеризуются высокой чувствительностью к действию низких температур и, как следствие, низкой сохранностью после отогрева. Долгое время не удавалось криоконсервировать ооциты животных, и на сегодняшний день, успехи достигнуты лишь для некоторых видов.

12.2.1. Криоконсервирование ооцитов млекопитающих

Главные проблемы криоконсервирования ооцитов млекопитающих обусловлены большими размерами, сложностью строения и значительной обводненностью клеток (Рис.12.6). Кроме этого, сохранность ооцитов связана с особенностями строения и состава плазматической мембраны, наличием кортикальных гранул и мейотического веретена деления. Наряду с этим отмечено высокое содержание липидов, в частности, в ооцитах и клетках эмбрионов свиньи, крупного рогатого скота, что также обуславливает их низкий уровень выживаемости после криоконсервирования. Так, например, ооциты свиней содержат 161 нг липидов на ооцит, что примерно в 2,5 раза больше, чем в ооцитах крупного рогатого скота, которые, в свою очередь, содержат в 17 раз больше липидов, чем ооциты мыши.

Впервые успешно криоконсервировать ооциты мыши удалось в 1976 году с получением потомства после переноса в полость матки самки-реципиента отогретых эмбрионов. Результативность криоконсервирования ооцитов мыши связывают именно с низким содержанием внутриклеточных липидов.

Для криоконсервирования ооцитов крупного рогатого скота применяют медленные режимы охлаждения с 1,2-пропандиолом. Однако более эффективным способом криоконсервирования является метод витрификации.

Для этого эмбрионы выдерживают 15 минут в растворе: 7,5% этиленгликоля и 7,5% (1М) ДМСО и затем 1 минуту в витрификационном растворе: 15% (2.66М) этиленгликоля, 15% (2.11М) ДМСО и 0,5 М сахарозы на основе физиологической среды. Ооциты помещают на открытый носитель, который быстро погружают в жидкий азот. Скорость снижения температуры ооцитов при использовании метода витрификации достигает 20000 град/мин.

Для отогрева носитель с ооцитами быстро переносят в 2 М раствор сахарозы, нагретый до 37°C. Удаление криопротекторов производят путем перемещения ооцитов в среды с их убывающей концентрацией. Для снижения осмотического шока ооцитов отмывочные среды содержат понижающие концентрации сахарозы (от 2М до 0.5 М).

Большое влияние на выживаемость ооцитов млекопитающих оказывает скорость отогрева. Более 80% ооцитов мышей успешно развиваются, если скорость нагрева высока и достигает 3000 град/мин. Жизнеспособность ооцитов оценивают по частоте их оплодотворения.

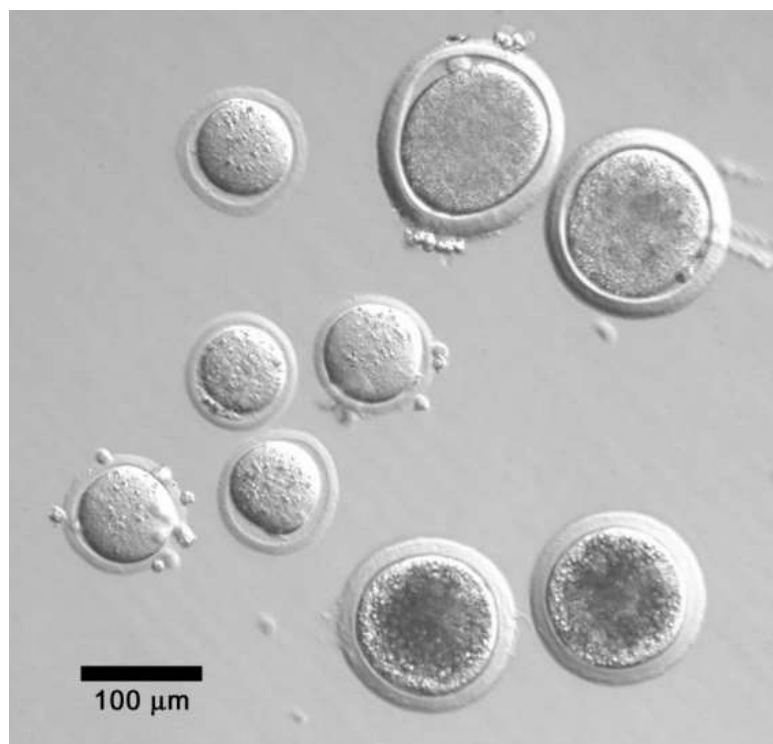


Рис.12.6. Ооциты мыши (пять слева), коровы (два справа вверху), свиньи (два справа внизу).

В настоящее время проведены немногочисленные исследования по витрификации ооцитов мелких жвачных животных. Существуют также единичные сообщения о витрификации зрелых и незрелых ооцитов овец.

12.2.2. Криоконсервирование ооцитов рыб, птиц и земноводных

На сегодняшний день не существует эффективных методов криоконсервирования ооцитов птиц, рыб и земноводных. Особенностью этих клеток являются не только их крупные размеры, но и то, что различные слои оболочки ооцитов характеризуются различной проницаемостью для молекул воды и криопротекторов, в результате чего происходят их летальные повреждения внутриклеточными кристаллами льда, не только на этапе замораживания, но и на этапе отогрева в результате рекристаллизации.

Новым и перспективным направлением, позволяющим обойти сложности при замораживании ооцитов, является разработка методов криоконсервирования предшественников половых клеток, которые обладают значительно большей криорезистентностью по сравнению со зрелыми клетками.

12.3. Криоконсервирование эмбрионов

Наиболее перспективным с точки зрения полноты сохранения генетической информации является замораживание ранних эмбрионов, осуществленное впервые в 1971 году в Англии. К настоящему времени этот метод освоен для млекопитающих 13 видов, а также некоторых исчезающих

беспозвоночных - морских ежей, моллюсков, насекомых, ракообразных, червей. Метод имеет большое практическое значение, так как позволяет сохранить генотипы обоих родителей и значительно облегчить транспортировку ценных видов биологических объектов.

12.3.1. Кримоконсервирование эмбрионов млекопитающих

Эмбрионы млекопитающих были успешно заморожены значительно раньше ооцитов. Известно о рождении потомства из кримоконсервированных медленным способом эмбрионов мыши, крысы, крупного рогатого скота и лошади. Кроме медленного способа замораживания в настоящее время широко применяют метод витрификации.

Существуют различия выживаемости эмбрионов не только в зависимости от вида животного, но и от стадии развития (Рис.12.7). Зиготы (оплодотворенные яйцеклетки) крупного рогатого скота кримоконсервировать не удается, тогда как эмбрионы 5-6 суток развития (морула) и 7-8 суток (бластоциста) удачно переносят процедуру низкотемпературного кримоконсервирования.

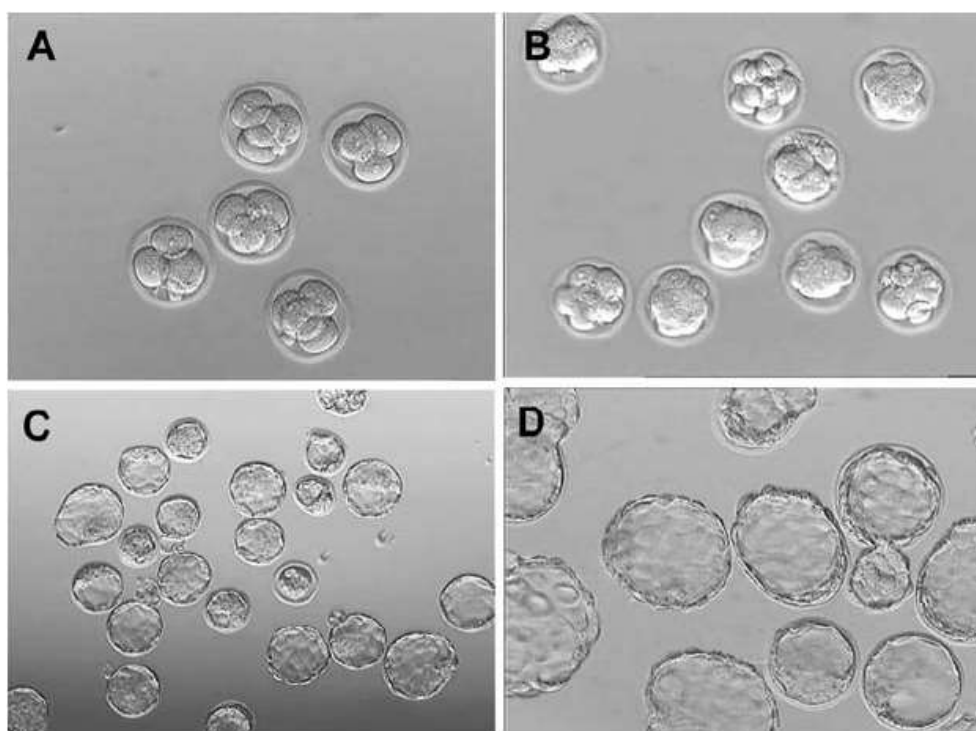


Рис. 12.7. Эмбрионы мыши доимплантационных стадий развития.
A – 4-х клеточная стадия, B – стадия морулы, C – стадия бластоцисты, D – стадия вылупления. X 200, 400. (Zhang J, Cui J, Ling X, Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell and 8-cell stages by cryotop method. J Assist Reprod Genet. 2009 (11-12):621-8.).

Эмбрионы свиньи на стадии бластоцисты выживают лучше, чем эмбрионы 2-4 суток развития. Это может быть связано с уменьшением

размеров клеток в результате дробления и увеличением соотношения площади поверхности бластоцисты к ее объему.

На сегодняшний день биотехнологии с использованием криосохранения эмбрионов активно применяются в воспроизведении многих сельскохозяйственных, домашних и диких животных: крупный рогатый скот, овцы, лошади, козы, кроли, обезьяны, антилопы, кошки и собаки. Метод имеет большое практическое значение, так как позволяет сохранить генотип обоих родителей и значительно облегчить транспортировку генетического материала ценных видов и линий.

Примерный протокол криоконсервирования эмбрионов млекопитающих включает в себя следующие этапы:

1. 10 мин инкубация эмбрионов в криозащитных средах, которые содержат, как правило, 10% (1.1M) глицерина, или 10% (1.79M) этиленгликоля, или 10% (1.36M) 1,2-пропандиола;
2. контейнеры с эмбрионами охлаждают от 20 до минус 6°C со скоростью 1град /мин;
3. инициация кристаллизации;
4. охлаждение со скоростью 0,3 град / мин до минус 35°C;
5. помещение в жидкий азот;
6. отогрев эмбрионов проводят, опуская соломинки в водяную баню при 37°C;
7. удаление криопротекторов производят путем помещения эмбрионов в среды с понижающейся концентрацией криопротектора.

12.3.2.Криоконсервирование эмбрионов рыб и птиц

Последние 50 лет криобиологи работают над созданием эффективных методов замораживания эмбрионов рыб и птиц, что весьма проблематично ввиду сложного строения этих биообъектов. Решение этой задачи имеет большую перспективу для сохранности водных экосистем, увеличения производства продуктов питания для человечества, медицинских исследований, поддержания биоразнообразия аквакультур.

Среди особенностей, которые осложняют эффективное криоконсервирование эмбрионов костистых рыб (Рис.12.8), можно выделить следующее: 1) большие размеры и, как следствие, низкое соотношение площади поверхности к объему и замедленный вход и выход воды или проникающего криопротектора; 2) крупные размеры клеток, а именно желтка, увеличивают риск повреждения мембраны кристаллами внутриклеточного льда; 3) различие скоростей проницаемости для воды и криопротекторов у бластодермы и желтка; 4) наличие полупроницаемой мембраны хориона, которая препятствует входу и выходу воды и криопротекторов, 5) высокое содержание липидов, которые являются мишенями для действия свободных радикалов, образующихся в процессе замораживания-оттаивания.

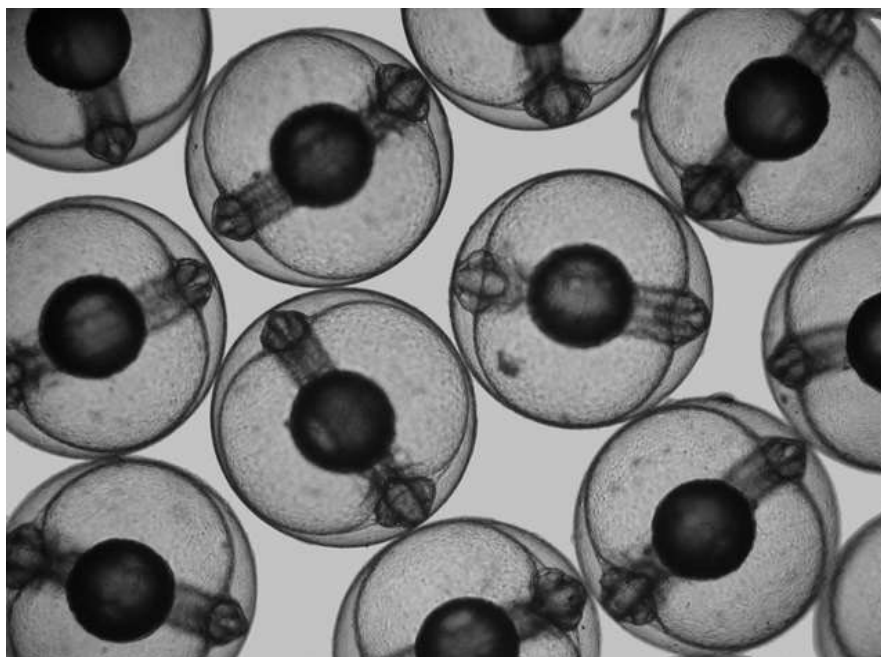


Рис. 12.8. Эмбрионы рыбы Лобан. Диаметр 1 мм.

Наибольшие сложности для успешного криоконсервирования связаны с тем, что желток окружает синциальный слой, который плохо проницаем для молекул воды и криопротектора, в результате чего происходят летальные повреждения этого слоя. Насыщение криозащитными растворами желтка возможно путем микроинъекций, однако при этом остается затруднительным удаление избыточной воды.

Разработка методов криоконсервирования является важным и перспективным направлением для создания коллекции существующих, исчезающих и ценных пород животных. Консервация множества видов геномов и разнообразного генетического материала необходима с целью сохранения биоразнообразия, а также интенсификации селекции и разведения ценных пород животных.

Криобанки половых клеток ряда сельскохозяйственных животных уже существуют в Институте животноводства НААН Украины (Харьков) и Институте разведения и генетики животных НААН Украины (Киев).

Рекомендуемая литература:

1. Смирнов И.В., Милованов В.К., Соколовская И.И. Диплом открытия от 12 декабря 1972 №103 с приоритетом 1947 года.
2. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей - Киев: Урожай. – 1978. – 225 с.
3. Бугров А.Д. Криповреждения и криозащита спермиев быков при глубоком заморживании, Харьков, Институт животноводства НААН, 2015, 330 с.
4. Polge C. and Rowson L.E.A. Result with bull semen stored at -79°C Vet. Rec, 1952, 64, p.851.
5. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменения животных, М, 1962 с.594-595

6. Осташко Ф. И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота / О Киев: Аграрна Наука. – 1995. – 184 с.
7. Nagase H. and Niwa T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form – 5th International Congress Animal Reproduction and A.I. p.410-415
8. Сушко А.Б., Новиков О.О. Патент України на корисну модель №31026А 61 D 19/00. Пристрій для отримання сперми жеребців - ІТ УААН; заявл.29.10.2007; опубл.25.03.2008, Бюл. № 6- 7с.
9. Сушко О.Б. Смолонг З.Бохенек М.Компанієць А.М.Міщенко А.Г. Ефективність застосування буферних середовищ, кріопротекторів і режимів заморожування сперми жеребців - Журнал «Вісник аграрної науки» – 2009. – №9. – С. 35-39.
10. Сушко А.Б.Патент на корисну модель №25826 від 27 серпня 2007 року Контейнер для кріозберігання і використання сперми жеребця
11. Козлов Н.Е., Ожин Ф.В., Паршутин Г.В., И.И. Родин Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных с.94-96
12. Сушко О. Б. Метод кріоконсервації сперми жеребців з використанням компактизованих шприц-тубів - Вісник аграрної науки. – К.; травень, 2007. – С. 43-45.

Глава 13. Криоконсервирование микроорганизмов

13.1. Мир микробов и их роль в жизнедеятельности человека. 13.2. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. 13.3. Применение криоконсервирования для депонирования микроорганизмов в коллекциях. 13.4. Криоконсервирование микроорганизмов на этапах биотехнологических производств. 13.5. Криоконсервирование бактерий. 13.6. Криоконсервирование вирусов. 13.7. Криоконсервирование грибов. 13.8. Список рекомендованной литературы.

13.1. Мир микробов и их роль в жизнедеятельности человека

Микроорганизмы чрезвычайно широко распространены в биосфере. Они обитают в почве, воде, атмосфере, в организме человека и всех видов животных, в растениях. Микроорганизмы оказывают существенное влияние на газовый состав атмосферы, плодородие почвы, участвуют в круговороте органических и неорганических веществ, выполняют санитарные функции и, наоборот, вызывают заболевания у людей, животных, растений. В практике человечества существует множество технологий и процессов, в которых задействованы различные микроорганизмы. С помощью биотехнологических процессов, в которых используют микроорганизмы, производят биологически активные вещества и лекарственные препараты для медицины и ветеринарии, микробиологические средства защиты растений от болезней и вредителей, бактериальные удобрения и регуляторы роста растений, кормовые добавки (кормовые белки, аминокислоты, ферменты, витамины для животноводства), пробиотические препараты, сырье для пищевой промышленности, средства для переработки сельскохозяйственных, бытовых и промышленных отходов и др. Микроорганизмы широко используются в научных исследованиях, посвященных молекулярной генетике и генной инженерии, биофизике, радиобиологии, экологии и в других сферах.

В связи с этим существует большая необходимость в методах долгосрочного хранения микроорганизмов. В современной практике чаще всего используют два метода долгосрочного хранения микроорганизмов – лиофилизацию (высушивание из замороженного состояния) и криоконсервирование.

Значительные различия в строении клеток микроорганизмов и их физиологии обуславливают и значительные различия в естественной чувствительности микроорганизмов к низким температурам в условиях окружающей среды. Так, пептококки и пептострептококки погибают под действием холода во внешней среде через несколько минут, стрептококки и нейссерии – через несколько часов, стафилококки – через несколько недель. Возбудитель чумы сохраняется в окружающей среде при минус 22°C до 4-х месяцев, а в замороженных трупах и блохах – до одного года. Энтеропатогенные иерсинии сохраняют жизнеспособность и патогенность при температурах от минус 15 до минус 20°C в течение нескольких месяцев и могут размножаться при 4 °C. Бруцеллы сохраняются в почве при

отрицательных температурах до 3-х месяцев, возбудитель туляремии – до года, микобактерии туберкулеза – несколько лет. В пробах воздуха, взятых в стратосфере при температурах от минус 20 до минус 40°C обнаружены почвенные бактерии. Различные по численности популяции бактерий обнаружены во льду полярных морей.

Эти факты послужили основой ошибочному мнению о том, что для хранения всех микроорганизмов достаточно использовать умеренно низкие температуры. Однако в процессе хранения при таких температурах происходит гибель многих видов микроорганизмов, селекция отдельных, устойчивых к холоду штаммов, молекулярные перестройки, приводящие к мутациям, потеря некоторых таксономических признаков.

Анализ применения различных технологий консервирования микроорганизмов свидетельствует о том, что самым эффективным и надежным методом их долгосрочного хранения является криоконсервирование.

Криоконсервирование микроорганизмов имеет ряд преимуществ. Незначительные потери жизнеспособных микроорганизмов возможны только на этапах замораживания – оттаивания. Сроки хранения при постоянной низкой температуре не влияют на количество клеток в хранящихся образцах. Криоконсервирование гарантирует полную сохранность генома и генетически детерминированных биологических свойств микроорганизма в течение длительного времени. Сегодня в международных коллекциях накоплен опыт хранения микроорганизмов при температуре жидкого азота в течение 50 – 70 лет без снижения жизнеспособности и потери генетически детерминированных свойств.

13.2. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов

Жизнеспособность микроорганизмов – интегральная характеристика сохранности ростового потенциала и способности к размножению, генотипической и фенотипической полноценности.

Показатель жизнеспособности (применяется для популяций бактерий, дрожжей и одноклеточных водорослей) – отношение числа жизнеспособных клеток к общему числу клеток, содержащихся в исследуемом образце. Обычно выражают в процентах.

Для определения жизнеспособности клеточных форм микроорганизмов существуют две группы методов – прямые и косвенные. К прямым относятся методы, основанные на учете репродуктивной способности живых клеток. К непрямым – методы, основанные на регистрации косвенных проявлений жизнедеятельности клеток.

Наиболее точными и информативными являются прямые методы, а среди них – *культуральные методы*, дифференцирующими критериями в которых служит регистрация наличия у клеток репродуктивной способности (способности к делению). Классическими культуральными методами

являются «чашечный» метод Коха и метод предельных разведений, а также десятки их модификаций.

При использовании «чашечного» метода производят серийные разведения исходной суспензии микробных клеток и из каждого разведения определенный объем суспензии высевает на поверхность плотной питательной среды или в пробирки с полужидким агаром. Посевы культивируют и подсчитывают количество выросших колоний. Каждая колония образована клоном, сформировавшимся из одной жизнеспособной клетки.

При использовании метода предельных разведений из исследуемого материала готовят ряд последовательных разведений. Затем определенным объемом из каждого разведения делают посев в пробирки с прозрачной жидкой питательной средой. После инкубации учитывают пробирки с помутневшей (проросшей) и прозрачной питательной средой. Принимается, что в пробирки с прозрачной средой не попала ни одна живая клетка. По специальной таблице Мак-Креди, разработанной на основании методов вариационной статистики, определяют наиболее вероятное количество жизнеспособных клеток в исходной суспензии.

Выражают концентрацию жизнеспособных клеток числом *колониеобразующих единиц* (КОЕ) в 1 мл.

Жизнеспособность вирусов определяют по их способности к репродукции в культурах клеток. О репродукции судят или по прямому *цитопатическому действию* (ЦПД), которое носит разнообразный характер в зависимости от вида вируса, по бляшкообразованию в клеточном монослое, по сорбции на инфицированных клетках эритроцитов или моноклональных антител к вирусу. Выражают концентрацию жизнеспособного вируса в «инфекционном титре вируса» – числе вирионов в единице объема исследуемого материала, способных вызвать инфекцию.

13.3. Применение криоконсервирования для депонирования микроорганизмов в коллекциях

В связи с широким развитием и все возрастающим значением для экономик развитых стран биотехнологических производств с использованием микроорганизмов возросла роль коллекций микроорганизмов разного уровня (международных, национальных, ведомственных). Это связано с тем, что все изобретения, лежащие в основе микробиологических технологий, невозможно осуществить без наличия в производстве микроорганизма, который применяется. Для защиты авторских прав и страховки производств от потери штамма-продуцента введена процедура депонирования. Порядок депонирования и использования запатентованного микроорганизма регламентирован «Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов с целью патентной процедуры» (1979 г.). Украина присоединилась к нему в 1996 г. Процедура депонирования предусматривает гарантированное долгосрочное хранение микроорганизма и

свидетельство о жизнеспособности штамма при его выдаче. Для длительного хранения микроорганизмов в коллекциях используют криоконсервирование и лиофилизацию (высушивание из замороженного состояния).

13.4. Криоконсервирование микроорганизмов на этапах биотехнологических производств

Задачами микробиологических производств в общих чертах являются получение целевого продукта микробного синтеза или микробной биомассы за минимальное время с минимальной затратой энергоресурсов и с максимально эффективным использованием питательных субстратов. На всех стадиях технологического процесса микроорганизмы-продуценты подвергаются действию комплекса технологических факторов, которые вызывают гибель части микроорганизмов, инактивацию продуктов микробного синтеза, контаминацию культуры-продуцента посторонней микрофлорой. К тому же микробиологические производства должны быть гарантированно обеспечены высокоактивными штаммами-продуцентами, адаптированными к условиям конкретного производства.

Избежать или уменьшить отрицательное действие технологических факторов и обеспечивать производство высокоактивными штаммами-продуцентами в полной мере позволяют технологии криоконсервирования микроорганизмов. Криоконсервирование микроорганизмов рекомендовано на описанных ниже этапах микробиологического производства.

В микробиологической лаборатории, которая может обслуживать сразу несколько предприятий, в криоконсервированном состоянии хранят:

- коллекционные штаммы, которые используют в исследованиях по получению и селекции штаммов-продуцентов;
- селекционированные штаммы;
- штаммы-продуценты, полученные из других коллекций и банков микроорганизмов (рис. 13.1).



Рис. 13.1. Применение криоконсервирования в микробиологических лабораториях предприятий микробиологической промышленности

Из микробиологической лаборатории штаммы-продуценты в лиофилизированном или криоконсервированном состоянии передаются на производство. На производстве полученные штаммы вносят в питательные среды и получают стартовые культуры (посевной материал), которые хранят в криоконсервированном виде. В начале каждого производственного цикла одну стартовую культуру размораживают и высевают в посевной ферментер, где выращивают посевную культуру штамма-продуцента. Посевную культуру пересевают в рабочий ферментер. Все стандартные этапы производственного цикла приведены на рис. 13.2.



Рис. 13.2. Применение криоконсервирования в микробиологическом производстве

13.5. Криоконсервирование бактерий

На рисунке 13.3 представлено строение бактериальной клетки. Оболочка бактериальной клетки состоит из клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. Под оболочкой находится протоплазма, состоящая из нуклеоида, цитоплазмы, органелл и включений. Нуклеоид бактерий не имеет оболочки, ядрышка и гистонов. Он представлен двунитевой ДНК, замкнутой в кольцо и плотно уложенной. В цитоплазме бактерий находятся рибосомы с коэффициентом седиментации 70S, рибосомальные РНК, включения. Разные виды бактерий могут иметь также капсулу, жгутики и ворсинки. Капсула – гидрофильная слизистая структура из полисахаридов, связанная с внешней стороной клеточной стенки. Капсула предохраняет бактерии от высыхания и защищает бактериальную клетку в организме человека и животных от иммунных факторов. Жгутики – тонкие нити из белка – флагеллина, берущие начало от мембраны. Обеспечивают активную подвижность бактериальных клеток. Ворсинки – нитевидные

образования из белка пеллина. Отвечают за адгезию, водно-солевой обмен и конъюгацию.



Рис. 13.3. Схема строения бактериальной клетки (А.А. Воробьев, 2003).

Бактерии, как и другие виды микроорганизмов, повреждаются в процессе замораживания-оттаивания в результате воздействия ряда физико-химических факторов, связанных с кристаллизацией и рекристаллизацией внутри- и внеклеточной воды. Наиболее уязвимыми для криповреждающих факторов структурами бактериальных клеток являются мембрана, клеточная стенка, рибосомы, эндоферменты, обеспечивающие энергетический метаболизм.

На жизнеспособность и сохранность биологических свойств бактерий влияют следующие факторы:

- строение клеток, обусловленное принадлежностью к определенному семейству, роду и виду;
- исходные морфологические и функциональные свойства клеток, на которые влияют условия культивирования (состав питательной среды, аэрация, температура культивирования);
- исходные морфологические и функциональные свойства клеток, обусловленные фазой роста периодической культуры;
- состав консервирующей среды;
- концентрация клеток в замораживаемом образце;
- режим охлаждения.

Бактерии из разных семейств, родов и видов имеют значительные различия в строении клеток, что влияет на их исходную криорезистентность. Так, бактерии шаровидной формы (стафилококки, стрептококки) более устойчивы к замораживанию, чем бактерии палочковидной формы (семейство энтеробактерий и др.). Большое значение для исходной криорезистентности имеет строение клеточной стенки. Маркером различий в

строении клеточной стенки является способность окрашиваться по методу Грама (рис. 13.4). Основным компонентом клеточной стенки грамположительных бактерий является многослойный пептидогликан (50–80% сухой массы клетки). Он имеет жесткую волокнистую структуру с поперечными пептидными сшивками. Толщина клеточной стенки у грамположительных бактерий достигает 50 нм и более. Такая структура пептидогликана обеспечивает высокую прочность бактериальным клеткам, в том числе резистентность к повреждающим факторам, сопровождающим процессы замораживания-отогрева. У грамотрицательных бактерий пептидогликан клеточной стенки составляет 1–10% от сухой массы клетки. Он занимает один слой. Снаружи, с подлежащим слоем пептидогликана связана наружная мембрана клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Она является мозаичной структурой из липополисахаридов, фосфолипидов, белков. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий более чувствительна к процессам замораживания.

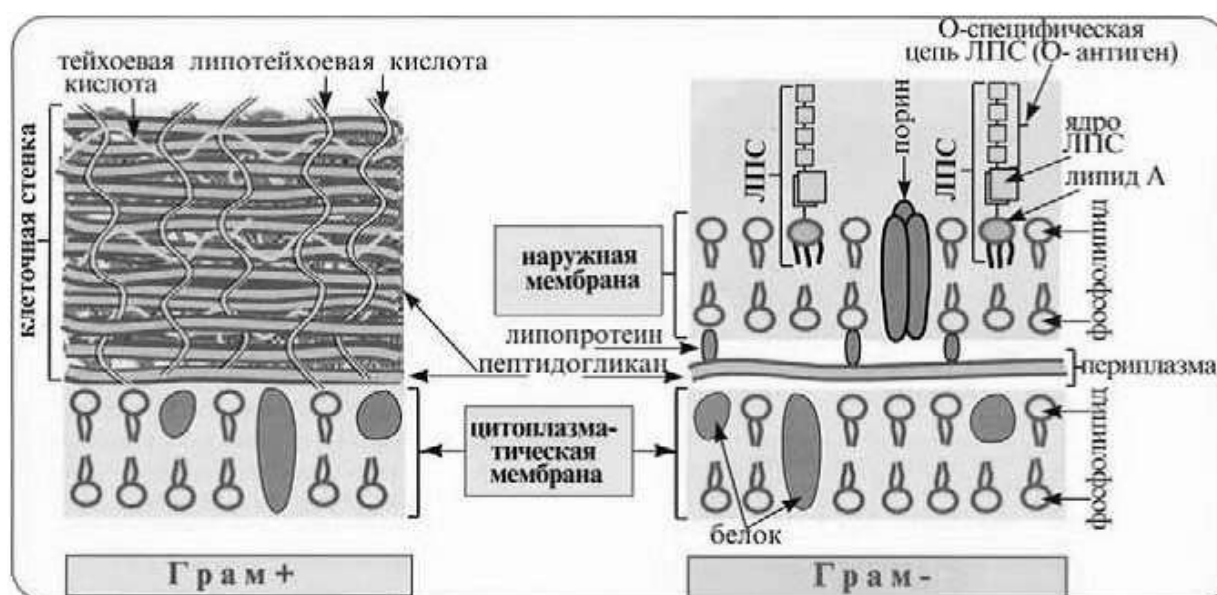


Рис. 13.4. Схема строения оболочек грамположительных и грамотрицательных бактерий (А.А. Воробьев, 2003).

Условия культивирования могут существенно влиять на состав и соотношение компонентов цитоплазматической мембраны (в частности, соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот), количество молекул АТФ, количество и состав эндоферментов, особенности ультраструктуры и метаболизма, а также другие характеристики клеток, от которых зависит их криорезистентность.

Фаза роста периодической культуры также оказывает влияние на характеристики клеток, от которых зависит их устойчивость к замораживанию. Клетки из логарифмической фазы роста более чувствительны к повреждающему действию замораживания по сравнению с клетками из стационарной фазы роста, так как в клетках из логарифмической

фазы роста происходят наиболее активные метаболические процессы и, следовательно, имеется значительное количество «мишеней», чувствительных к физико-химическим факторам, сопровождающим процессы замораживания-оттаивания.

Концентрация клеток в замораживаемых образцах оказывает влияние на выживаемость бактерий преимущественно при замораживании в суспензионных средах без криопротекторов. В образцах с исходной концентрацией 10^{11} и более клеток в 1 мл выживаемость бактерий значительно возрастает.

Состав консервирующей среды и режим охлаждения являются наиболее значимыми факторами, от которых зависит выживаемость бактерий в процессе криоконсервирования. Универсальных для всех бактерий режимов охлаждения и составов консервирующих сред нет. Как правило, разрабатывают технологии криоконсервирования для отдельных родов. В эти технологии входят и индивидуальные режимы охлаждения, и составы криозащитных сред.

Для криоконсервирования бактерий в качестве криопротекторов используют большое количество различных химических веществ и соединений: диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, маннитол, сорбитол, мальтозу, трегалозу и другие моно-, олиго-, полисахариды, этанол, этиленгликоль, пропиленгликоль, метилацетамид, полиэтиленгликоли, метилцеллюлозу, декстран, инактивированную сыворотку крови животных, обезжиренное молоко, бактопептон, желатин и др. Концентрации этих веществ и соединений в составе защитных сред колеблются от 3-х до 40%, наиболее часто – от 5 до 10%. Механизмы защитного действия перечисленных выше криопротективных веществ в отношении бактерий такие же, как и в отношении клеток и тканей эукариот. В указанных концентрациях эти криопротективные вещества не оказывают токсического действия на бактерии. После криоконсервирования бактерии от криопротекторов не отмывают.

Во время подготовки к процессу криоконсервирования бактерии не обязательно переводить из ростовой среды в свежую среду криоконсервирования. Чаще криопротектор вносят прямо в бактериальную культуру в ростовой среде. При необходимости криоконсервирования в водном растворе криопротектора клетки осаждают центрифугированием и ресуспендируют в растворе криопротектора. Время инкубации бактерий в защитной среде с криопротекторами 15–30 минут.

Режимы охлаждения бактерий также различные. Одни виды бактерий хорошо переносят и медленное, и быстрое охлаждение, другие – медленное.

Для криоконсервирования большинства бактерий можно рекомендовать следующий режим охлаждения: от комнатной температуры до -40°C со скоростью 1–5 град/мин и последующее погружение в жидкий азот.

Отогревают образцы в водяной бане при температуре $30\text{--}40^{\circ}\text{C}$.

Ниже приведены примеры ряда технологий криоконсервирования бактерий.

- Фототрофные бактерии. В ростовую среду (индивидуальную для конкретного вида фототрофных бактерий) добавляют один из криопротекторов (6–9 % поливинилового спирта, 2–10% метанола, 5–10% ДМСО, смесь из 5% ДМСО и 5% этиленгликоля). После 30-минутной инкубации образцы замораживают со скоростью 1,5–3 град/мин до минус 40°C, затем погружают в жидкий азот.
- Бактерии из семейства энтеробактерий. Бактерии выращивают в жидких средах на основе мясного бульона и бактопептона. К бактериальной культуре добавляют один из криопротекторов – глицерин, сахарозу в концентрации 10%, или ДМСО в концентрации 5%. После 15–30-минутной инкубации образцы погружают в жидкий азот.
- Молочнокислые бактерии семейства *Lactobacillus* и рода *Bifidobacterium*. Бактерии выращивают в питательной среде Блаурокка и осаждают центрифугированием. Осажденную биомассу бактерий ресуспендируют в защитной среде, которая содержит 2% сахарозы, 5% обезжиренного молока, 1% лактозы. Конечная концентрация бактерий составляет 10^{10} – 10^{11} КОЕ/мл. Замораживают погружением образцов в жидкий азот.
- Цианобактерии (сине-зеленые водоросли). К выращенной в жидкой ростовой среде культуре цианобактерий добавляют ДМСО в конечной концентрации 5–10%. Время инкубации цианобактерий с ДМСО 30–60 минут. После этого бактериальную суспензию вносят в криопробирки и замораживают. Спорогенные виды цианобактерий замораживают погружением контейнеров или криопробирок в жидкий азот, аспорогенные виды – со скоростью охлаждения 1 – 5 град/мин до минус 40°C, затем погружают в жидкий азот.
- Неспорообразующие анаэробные бактерии (родов *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Mobiluncus*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*). После выращивания бактерии осаждают центрифугированием и ресуспендируют в защитной среде до конечной концентрации 10^8 – 10^{10} КОЕ/мл. Состав консервирующей среды: сухая тиогликолевая среда – 33,0 г; пептон – 15,0 г; натрия тиогликолят – 1,0 г; натрия гидросульфит – 0,1 г; натрий фосфорнокислый двузамещенный – 1,0 г; хлористый калий – 1,0 г; тиомочевина 2 г; ДМСО – 5 мл; Твин-80 – 1,0 мл; питательный бульон – до 1,0 л. Время инкубации 15 мин. Замораживают образцы до минус 30°C со скоростью 2 град/мин, затем до минус 80°C со скоростью 20–25 град/мин и погружают в жидкий азот.
- Бактерии *Streptococcus pneumoniae*. После выращивания бактерии смывают с поверхности агаризованной среды средой консервирования (мясо-пептонный питательный бульон с добавлением 30 % сыворотки крупного рогатого скота (КРС) или лошадиной сыворотки, 0,01 мл

1%-го гемина, 5% глюкозы и 5% сахарозы). Замораживают образцы со скоростью 1–2 град/мин до минус 30°C, затем со скоростью 20–25 град/мин до минус 80°C и погружают в жидкий азот.

После криоконсервирования по описанным протоколам жизнеспособность бактерий составляет 50–100 %, в зависимости от рода и вида.

13.6. Криоконсервирование вирусов

Вирусы – облигатные внутриклеточные паразиты, которые размножаются только в живых клетках (рис. 13.5). Культивирование вирусов значительно отличается от культивирования клеточных форм микроорганизмов. В связи с этим, а также в связи с особенностями строения (маленькие размеры, от 15–18 до 300–400 нм) технологический процесс криоконсервирования вирусов рядом этапов отличается от технологий криоконсервирования других микроорганизмов.

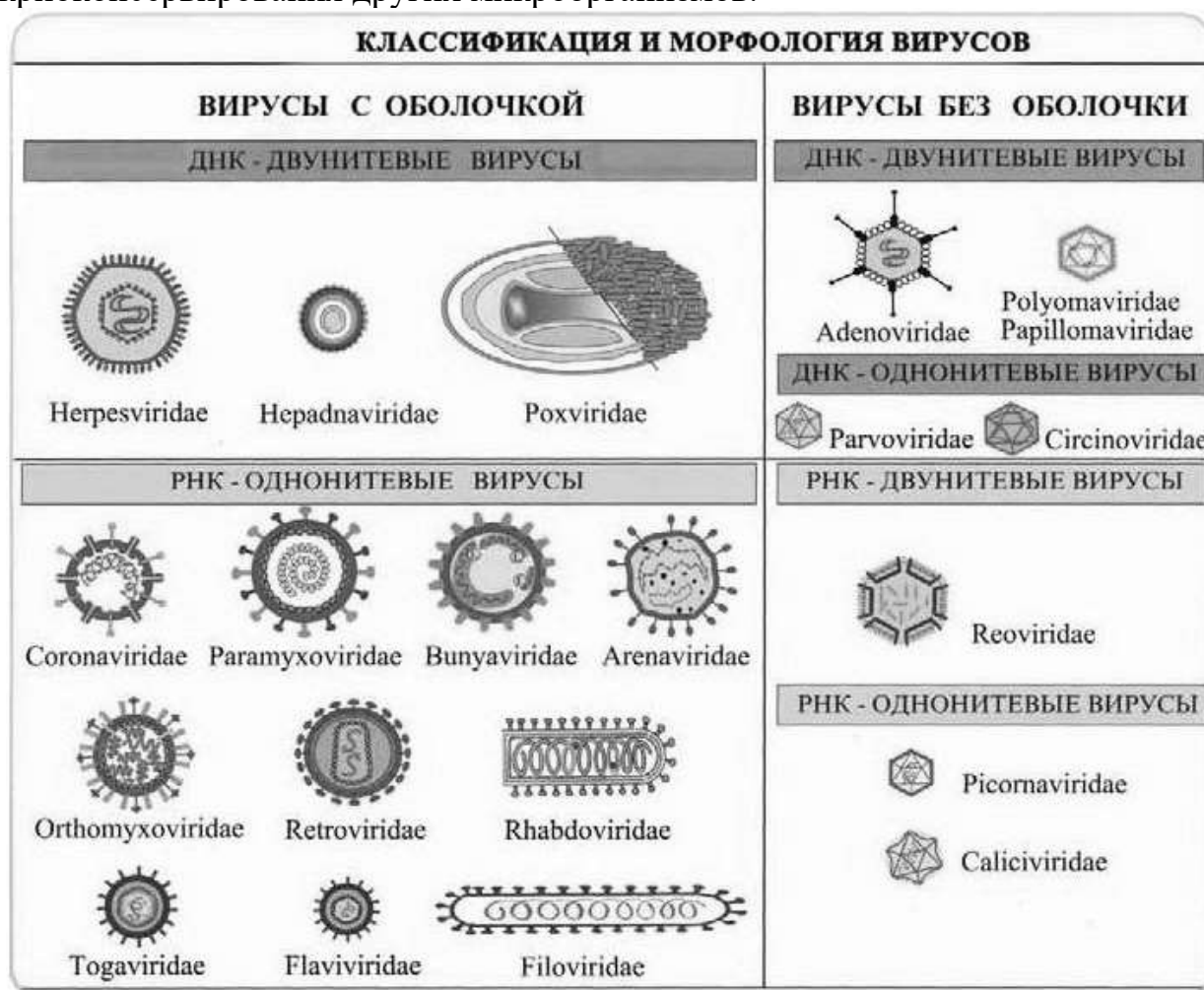


Рис. 13.5 Схема строения вирусов (А.А. Воробьев, 2003).

Наиболее часто вирусы размножают в культурах клеток. Культуры – выращенные *in vitro* в специальных жидких средах клетки, производные

различных тканей животных и человека. Клетки выращивают до получения клеточного монослоя, после чего заражают вирусом. Питательные среды, в которых культивируют клетки, сложные по составу. Они содержат необходимый набор солей, аминокислот, пуринов, пиримидинов, углеводов, витаминов с добавлением эмбриональной сыворотки. Преимущественно используют питательные среды 199, Игла, DMEM, MEM, RPMI. После репродукции вирусов среда культивирования содержит большое количество вирионов и фрагментов клеток, разрушенных во время репродукции и выхода из клеток дочерних вирионов.

Выделение из среды культивирования чистых препаратов вирусов – трудоемкая и сложная процедура. Поэтому для криоконсервирования применяют материал на основе культуральных сред, в которых осуществляли репродукцию вируса.

После окончания культивирования вируса культуральную среду центрифугируют для осаждения клеток, в которых выращивали вирус, и отбирают надосадочную жидкость, содержащую вирионы. Затем к этой надосадочной жидкости добавляют криопротективные вещества. Полученную суспензию вирусов в защитной среде выдерживают при комнатной температуре на протяжении 15–20 минут, расфасовывают в криопробирки или контейнеры и замораживают.

Для криоконсервирования вирусов используют следующие криопротективные добавки в конечных концентрациях:

- эмбриональная сыворотка КРС, инактивированная сыворотка крови КРС или лошадей в концентрации 10–20%;
- ДМСО в концентрации 5–10 % (0.73M – 1.46M);
- глицерин в концентрации 10% (1.11M);
- сывороточный альбумин человека в концентрации 0,1–4%;
- сахароза, трегалоза, или сорбитол в концентрации 10%;
- бактопептон или обезжиренное молоко в концентрации 5–10 %;
- 5% (0.55M) глицерин + 5% (0.7M) ДМСО + 5% эмбриональной сыворотки КРС;
- 5% сахарозы + 0,2 % сывороточного альбумина человека.

Вирусы, суспендированные с указанными выше криопротективными добавками, в меньшей степени, по сравнению с бактериями и дрожжами, чувствительны к режиму охлаждения. Поэтому их замораживают прямым погружением криопробирок и контейнеров в жидкий азот или размещением в парах азота.

Некоторые вирусы выращивают в 7-13 – дневных куриных эмбрионах и в организме восприимчивых лабораторных животных. В этих случаях ткани куриного эмбриона и фрагменты внутренних органов животных измельчают и гомогенизируют. Растертые органы заливают фосфатным буфером (pH=7–8) с добавлением антибиотика широкого спектра действия и готовят

10%-ную взвесь. Полученную взвесь центрифугируют 15–20 мин при 1000 g.

Отбирают надосадочную жидкость, содержащую вирионы, добавляют одну из криозащитных добавок, указанных выше, разливают в криопробирки или контейнеры и замораживают.

Основным механизмом криоповреждения вирионов при замораживании-оттаивании является осмотический шок: гипертонический шок на этапе замораживания с высокими скоростями охлаждения и гипотонический шок на этапе оттаивания после замораживания с низкими скоростями охлаждения. Под воздействием осмотического шока происходит повреждение капсида у простоустроенных вирусов и капсида с суперкапсидом у сложноустроенных вирусов с выходом нуклеиновой кислоты в окружающую среду.

Жизнеспособность вирусов после криоконсервирования в зависимости от вида может снижаться на 0,1–0,5 lg от исходного инфекционного титра.

13.7. Криоконсервирование грибов

Криоконсервирование дрожжей и дрожжеподобных грибов.

Дрожжи – одноклеточные грибы (рис. 13.6). Имеют округлую или эллипсоидную форму. Размер от 2,5 до 10 мкм. Могут жить как в гаплоидной, так в диплоидной формах. Гаплоидные клетки размножаются только вегетативным путем – образованием почек. По строению дрожжи относятся к низшим эукариотам. Имеют все клеточные структуры, характерные для эукариот – трехслойную клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, ядро, митохондрии, 80S рибосомы, цитоплазму с включениями.

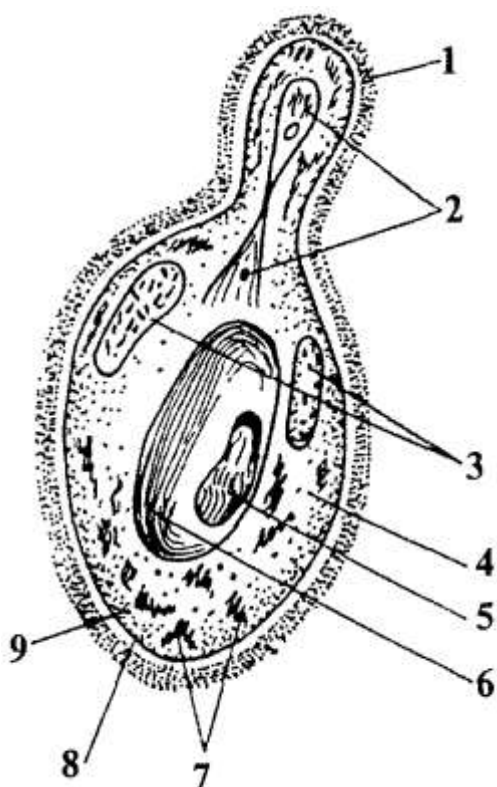


Рис. 13.6. Схема строения клетки дрожжей (Воробьев А.А., 2004): 1 – клеточная стенка, 2 – ядро, 3 – зерна гликогена, 4 – цитоплазма, 5 – метахроматин, 6 – вакуоль, 7 – митохондрии, 8 – клеточная мембрана, 9 – рибосомы.

Необходимость в криоконсервировании коллекционных видов и стартовых культур дрожжей обусловлена их широким применением в пищевой промышленности – в производстве хлебобулочных изделий, этилового спирта, в виноделии и пивоварении. Дрожжи используют также в производстве медицинских препаратов, продуктов диетического питания, кормов для сельскохозяйственных животных.

Дрожжеподобные грибы – одноклеточные грибы округлой формы. От истинных дрожжей отличаются наличием псевдомицелия и отсутствием аскоспор. Они имеют все структуры, присущие эукариотическим клеткам. Являются возбудителями грибковых заболеваний человека, которыми на сегодня страдает 1/5 часть населения Земли.

Коллекции дрожжеподобных грибов создают для эпидемиологического мониторинга участия различных видов этих грибов в патогенезе заболеваний человека и сельскохозяйственных животных, для разработки новых антифунгальных препаратов и препаратов специфической профилактики.

Для криоконсервирования дрожжей и дрожжеподобных грибов используют следующие консервирующие среды: 5–10%-ный (0.7 – 1.41M) раствор ДМСО; ростовая среда на основе пивного сусла (8% сухих веществ по Балингу) с добавлением 5% (0.7M) ДМСО или 5% (0.55M) глицерина. Время инкубации – 20 минут. Образцы охлаждают со скоростью 1–5 град/мин до минус 40°C, затем погружают в жидкий азот. Отогревают образцы в водяной бане при 30°C.

После криоконсервирования по описанным протоколам сохраняются жизнеспособными 85–100 % клеток дрожжей и дрожжеподобных грибов.

Криоконсервирование мицелиальных грибов.

Мицелиальные грибы – многоклеточные нефотосинтезирующие микроорганизмы с клеточной стенкой (рис. 13.7).

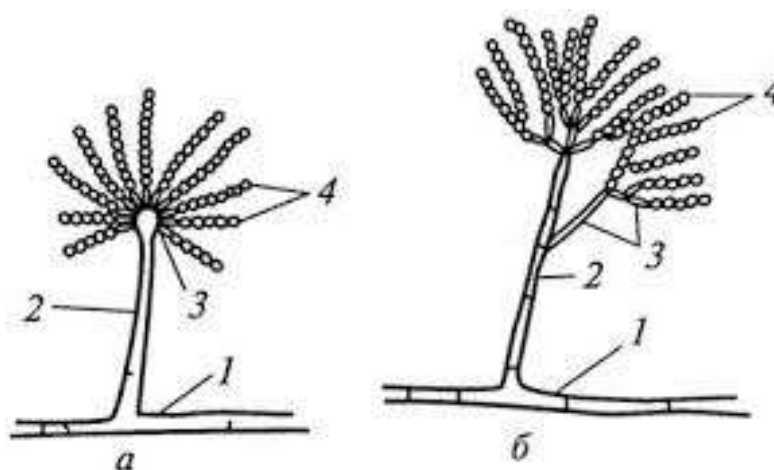


Рис. 13.7. Схема строения мицелиальных грибов (Воробьев А.А., 2004): а – *Aspergillus*; б – *Penicillium*. 1 – гифы мицелия, 2 – конидиеносцы, 3 – фиалиды, 4 – конидии (споры).

Относятся к высшим эукариотам. Имеют ядро с ядерной оболочкой, цитоплазму с органеллами, цитоплазматическую мембрану, многослойную клеточную стенку, состоящую из нескольких типов полисахаридов (маннанов, глюканов, целлюлозы, хитина), белка, липидов. ЦПМ содержит гликопротеины, фосфолипиды и эргостеролы. Тело гриба называют талломом. Мицелиальные грибы образуют тонкие ветвящиеся нити (гифы), сплетающиеся в грибницу – мицелий. Гифы, врастающие в питательный субстрат, называются вегетативными гифами (отвечают за питание гриба). Гифы, растущие над поверхностью субстрата, – репродуктивными гифами (отвечают за бесполое размножение). Гифы низших грибов не имеют перегородок, гифы высших грибов разделены перегородками.

Мицелиальные грибы используют в производстве пищевых продуктов и в качестве продуцентов антибиотических и ферментных препаратов для медицины и ветеринарии. Это также обуславливает необходимость их криоконсервирования в коллекциях и банках.

Для криоконсервирования мицелиальных грибов используют следующие среды консервирования: 5%-ные (0.5M) растворы ДМСО или (0.55M) глицерина, 10% раствор лактозы, 10% обезжиренное молоко. Время инкубации – 20 минут. Образцы замораживают погружением в жидкий азот, отогревают в водяной бане при 30°C.

После криоконсервирования в защитных средах сохраняются 20–90 % грибов в зависимости от рода.

Рекомендованная литература:

1. Варяница В.В.; Высеканцев И.П. Методы хранения сложных РНК-содержащих вирусов // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2017. – Т. 27, №4. – С. 287-296.
2. Криобиология и биотехнология / Цуцаева А.А., Попов В.Г., Сытник К.М. и др.; Под общ. Ред. Цуцаевой А.А. – Киев : Наук. думка, 1987. – 216 с.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник / Под ред. А.А. Воробьева. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2004. – 691 с.
4. 4.Пирог Т.П., Ігнатова Т.П. Загальна біотехнологія : підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
5. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – Т. 12, № 4. – С. 99–121.
6. ATCC Virology Guide. Tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs. – Manassas: ATCC, 2016. – 32 p.

Глава 14. Основы сублимационной сушки.

14.1. Сублимация – понятия и терминология. 14.1.1. Немного истории. 14.1.2. Основные определения и терминология. 14.1.3. Преимущества сублимационной сушки 14.1.4. Традиционные области применения сублимационной сушки. 14.2. Теоретические основы сублимационной сушки. 14.2.1. Физические принципы сублимационной сушки. 14.2.2. Замораживание биологического материала. 14.2.3. Высушивание. Условия, определяющие продолжительность сублимационной сушки. 14.3. Технологический процесс. 14.3.1. Основные этапы технологического процесса сублимационной сушки. 14.3.1.1. Замораживание как этап подготовки материала к последующей сушке сублимацией. 14.3.1.2. Сублимационная сушка материала. Интенсификация процесса сушки. 14.3.1.3. Досушивание продукции. 14.3.2. Технологические требования к упаковке готовой продукции и условиям хранения. 14.4. Техническая база реализации технологии сублимационной сушки. 14.4.1. Общие принципы конструкции и порядок работы аппаратов для сублимационной сушки. 14.4.2. Управляемые параметры процесса сублимационной сушки. Контроль вакуума и температуры в установках для сублимационной сушки.

14.1. Сублимация – понятия и терминология

14.1.1. Немного истории

Технология сублимационной сушки была и на данный момент остается одним из методов, позволяющим сохранить до 95% веществ, микроэлементов и полезных свойств свежего сырья в консервированном продукте. Сублимационная сушка – это высокоэффективный метод обезвоживания предварительно замороженных продуктов.

Высушивание из замороженного состояния в вакууме распространено в медицине, пищевой, микробиологической, химической и других отраслях промышленности. Однако в первую очередь технология вакуумной сублимационной сушки получила развитие в фармацевтической отрасли, где она зачастую не имеет альтернативы.

Применительно к медицинским препаратам лиофилизация впервые была осуществлена в 1909 г. Шаккеллом (L.F. Shackell), который высушил вирус бешенства, а также ряд антисывороток. Лиофилизированные антисыворотки, в отличие от антисывороток, высушенных тепловым способом, легко растворялись, и их растворы были прозрачными. Однако широкое развитие лиофилизация получила в 30-х гг. 20 в., после того как Флосдорф (E.W. Flosdorf) приготовил этим методом сухую плазму крови, а Л.Г. Богомолова, Н.Н. Титов и М.А. Калашников спроектировали один из первых в мире сублимационных аппаратов камерного типа. В последующие годы началось бурное развитие технологии сублимационного высушивания. С использованием этой технологии производят различные сухие медицинские препараты: плазму крови, фибриноген, криопреципитат, тромбин, фибринолизин, вакцины, сухую бактериальную массу (колибактерин и другие), антибиотики, гормональные и ферментные

препараты, коллагенные губки, различные экстракты, гистологические препараты для гистохимических и электронно-микроскопических исследований и так далее.

Следующей отраслью, где нашла широкое применение технология сублимационного высушивания, была пищевая индустрия. Большинство подходов и решений для её внедрения в пищевую промышленность без серьезных изменений были привнесены из фармацевтической отрасли.

Массово сублимационное обезвоживание стало использоваться для консервирования продуктов в пищевой промышленности в 1950-1960-е годы. Изучению процесса сублимационной сушки посвящены работы многих отечественных и зарубежных учёных. В основном работы были направлены на изучение процесса в целом, разработку оборудования, интенсификацию процесса, снижение энергозатрат, разработку технологических особенностей, режимных параметров и др.

14.1.2. Основные определения и терминология

Одной из первоочередных задач, стоящих перед учеными, была разработка метода консервирования биологических объектов таким образом, чтобы максимально сохранить в продукте свойства свежего биологического сырья.

Консервация (лат. *conservatio*, сохранение) - это соответствующие действия, направленные на долгосрочное сохранение объектов. В обиходе консервацией часто называют сам продукт консервирования, имеющий значение обобщения (например, домашняя консервация – как результат заготовки овощей и фруктов).

Консервирование - это: 1) процесс специальной обработки для предохранения от порчи; 2) процесс технических мер для предохранения от порчи; 3) временная приостановка какой-либо деятельности.

Консервирование - это процесс, благодаря которому продукты с малым сроком хранения приобретают свойства, позволяющие хранить их существенно дольше. Основная задача консервирования – свести уровень активности воды до минимального, что лишает вредные микроорганизмы среды обитания для дальнейшего развития и порчи продукта.

Сублимационная сушка и лиофилизация. Процесс сублимационной сушки по своей природе представляет собой обезвоживание замороженного материала в результате перехода вещества (льда) из твердого состояния в газообразное, минуя жидкую фазу. В медицине и биотехнологии его называют «лиофильная сушка», поскольку в итоге получают лиофильные, т. е. легкорастворимые вещества (лиофилизация в переводе с греческого: *lyo* растворять + *philia* склонность). В зарубежных литературных источниках употребляют термин *freeze-drying* (англ.), что в переводе соответствует термину замораживание-высушивание.

14.1.3. Преимущества сублимационной сушки

Лиофилизация широко используется для получения сухих медицинских препаратов и биологических материалов благодаря минимальным физико-химическим и биологическим превращениям в получаемом материале, отсутствию вспенивания, способствующего денатурации белков, малой изменяемости формы и структуры материала и возможности его длительного хранения при комнатной температуре, а при соответствующей упаковке — и в тропических условиях.

В ряде случаев, например, при производстве сухих легкорастворимых антибиотиков, бактериальных и вирусных препаратов, заквасок и ферментов, кисломолочных продуктов, БАДов и т.п. сублимационная сушка имеет ряд преимуществ по сравнению с другими технологическими подходами.

Сублимационная сушка обеспечивает высокий уровень сохранности исходных свойств продукта. Практически остается неизменным начальный уровень питательных веществ, витаминов, микроэлементов, первоначальная форма, естественный запах, вкус и цвет. Это становится возможным за счет того, что замораживание обеспечивает фиксацию важнейших свойств продукта, а последующая сублимация льда создает пористую структуру. При этом сублимационное обезвоживание предполагает мягкие режимы термообработки в вакууме и позволяет получить конечную влажность на уровне нескольких процентов. В итоге качество сублимированных продуктов очень высокое. Они имеют длительные сроки хранения при нерегулярных температурах, легко регидратируются перед дальнейшим применением, имеют гораздо меньший удельный вес (порядка 20-10% от веса исходных).

14.2. Теоретические основы сублимационной сушки

14.2.1. Физические принципы сублимационной сушки

Сублимация (возгонка) представляет собой переход вещества из твердой фазы в газообразную, минуя жидкую фазу. Сублимация и возгонка — равнозначные термины. Поскольку при возгонке изменяется удельный объем вещества и поглощается энергия, возгонка является фазовым переходом первого рода. Энергия, которая поглощается в процессе возгонки, называется теплотой сублимации.

Сублимация, как одна из разновидностей парообразования, возможна во всем диапазоне температур и давлений, при которых существуют твердая и газообразная фазы. В процессе возгонки давление пара вблизи твердой поверхности всегда ниже равновесного. В противном случае имеет место обратный процесс — конденсация вещества из газообразного состояния непосредственно в твердое, который называется десублимацией. Примером десублимации могут быть такие атмосферные явления, как иней на поверхности земли и изморозь на ветвях деревьев и проводах.

В условиях, когда давление пара вблизи поверхности соответствует равновесному состоянию, количество молекул пара, покидающих твердую поверхность, равно количеству молекул, поглощаемых этой поверхностью,

то есть имеет место динамическое равновесие. При этом давление паров и температура твердого вещества находятся между собой в однозначном соответствии. Соответствующие значения давления (P) и температуры (T) определяются кривыми фазового равновесия на диаграмме состояния воды (рис. 14.1).

Кривые фазового равновесия делят диаграмму на три смежные области: область твердого (лёд), жидкого (вода) и газообразного (пар) состояния.

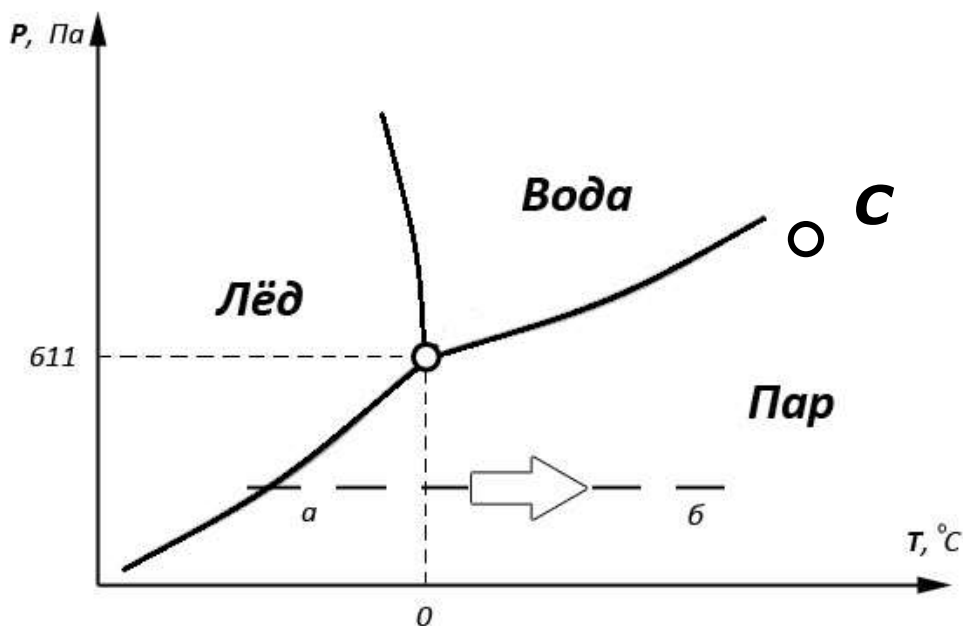


Рис. 14.1. Диаграмма равновесия фаз для воды в координатах давление (P) – температура (T). Объяснение в тексте.

В месте пересечения трех кривых фазового равновесия расположена тройная точка, которой соответствует давление 4,58 мм. рт. ст. (611 Па) и температура $0,01^\circ\text{С}$. Все три фазы (лед – вода – пар) могут существовать, находясь в равновесии друг с другом, лишь при единственных значениях температуры и давления тройной точки. Если подводить теплоту к замороженному материалу при давлении ниже давления тройной точки, будет иметь место процесс сублимации (возгонки). На рис. 14.1 это показано стрелкой вдоль линии а – б. Кривая фазового равновесия «жидкость-газ» (граница между жидкостью и газом) оканчивается в точке С, называемой критической точкой. В этой точке разность объемов V данного количества жидкости и газа становится равной нулю.

Таким образом, для того чтобы сублимация стала физически возможной, парциальное давление в сублимационной камере должно быть ниже давления паров воды над продуктом, которое в свою очередь, должно быть ниже давления тройной точки воды.

Процесс сублимации может осуществляться как в условиях атмосферного давления (сухой холодный воздух, парциальное давление

водяных паров ниже 610 Па), так и при понижении общего давления, обычно ниже 70 Па (вакуумная сублимационная сушка).

Очень показательна для понимания процедуры удаления влаги из биологических объектов во время сублимационной сушки схема, представленная на рис. 14.2.

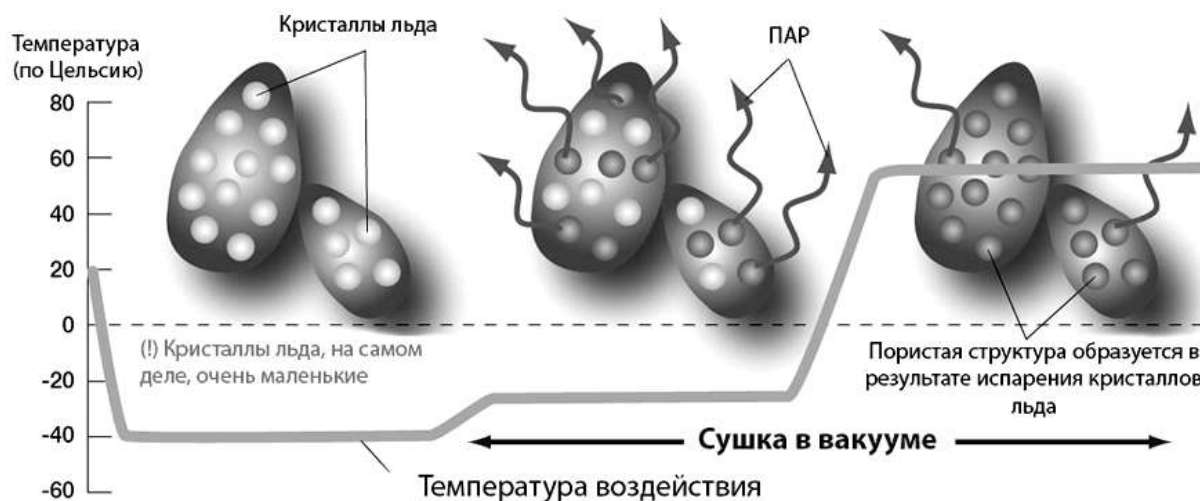


Рис. 14.2. Упрощенная схема процесса сублимационной сушки биологических объектов. Объяснение в тексте.

По кривой температурного воздействия (кривая «температура воздействия» на рис. 14.2) легко проследить основные этапы сублимационной сушки. При понижении температуры от 20 до минус 40°C объект замораживается и в нем образуются кристаллы льда. Далее из рабочей камеры откачивают воздух, и начинается процесс сушки образца в вакууме. При последующем повышении температуры кристаллы льда посредством сублимации выпариваются из образца и образуется конечная пористая структура биологического объекта.

Процесс сушки проводят в вакууме при давлении парогазовой среды в рабочей камере ниже давления, соответствующего тройной точке воды. В этих условиях при подводе энергии, необходимой для сублимации, не происходит плавление льда, и его температура близка к равновесной. Если количество подводимого тепла недостаточно, происходит снижение скорости сушки, так как теплота фазового превращения для данной температуры постоянна. Подведение избыточного тепла нарушает заданный температурный режим сушки, что может привести к преждевременному размораживанию продукта.

14.2.2. Замораживание биологического материала

Обязательным условием при подготовке биологических объектов к сублимационной сушке является их предварительное замораживание. Учитывая, что биоматериалы содержат от 60 до 95% воды, которая является растворителем, обуславливающим течение диффузионных процессов, а

также химических и биохимических реакций, изменение ее фазового состояния (замораживание) оказывается главным фактором торможения этих процессов. Процесс замораживания заключается в образовании кристаллической структуры из частично упорядоченных групп молекул. Образование кристаллов льда (кристаллизация) сопровождается выделением значительного количества энергии (около 335 кДж/кг). Это связано со снижением кинетической энергии частиц в твердой структуре кристалла по сравнению с жидкой фазой. Фазовое превращение воды в лед значительно изменяет её физические свойства.

Замораживание оказывает решающее влияние на качество сублимированных продуктов и интенсивность последующего процесса обезвоживания.

В биологических материалах вода содержится в виде растворов, при этом часть ее остается свободной, а часть постоянно связана в структуре белков и полисахаридов (связанная вода). Связанная вода не замерзает даже при достаточно низких температурах. Процесс кристаллизации свободной воды характеризуется скоростью образования зародышей кристаллов и скоростью их роста. Зависимость скорости этих процессов от температуры является основой для выбора эффективных режимов замораживания.

В общем случае в процессе замораживания биологических материалов по мере понижения температуры в них происходит увеличение количества закристаллизованной воды. Под этим подразумевается количество льда, образовавшегося при данной температуре, отнесенное к общему количеству воды в продукте (в %). Существует прямая зависимость между количеством влаги, удаляемой фазовым переходом «лед – пар», т. е. долей вымороженной влаги при данной температуре сублимации, и качеством высушенного продукта. В различных по своей физической природе объектах при одинаковых температурах количество вымороженной влаги будет различным.

Предварительное замораживание сырья перед сублимационной сушкой необходимо проводить при отрицательной температуре, достаточной для того, чтобы превратить в лед основное количество содержащейся в продукте влаги. При этом к замороженным продуктам предъявляются следующие основные требования: максимальное количество влаги продукта должно быть превращено в лед; размер и расположение кристаллов льда должны способствовать интенсивному тепло- и массообмену при сублимационной сушке.

В свою очередь, интенсивность тепло- и массообмена при сублимации зависит от структуры образца, образующейся в процессе его замораживания. При медленном замораживании продуктов животного и растительного происхождения в их межклеточном пространстве образуются крупные единичные кристаллы. Более крупные кристаллы образуются и в глубинных слоях образца. При этом происходят процессы значительного диффузного перемещения веществ по причине возникновения разности концентраций их в зоне образования кристаллов льда в периферийных областях продукта, т. е.

при замораживании наблюдается процесс концентрации компонентов с более низкими температурами замерзания. В конечном итоге практически весь образовавшийся лед находится вне клеток, внутри клеток остается незамерзший раствор. Особенно ярко выражена тенденция образования кристаллов льда в межклеточном пространстве в животных тканях. Медленное замораживание приводит к разрушению их структуры. После размораживания такая ткань теряет упругость, наблюдается вытекание сока.

При быстром замораживании образуются мелкие кристаллы льда, равномерно распределенные по объему вещества, кристаллы формируются не только в межклеточном пространстве, но и внутри клеток, диффузное перемещение веществ незначительно. При быстром замораживании гистологическая структура тканей хорошо сохраняется. Имеются сведения, что при сверхбыстром замораживании мелких образцов (погружением их в жидкий азот) 90% всех кристаллов льда формируются внутри клеток, размеры кристаллов очень малы — порядка сотен ангстрем, повреждения тканей минимальны. Однако необходимо иметь в виду, что при замораживании в жидком азоте методом погружения достаточно крупных биообъектов в них почти всегда наблюдаются разрывы, трещины вследствие возникающих термических напряжений.

Наиболее подходящая технология замораживания конкретного объекта и её параметры должны быть определены до начала сублимационной сушки.

14.2.3. Высушивание. Условия, определяющие продолжительность сублимационной сушки

По завершению этапа замораживания основная часть влаги в материале переходит в лед, но при этом часть связанной воды — обычно на уровне нескольких процентов, остается в переохлажденном жидком состоянии. Далее, после установления в пространстве сушильной камеры некоторого уровня вакуума, начинается непосредственно процесс сушки.

В начальный момент сушки биоматериал находится при конечной температуре замораживания. Дальнейшее высушивание материала происходит в режиме подачи определенного количества энергии (тепла) в зону сублимационной сушки (к объекту сушки), т.е. в режиме энергоподвода различной интенсивности.

В связи с этим весь процесс сублимационной сушки условно можно разделить на 3 основных периода. Первый период (постоянного энергоподвода) характеризуется постоянным подводом тепла к высушиваемому продукту. Он начинается с момента включения подачи энергии (сразу после окончания процедуры замораживания) и заканчивается в момент, когда температура поверхностного слоя материала становится равной температуре, допустимой для данного вида биологического материала. В период постоянного энергоподвода интенсивность сублимации равна интенсивности удаления пара. Вся подводимая к продукту энергия затрачивается на процесс фазового перехода «лед — пар». При этом температура высушиваемого материала остается практически постоянной в

течение всего первого периода сушки. Содержание влаги в продукте убывает, количество высушенного продукта увеличивается, зона сублимации продвигается в толщу материала. По завершении сублимации всей массы льда на поверхности продукта начинается второй период.

Второй период (убывающего энергоподвода) характеризуется постепенным снижением интенсивности подаваемого к продукту тепла. В этот период обезвоженная зона на поверхности продукта увеличивается, возрастает ее термическое сопротивление. С возрастанием обезвоженной зоны необходимо уменьшать подачу тепла в зону сублимации.

Длительность обоих вышеописанных периодов сублимации зависит главным образом от толщины слоя материала, свойства продукта, глубины вакуума в камере, температуры греющих плит.

Как только граница раздела между высушенной и замороженной зонами исчезает, т. е. после удаления всей свободно-вымороженной влаги (в продукте остается только связанная влага, которая не может действовать как растворитель), наступает стадия, называемая физической «досушкой» (третий период). Температура материала быстро повышается до максимально допустимой температуры в сухом продукте. В этом периоде происходит удаление связанной влаги. Продолжительность периода досушивания зависит от конечной влажности продукта.

Продолжительность процесса сублимационного обезвоживания во многом зависит от температуры сублимации и давления парогазовой среды в сублимационной камере. Рассмотрим влияние этих параметров на интенсивность сушки.

В общем случае передача теплоты от одного тела к другому в природе происходит тремя основными способами и их сочетанием:

- кондукцией – передачей тепла при непосредственном контакте двух тел с разной температурой;
- излучением;
- конвекцией в движущемся потоке жидкости или газа.

В рабочих камерах сублимационных установок создается достаточно глубокий (порядка 1 мм рт. ст.) вакуум. При этих условиях теплопроводность и теплоемкость паровоздушной смеси очень мала и, как следствие, мал вклад (в реальных условиях это доли процента) конвективной составляющей в общий баланс теплообмена. Преобладающими являются первые два фактора, т. е. кондуктивный и радиационный теплообмен. В свою очередь, доля и роль каждого из них существенно различаются в установках различных конструкций.

Так, в установках, где объект сушки размещается непосредственно на греющих полках в лотках (противнях), передача теплоты происходит преимущественно кондукцией. В данном случае решающую роль играет плотный, надежный контакт двух тел, между которыми происходит обмен теплотой. В сублимационных установках с радиационным энергопроводом к объектам досушивания решающую роль играет разность температур

излучателей и материала в противнях. Радиационный энергоподвод обычно используют в крупных сублимационных установках.

Рассмотрим особенности процесса сушки на противнях (поддонах, лотках), размещаемых непосредственно на полках сублимационной установки, т. е. контактирующих с полками (рис. 14.3). В этом случае в реальных условиях сублимационной сушки при подводе энергии к продукту сушки всегда имеются весьма существенные неравномерности в распределении потоков теплоты, передаваемых от поверхности полки к материалу.



Рис. 14.3. Пример размещения сублимируемого материала на полках.

Противень с продуктом, как правило, соприкасается с греющей поверхностью полки в точках, расположение которых носит случайный характер. Причиной являются деформации поверхности противней в результате их загрузки, транспортировки.

Тепловой поток, необходимый для сублимации вымороженной влаги, распространяется по дну противня от места его контакта с греющей поверхностью, поэтому поверхность материала, расположенная вблизи точек контакта, будет обезвоживаться в первую очередь.

Через некоторое время зона частично осушенного материала с низкой теплопроводностью создает дополнительное термическое сопротивление переносу теплоты.

В итоге расходуемый на сублимацию этих зон поток теплоты уменьшается и распространяется к следующим участкам. Когда материал, прилегающий к местам контакта, полностью высыхает, «отдаленные» слои продолжают обезвоживаться. Неравномерное продвижение фронта фазового перехода приводит к общему увеличению всей длительности сушки.

Так как сушка идет при достаточно низких температурах греющих плит, что характерно для установок с системой обогрева жидким

теплоносителем, радиационная составляющая теплового потока незначительна и не может компенсировать нарушение контакта «плита — противень». Использование во время сушки не только кондуктивной составляющей, но и радиационной в значительной степени сокращает время сушки.

При сублимационной сушке материалов в условиях радиационного подвода теплоты значительная длительность обезвоживания вызвана тем, что во втором периоде (убывающего энергоподвода), энергия к фронту сублимации передается кондукцией через непрерывно увеличивающийся осушенный слой с низким коэффициентом эффективной теплопроводности.

14.3. Технологический процесс

14.3.1. Основные этапы технологического процесса сублимационной сушки

Технология вакуумной сублимационной сушки включает три взаимосвязанных этапа:

- первый из них – предварительное замораживание объектов сушки;
- на втором этапе осуществляется удаление замороженной влаги из объектов сушки посредством фазового перехода «лёд-пар»;
- третий, заключительный этап – удаление оставшейся незамороженной влаги путем её испарения, доведение конечной влажности материала до заданного уровня, так называемый этап досушивания.

14.3.1.1. Замораживание как этап подготовки материала к последующей сушке сублимацией

На первом этапе технологического процесса сублимационной сушки – замораживании – осуществляется формирование кристаллической структуры, при этом форма и размер кристаллов льда, их распределение в замороженном материале, изменение физико-химических показателей зависит от режимных параметров процесса и свойств объектов замораживания.

Замораживание биоматериалов перед сублимационной сушкой осуществляют различными способами, в зависимости от вида, формы, требуемой конечной температуры продукта, технических возможностей производства и т. д. На предприятиях пищевой и медицинской промышленности замораживание, как правило, осуществляют в морозильных камерах с естественной или принудительной циркуляцией воздуха, а также в низкотемпературных шкафах, входящих в комплект сублимационной установки. В этих случаях биоматериалы размещают в противнях в виде слоя, либо в кассетах (при сушке в ампулах или флаконах), которые устанавливают в морозильную камеру, позволяющую обеспечить заданную конечную температуру. Толщина слоя составляет 10—20 мм. Продолжительность замораживания зависит от вида, количества материала,

способа его подготовки, а также температуры и скорости движения охлаждающей среды (воздуха).

При отсутствии морозильной техники процесс замораживания можно проводить непосредственно на плитах (полках) сублимационной установки, охлаждаемых с помощью хладоносителя. При этой операции перегрузка сырья из морозильной камеры исключается полностью, что сокращает потери времени.

Лиофилизация медицинских и биологических препаратов проводится в стеклянных флаконах, ампулах и противнях. Для обеспечения оптимальных условий замораживания и последующего высушивания температура замораживания должна соответствовать эвтектической температуре раствора, при которой раствор полностью замерзает и отношение поверхности к объему замороженного препарата будет максимальным, что обеспечит наибольшую поверхность сублимации при минимальной толщине слоя.

При получении препаратов сухой плазмы крови — фибриногена, криопреципитата, альбумина, гамма-глобулина и других — предварительное замораживание проводят во флаконах, помещенных в спиртовую ванну при температурах минус 40-45°C и вращающихся вокруг горизонтальной оси. В зависимости от количества замораживаемого препарата продолжительность процесса составляет 30-40 минут. Микроскопические исследования сухой плазмы крови, замороженной этим методом, показали, что сухой материал состоит из нескольких слоев, на границах которых обнаруживаются изменения белковой структуры, так как продолжительность замораживания относительно велика. Для сокращения периода замораживания и образования мелкокристаллической структуры льда выступающую из ванны поверхность флакона поливают охлажденным спиртом. Используется также метод центробежного замораживания, при котором флаконы с помощью специальных устройств вращаются в вертикальном положении со скоростью 800-1500 об/мин. Охлаждение производится путем разбрызгивания охлажденного до минус 45°C спирта на стенки флаконов.

Предварительное замораживание препаратов в пенициллиновых флаконах и ампулах осуществляется в холодильных камерах с температурой внутри бункера минус 40-50°C. В лабораторной практике для замораживания может использоваться твердая углекислота (минус 78°C), охлаждающая смесь из льда (2 части) и поваренной соли (1 часть). Такая смесь позволяет получить температуру до минус 21,3°C. При статическом замораживании ампулы могут быть помещены в холодильный шкаф в вертикальном либо наклонном положении.

14.3.1.2. Сублимационная сушка материала. Интенсификация процесса сушки

Конечная цель этого технологического этапа - получить сухой продукт с одинаковой влажностью по всей площади.

В числе важнейших факторов, порождающих неравномерность сушки, можно выделить следующие: неодинаковые физические характеристики

(плотность, теплопроводность, влажность) объекта сушки; неодинаковые условия контакта объекта сушки с теплоподводящими поверхностями; различная интенсивность облучения поверхности объектов сушки в установках с радиационным энергоподводом; различное парциальное давление по объему камеры сублимационной установки. В ходе замораживания жидких и пастообразных материалов в плоских противнях возникают значительные неоднородности структуры замороженного слоя и отклонения толщины слоя.

В условиях чисто кондуктивного подвода теплоты к продукту различия в продолжительности высушивания отдельных слоев могут достигать 20%, причем распределение таких неоднородностей как по объему сублимационной камеры, так и по площади полок носят случайный характер. Это приводит к вынужденному увеличению длительности всего процесса сушки, что значительно ухудшает экономические показатели технологии сублимационного высушивания биологического сырья.

В процессе сублимационной сушки подвод тепла в зону сублимации при ее углублении в толщу продукта затруднен. Это связано с тем, что слой подсохшего материала (теплопроводность которого примерно в 50 раз меньше замороженного) оказывает сопротивление как переходу пара из зоны сублимации с поверхности образца, так и передаче тепла от греющих элементов в зону сублимации. Тепловая энергия в зону сублимации передается через непрерывно увеличивающийся слой «тепловой изоляции».

Есть три возможных пути устранения описанных выше недостатков этого технологического этапа в реальных условиях процесса высушивания. Первый из них – создание идеальных условий контакта между греющими полками и противнем. На практике его реализовать невозможно, так как деформации противней в процессе нагрева неизбежны. Второй путь – сушка продукта в условиях не кондуктивного, а «чисто» радиационного энергоподвода при размещении противней с зазором в несколько миллиметров от поверхности плит. В этом случае режим сушки необходимо изменить, т. е. вести сушку при более высоких температурах плит. Третий путь – применение противней с более толстым днищем. Толщина и теплопроводность днищ должны быть достаточными для релаксации неравномерностей температур, вызванных неоднородностью условий контакта дна противней с греющими плитами.

Выбор пути оптимизации процесса высушивания как технологического этапа решается для каждого конкретного продукта и имеющихся технических возможностей.

Для получения высококачественного продукта сублимационной сушки необходимо удалить 75-90% влаги при отрицательной температуре в центральной зоне материала посредством фазового перехода «лед—пар». Оставшаяся часть наиболее прочно связанной влаги удаляется при положительных температурах продукта. Начиная с температуры замороженного продукта, желательно привести ее к возможно большему значению, однако ни в коем случае нельзя достигать температуры

эвтектического плавления, любое превышение которой приведет неотвратно к плавлению и денатурации продукта.

В период сублимации температура пищевых продуктов в центре слоя находится в пределах от минус 10 до минус 30°C. Для лекарственных препаратов требуются более низкие температуры сублимации, как правило, от минус 35 до минус 45°C.

14.3.1.3. Досушивание продукции

С момента исчезновения последних кристаллов льда температура продукта растет очень быстро. В это время следует поддерживать максимально допустимую температуру в сублимируемом продукте - это период вторичного обезвоживания, который состоит в удалении последних паров воды и частично воды, связанной с продуктом. Этот период часто называют «досушкой». Его цель - достижение в сублимируемом продукте требуемой остаточной влажности.

При сублимации остаточная влажность, полученная в продукте, зависит от 4 факторов:

- природы продукта;
- вакуума в камере;
- длительности вторичного обезвоживания (досушивания);
- максимально допустимой температуры сухого продукта.

Для большинства пищевых продуктов достаточна конечная влажность 3-4%. Если ставится цель достижения сроков хранения в течение нескольких лет, конечная влажность должна быть понижена до 2-3%. Температурный предел устойчивости к нагреву в каждом конкретном случае зависит от свойств самого объекта сушки. Для пищевых продуктов он находится в пределах 40-50°C. Для продуктов растительного происхождения рекомендуются более мягкие режимы досушивания, при температурах 35-40°C. Частично обезвоженные продукты животного происхождения более стабильны по отношению к воздействию высоких температур.

Вес сублимированных продуктов в среднем принимается от 1/5 до 1/10 начальной массы. Столь малый вес сублимированных продуктов исключительно важен для существенного сокращения расходов при их транспортировке.

14.3.2. Технологические требования к упаковке готовой продукции и условиям хранения

Доведенный до заданной конечной влажности продукт подается на расфасовку и упаковку. Варианты упаковки сублимированных продуктов приведены на рис. 14.4.



Рис. 14.4. Варианты упаковки сублимированных продуктов.

Особенностью продуктов сублимационной сушки является их пористость, вследствие чего они обладают большой адсорбционной способностью – активно поглощают кислород и влагу из окружающей среды.

Наиболее интенсивное поглощение влаги имеет место сразу по окончании процесса сушки в начальном периоде хранения. По этой причине расфасовку и упаковку сухих продуктов необходимо осуществлять в помещениях с кондиционированным воздухом при относительной влажности не более 30%. В идеальном варианте эти операции следует производить автоматически, с использованием оборудования, исключающего контакты сухого продукта с атмосферным воздухом, содержащим влагу.

Основными причинами нежелательных изменений свойств продуктов сублимационной сушки в процессе хранения являются окислительные превращения (белков, липидов, витаминов), зависящие от свойств продуктов, степени и продолжительности контакта их с кислородом воздуха и температуры.

Продолжительность хранения сублимированных продуктов и их качество после окончания хранения зависят от качества упаковки. Для длительного хранения наиболее пригодны стеклянные банки, закатанные металлическими или закрытые пластмассовыми крышками. При хранении в затемненном месте допустимые сроки составляют: для молочных продуктов 7-12 месяцев, для мясных – до 12 месяцев, для продуктов растительного происхождения – до 2 лет.

Такие же сроки хранения при упаковке в трехслойные металлизированные пленки. Чаще всего сублимированные продукты упаковываются в трехслойные металлизированные пакеты с азотным наполнением весом от 2г до 5000г, в зависимости от продукта. При упаковке в двухслойные пленки срок хранения до 1 месяца, а при использовании бактерицидных полиэтиленовых пакетов – 2...3 недели.

14.4. Техническая база реализации технологии сублимационной сушки

14.4.1. Общие принципы конструкции и порядок работы аппаратов для сублимационной сушки

Принципиальная схема установки периодического действия для сублимационной сушки биологического сырья показана на рис. 14.5.

Высушиваемый продукт размещают на полках рабочей камеры сублиматора. Внутри полок циркулирует с помощью насоса теплоноситель (в данном случае силиконовое масло), который охлаждает полки при замораживании продукта (посредством холодильной установки) или нагревает их в период сушки (посредством нагревателя). Посредством вакуумной линии рабочая камера подключена к вакуумному насосу, который создает необходимый вакуум и откачивает парогазовую смесь из сублиматора. Конденсация паров воды происходит в конденсаторе льда (десублиматоре), куда подается хладагент от холодильной установки.



Рис. 14.5. Принципиальная схема установки для сублимационной сушки биологического сырья. Объяснение в тексте.

Важнейшим показателем для оценки эксплуатационных возможностей установок сублимационной сушки является площадь загрузки рабочей камеры, непосредственно связанная с производительностью каждого цикла сушки. Анализ конструктивных особенностей сублимационных установок периодического действия, выпускаемых ведущими зарубежными фирмами, позволяет разделить их по своему функциональному назначению, количеству загружаемого в сублимационную камеру сырья и соответствующей этой загрузке рабочей площади полок на 3 большие группы.

Во-первых, это оборудование для лабораторных исследований. Оно характеризуется небольшой (1-5 кг) загрузкой сырья, площадь полок составляет 0,3-1м². Установки этой группы отличаются высокой степенью оснащённости приборами для контроля всех параметров процесса и объектов высушивания, возможностью точного регулирования режима работы системы холодоснабжения и вакуума, возможностью визуального контроля хода процесса, в том числе с использованием микротелекамер. Одним из лучших представителей установок из этой группы – настольная лабораторная сублимационной сушки фирмы VirTis (США), представленная на рис. 14.6.



Рис. 14.6. Настольная лабораторная сублимационной сушки фирмы VirTis (США).

Вторая, наиболее многочисленная по типам моделей группа – это установки для предприятий медицинской и микробиологической промышленности, а также выработки опытно-промышленных партий пищевых продуктов (рис. 14.7). Загрузка материала в эти установок обычно на уровне 20-75кг, иногда 100кг, общая площадь полок 2-7 или 10м². Общей особенностью является сушка в условиях кондуктивного теплоподвода. Объекты сушки (чаще всего в ампулах или флаконах различной ёмкости) устанавливаются на противнях, устанавливаемых, в свою очередь, на горизонтальных плитах, смонтированных в объёме сушильной камеры в виде этажерки. Температура плит может изменяться в диапазоне от минус 30-40°С на этапе замораживания и начала сушки до 50...80°С к её завершению. Температура десублиматора – порядка минус 50...-60°С. Рабочая сушильная камера имеет прямоугольную, реже круглую форму. Десублиматор, как правило выносной, отделяемый от основной рабочей камеры посредством вакуумной задвижки с рабочим сечением 250-400мм. Холодоснабжение десублиматора и полок автономное, от холодильных машин, входящих в состав сублимационной установки. Установки этого класса выпускаются серийно всеми фирмами, специализирующимися на выпуске оборудования для сублимационной сушки.



Рис. 14.7. Общий вид сублимационных установок для предприятий медицинской и микробиологической промышленности.

Третья группа установок предназначена для сушки в промышленных масштабах пищевых продуктов (рис. 14.8). Количество загружаемого в каждую рабочую камеру сырья составляет обычно от 300-500кг до 1000кг. Рабочая поверхность полок для размещения продукции – от 30-50 до 100м².



Рис. 14.8. Промышленная линия сублимационной сушки по производству продуктов питания ТД «Мазурин» (РФ). *К началу 2017 года в ассортименте компании насчитывалось более 60-ти видов продуктов сублимационной сушки собственного производства.*

14.4.2. Управляемые параметры процесса сублимационной сушки. Контроль вакуума и температуры в установках для сублимационной сушки

По окончании процесса замораживания продукт размещают в сублимационной камере, после этого начинают понижать общее давление в рабочей камере установки с помощью вакуумных насосов. При достижении в камере заданных режимных параметров к продукту необходимо подводить теплоту, требуемую для сублимации замороженной влаги (примерно 700 ккал/кг удаленного льда). При этом температура продукта должна оставаться постоянной, в противном случае ее повышение может вызвать повышение давления в камере, подтаивание продукта, что приведет к необратимой потере его качества.

В настоящее время наиболее распространен способ управления процессом сушки по экстремальным температурам высушиваемого материала. Как правило, его широко используют при сушке биологического материала в условиях радиационного подвода энергии. Сущность такого управления состоит в следующем. В процессе обезвоживания в материале одновременно существуют две экстремальные зоны: зона максимальной температуры (верхняя экстремальная зона) и зона минимальной температуры (нижняя экстремальная зона). Верхняя экстремальная зона, как правило, находится в поверхностном слое материала, нижняя – в его центре. Подвод тепла к материалу осуществляют таким образом, чтобы температура, соответствующая верхней экстремальной зоне, не превышала предельно допустимого значения, при котором возможно подтаивание материала. Как только какой-либо участок материала окажется высушенным, температуру поверхности излучателей регулируют таким образом, чтобы до окончания сушки поддерживать температуру на уровне предельно допустимого значения. Процесс сушки заканчивается, когда завершается обезвоживание нижней экстремальной зоны, а температура в ней окажется равной конечной температуре. Постоянство температуры поверхности обеспечивается снижением интенсивности энергоподвода во времени.

Таким образом, контролируя в течение технологического цикла соотношение параметров температура-вакуум, можно обеспечить высокое качество конечного продукта.

Рекомендуемая литература:

1. Гуйго Э. И., Журавская Н. К., Каухчешвили Э. И. Сублимационная сушка в пищевой промышленности. – М.: Пищевая промышленность. – 1972. – 432 с.
2. Семенов Г. В., Касьянов Г. И. Сушка сырья: мясо, рыба, овощи, фрукты, молоко: Издательский центр «МарТ», Ростов-на-Дону. – 2002. – 112с.
3. Волынец А.З. Сублимация. М.: МИХМ. – 1987. – 56 с.

4. Oetjen G.-W. Freeze-Drying / G.-W. Oetjen, P. Haseley. – [Second Edition]. – Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA. – 2004. – 395 p.
5. Cryopreservation and freeze-drying protocols : [edited by J. G. Day, G. N. Stacey. – 2nd ed.] . – Totowa, New Jersey : Humana Press Inc. – 2007. – 348 p. – (Methods in molecular biology : series editor J. M. Walker).
6. Потапов В. А. Кинетика явлений переноса в процессе сушки. - Lap Lambert Academic Publishing, Германия. – 2013 – 319 с.

Глава 15. Криобанки

15.1. Определение и назначение криобанка. 15.2. Значение криобанков 15.2.1. Сохранение биоразнообразия Земли. 15.2.2. Обеспечение развития инновационных медицинских технологий. 15.2.3. Обеспечение биобезопасности населения от инфекций. 15.3. Организация и структура криобанка. 15.3.1. Инфраструктура криобанка и этапы подготовки биоматериала. 15.3.2. Система обеспечения безопасности криохранения 15.3.3. Развитие принципов организации и структуры криобанков. 15.4. Оборудование и инвентарь криобанка. 15.4.1. Сосуды Дьюара. 15.4.2. Контейнеры для заморозки и хранения биологических образцов. 15.5. Криобанк ИПКиК. 15.6. Криобанк клеточных культур Национального Научного Центра «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» НААН Украины, г. Харьков. 15.7. Криобанк ННЦ «ИЭКВМ» «Коллекции возбудителей инфекционных болезней животных».

15.1. Определение и назначение криобанка

В этой главе мы рассмотрим структуру, функции и перспективы использования криобанков. Уникальность подобных банков состоит в том, что здесь останавливается «биологическое время», останавливается время для замороженных и хранящихся биологических объектов.

Криобанк – это коллекция тех или иных замороженных биообразцов, долгосрочно хранящихся при низких температурах и сохраняющих на протяжении всего периода хранения свои биологические свойства.

Образцами хранения являются суспензии различных соматических и половых клеток, вирусы, микроорганизмы, фрагменты биологических тканей, образцы ДНК, биологические жидкости, семена, пыльца, меристемальные клетки растений и многие другие биологические материалы.

Как правило, криобанки создаются при крупных научных и клинических центрах для решения конкретных биотехнологических или медицинских задач. Так, например, научно-исследовательские институты, занимающиеся вопросами микробиологии и вирусологии, могут создавать коллекции замороженных штаммов микроорганизмов и вирусов, а крупные сельскохозяйственные центры, специализирующиеся на селекции и разведении домашних животных, создают криобанки половых клеток.

Таким образом, криобанки являются специализированными хранилищами биологического материала для научно-прикладных и медицинских целей. При этом следует учитывать, что данные структуры способны создавать биотехнологии замораживания, тестирования и информационного сопровождения хранящихся образцов.

15.2 Значение криобанков

15.2.1 Сохранение биоразнообразия Земли

Постоянное сокращение численности видового разнообразия биосферы, экологические катастрофы заставляют криобиологов разрабатывать методы криоконсервации клеток животных и растений, содержащих генетическую

информацию конкретных биологических видов. В перспективе, имея запас замороженных биоматериалов (гамет, эмбрионов, меристемальных клеток растений, образцов ДНК и т.п.), возможно воссоздать любые исчезающие биологические виды. Сегодня только криобанки являются надёжным инструментом сохранения генофонда нашей планеты.

Уже существует Всемирное хранилище семян культурных растений на о. Шпицберген в Норвегии, где собран посадочный материал всех растений, существующих в мире (Рис. 15.1). Этот своеобразный криобанк расположен на глубине 120 метров (Рис. 15.2), где постоянно поддерживается температура (минус 18° С), в толще вечной мерзлоты, и получил название «Хранилище Судного дня». Собственное место для семян в этом банке получила каждая страна (Рис. 15.3).



Рис. 15.1. Вход во Всемирное хранилище семян культурных растений «Хранилище Судного дня» на о. Шпицберген (Норвегия) (https://ru.wikipedia.org/wiki/Всемирное_семенохранение)



Рис. 15.2. Помещение Всемирного хранилища семян культурных растений, расположенное в горном массиве на глубине 120 метров. На снимке видны специальные контейнеры с семенами(<http://harmfulgrumpy.livejournal.com/122088.html>)



Рис. 15.3. Образцы семян в упаковке. Семена помещены в запечатанные конверты, которые, в свою очередь, упакованы в пластиковые четырёхслойные пакеты, помещенные в контейнеры. Низкая температура (минус 18° C) и ограниченный доступ кислорода должны обеспечить низкую метаболическую активность и замедлить старение семян (<https://www.smileplanet.ru/norway/khranilishche-sudnogo-dnya/>).

Аналогично криобанку семян растений созданы так называемые «замороженные зоопарки», в них хранятся при температуре жидкого азота половые клетки, эмбрионы и ДНК редких и исчезающих диких животных. Такие центры часто работают при крупных зоопарках, музеях, научных институтах. В мире насчитывается порядка 22 подобных банка, так, например, подобное низкотемпературное хранилище существует на базе Центра биомолекулярных исследований Оксфордского университета, где регулярно подвергают заморозке ткани животных, находящихся на грани вымирания. Аналогичный банк есть в университете Ноттингема (Великобритания), среди хранящихся там образцов – сокоррский голубь, арабский сернобык, жёлтый морской конёк. В Германии такой центр находится при Институте зоологии и исследования диких животных им. Лейбница (Берлин). Здесь сохраняют репродуктивные клетки и зародыши редких видов семейства кошачьих. Сегодня в самом большом «зоологическом банке» в мире, который работает при зоопарке в Сан-Диего, США, хранятся порядка 8400 образцов: ДНК 800 видов зверей, птиц, пресмыкающихся и земноводных.

Учёные считают, что использование современных биотехнологий позволяет «перепрограммировать» соматические клетки, взятые у редких животных, в стволовые и хранить их в замороженном состоянии (Рис. 15.4).

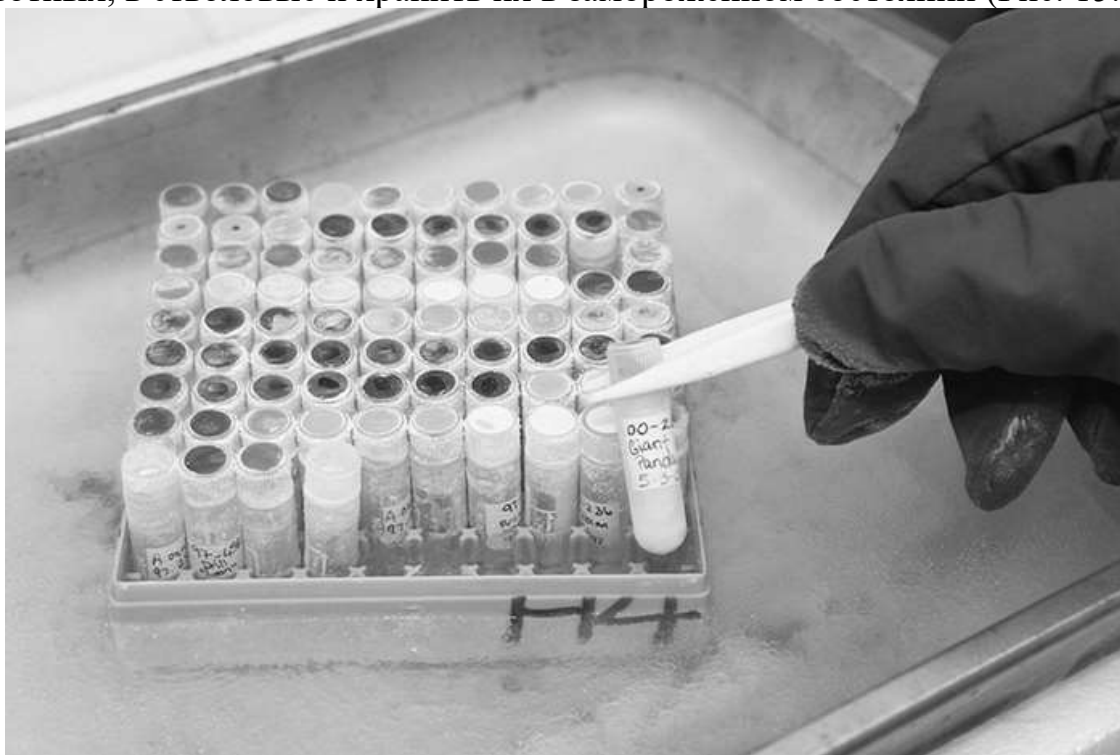


Рис. 15.4. Штатив с криопробирками, в которых находится замороженный репродуктивный материал редких и исчезающих животных; штатив помещён в среду жидкого азота. (https://theoryandpractice.ru/posts/8425-megaprojects_archive)

На основе взятых образцов впоследствии можно создать яйцеклетки и сперматозоиды, а затем воссоздать нужный вид животных. Эта технология

была успешно проверена на свиньях. Делается вывод, что подобным образом, возможно в будущем удастся вернуть к жизни даже давно вымерших животных, например, мамонтов, останки которых находят в вечной мерзлоте.

15.2.2. Обеспечение развития инновационных медицинских технологий

Криобанки играют важную роль в создании перспективных технологий в области диагностики, профилактики и лечения заболеваний человека. Банки, хранящие коллекции образцов, взятых у человека, как правило, называются *биобанками*. Размеры биобанков, состав и объём их коллекций различны. В мире насчитывается несколько десятков крупных биобанков национального масштаба и несколько сотен более мелких.

Коллекции биобанков используются для исследования болезней, причины которых до сих пор не вполне ясны, создания диагностических и прогностических тестов, выявления биомаркеров заболеваний, а также для разработки новых лекарств.

Сохранение биообразцов в биобанках даёт, с одной стороны возможность повторного, с развитием методов анализа, более полного исследования замороженного биоматериала пациента. С другой стороны, позволяет провести необходимый контроль донорского материала, который можно будет накапливать в виде стратегического запаса замороженных компонентов крови, костного мозга и т.д. для использования в дальнейшем, в терапевтических целях или при возникновении экстремальных ситуаций и катастроф.

Создание биобанков — необходимое условие развития персонализированной медицины. Речь идёт, прежде всего, о более точной диагностике, которая основана не только на симптомах болезни, но и на определении генетических данных пациента. Для развития такой диагностики помимо коллекции длительно хранящихся биообразцов, требуется соответствующая база данных с описанием истории болезни, образа жизни, условий труда и других сведений, которые могут быть полезны в установлении причин того или иного заболевания. Ключевыми результатами работы таких биобанков являются идентификация функции генов, установление связей генов и заболеваний, создание новых терапевтических моделей. Приведём несколько примеров.

Одним из направлений исследования биобанка Минобороны США является поиск биомаркеров посттравматического стрессорного расстройства. Большую роль в этом сыграли образцы, полученные у военнослужащих, прошедших через Афганистан и Ирак. Замороженные биообразцы, хранящиеся в биобанке Минобороны США, были обследованы для определения генетических данных пациентов. В результате оказалось, что стрессорные расстройства, возникшие у солдат после участия в военных действиях, совпадают с изменениями в их ДНК. То есть собранный и

замороженный биологический материал позволил выявить показатели, зная которые можно определять и лечить расстройства нервной системы.

Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова Санкт-Петербурга (Россия) обладает уникальной коллекцией замороженных образцов крови людей, переживших блокаду Ленинграда и доживших до наших дней. По имеющимся данным, у переживших блокаду обнаружены одинаковые генетические маркеры модификации генов, совместное действие которых замедляет расход энергии, что, вероятно, помогло им выжить в экстремальных условиях. В этом примере, как и в предыдущем, показана возможность биобанков на основе обследования замороженных биологических образцов устанавливать связь между генами и функциональным состоянием человеческого организма.

15.2.3. Обеспечение биобезопасности населения от инфекций

Антитела или иммуноглобулины — это особые белковые молекулы, которые вырабатывают В-лимфоциты (плазматические клетки крови). Анализ содержания антител в *сыворотке крови* позволяет определить общий уровень иммунитета, диагностировать инфекции, выявить нарушения в работе иммунной системы.

Если анализировать сыворотку крови одного человека, можно оценить состояние иммунитета конкретного пациента. Но если собрать паспортизированную коллекцию сывороток крови населения страны, создать *биобанк сывороток*, то это позволит получать данные о популяционном иммунитете. В работе такого банка используются криотехнологии, и сыворотки хранятся в замороженном состоянии.

В большинстве стран мира в последние годы были созданы Национальные банки сывороток. Эти биобанки позволяют определять риск и степень эпидемиологической опасности распространения на территориях страны социально значимых и опасных инфекционных заболеваний, судить о циркуляции возбудителей новых и возвращающихся инфекций, а также определять национальные потребности в производстве или закупке вакцин. Эта информация позволяет предотвратить потенциальные и реальные биологические угрозы на разных уровнях биориска и обеспечивает эпидемиологическую защищенность населения в масштабах отдельных регионов и всей страны в целом.

Важным аспектом построения эффективной системы биологической защиты является создание глобальной системы мониторинга инфекционной заболеваемости, контроля и прогноза развития эпидемического процесса. Поэтому национальные банки сывороток функционируют в рамках единой международной сети.

В данном разделе главы приведены наиболее важные аспекты использования криобанков. Список существующих и перспективных направлений работы банков, который может быть продолжен:

- создание коллекций вирусов, клеточных линий, используемых в вирусологии, создание биотехнологических продуктов, необходимых для производства гриппозных вакцин и т.д.;

- долгосрочное хранение замороженных штаммов микроорганизмов для нужд технологий, связанных с микробиологией;

- криобанки гамет сельскохозяйственных и домашних животных, которые используются в селекции.

На самом деле все отрасли биологических и медицинских знаний, где необходимо «приостанавливать биологическое время», нуждаются в криотехнологиях, а значит, и в криобанках.

15.3. Организация и структура криобанка

15.3.1. Инфраструктура криобанка и этапы подготовки биоматериала

Инфраструктура криобанка (Рис. 15.5, 15.7) включает в себя:

1. Помещение, в котором находятся низкотемпературные хранилища и холодильники различного объёма и модификации, система контроля температуры и уровня жидкого азота в криохранилищах.

2. Производственный участок, где располагается необходимое оборудование и имеется:

- боксовое помещение, в котором проводится стерильная переработка биоматериала, получение и упаковка биообразцов;

- помещение для заморозки биологических объектов.

3. Аналитическая лаборатория, которая осуществляет контроль и оценивает качество биологического материала на этапе поступления в криобанк, а также анализирует степень сохранности биообразцов после замораживания или хранения при низких температурах.

4. Информационно-аналитический блок, где в виде базы данных накапливается информация о хранящемся биоматериале, а также информация об изменении условий низкотемпературного хранения (температура и уровень жидкого азота в криохранилищах).



Рис. 15.5. Общая схема организации криобанка.

Этапы подготовки биоматериала:

Биологический материал, который поступает на хранение, на первом этапе проходит проверку исходных биологических характеристик (количество жизнеспособных клеток, состав и т.п.), а также, если это необходимо, анализируется возможная инфицированность данного материала.

Затем биологический материал проходит этап переработки и подготовки к замораживанию. Готовятся суспензии клеток и вирусов, фрагменты тканей, специальную обработку проходят семена растений, выделяются нуклеиновые кислоты, биологические жидкости и т.п. В случае, если есть необходимость, добавляются криопротекторы. Полученные биологические образцы помещают в специальные криоконтейнеры (пробирки, пакеты и т.д.).

Следующий этап – замораживание биоматериала с использованием программного замораживателя или по другим разработанным протоколам.

На последнем этапе криоконтейнеры с биообразцами помещаются в специальные металлические штативы, криобоксы, а затем переносятся в криохранилище или холодильник.

Информация о каждом биообразце (наименование, исходные характеристики, адрес хранения и т.д.) вносится в базу данных.

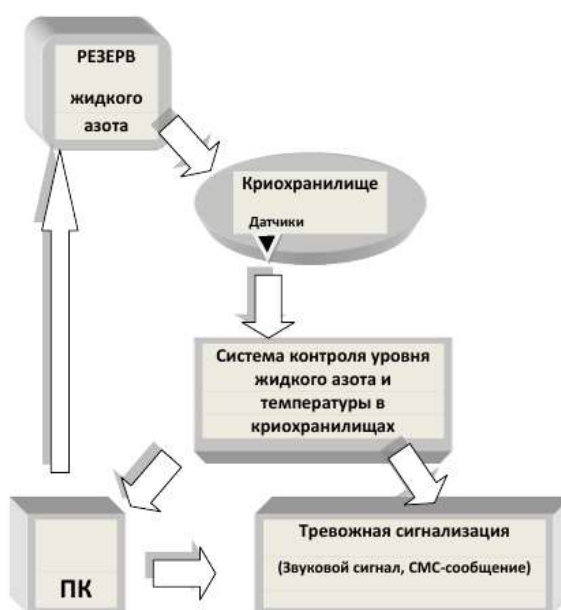


Рис. 15.6. Схема контроля и пополнения криохранилищ жидким азотом. С датчика температуры, расположенного внутри криохранилища, постоянно передаётся информация на системный блок и затем на персональный компьютер. После обработки сигнала, в случае недопустимого снижения уровня азота внутри хранилища, включается тревожная сигнализация и из резервной ёмкости начинает поступать жидкий азот.

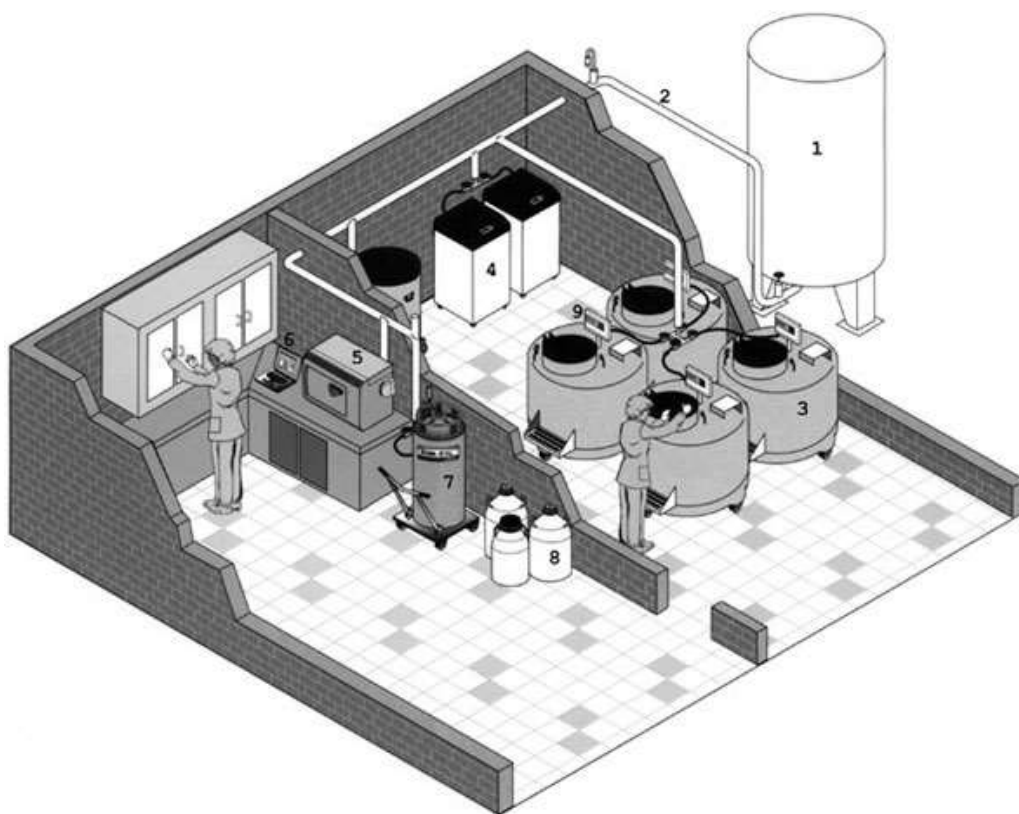


Рис. 15.7. Схема помещений и оборудования криобанка

(<http://www.cryocatalog.ru/freezer/banksh.php>)

1. Резервная ёмкость с жидким азотом, используется для пополнения криохранилищ жидким азотом. 2. Трубопровод для транспортировки жидкого азота из резервной ёмкости в криохранилища. 3. Криохранилища большого объема (500-1000 л) используются для хранения замороженного биологического материала в жидком азоте. 4. Криохранилища среднего объема (150-450 л) для хранения замороженных биообразцов в жидком азоте. 5. Программный замораживатель используется для замораживания биологического материала. 6. Компьютерный центр управления и мониторинга, необходимый для контроля технологических процессов и ведения базы данных криобанка. 7. Баллон с жидким азотом высокого давления, снабжающий программный замораживатель. 8. Переносные сосуды Дьюара, используются для транспортировки жидкого азота и замороженных биологических образцов. 9. Дисплей состояния хранилища (уровень азота, температура, сигнализация).

15.3.2. Система обеспечения безопасности криохранения

Замороженные биообразцы могут находиться в криобанке в течение десятков лет, поэтому важно обеспечивать необходимые температурные условия их хранения. Обычно для этого используются автоматизированные системы, позволяющие контролировать и поддерживать необходимое количество жидкого азота в криохранилищах (Рис. 15. 6).

Каждое криохранилище низкотемпературного банка обычно оборудуется специальными температурными датчиками, информация которых отображается непосредственно на дисплее, расположенном на

хранилище. Также эта информация через системный блок поступает на персональный компьютер (ПК) и накапливается в виде базы данных о состоянии температуры в криохранилищах. В случае необходимости пополнения жидким азотом, команда через ПК поступает к системе, которая в автоматическом режиме обеспечивает поступление азота из резервного хранилища. По достижению необходимого уровня хладагента, система прекращает подачу жидкого азота.

Если возникает аварийная ситуация, когда температура в криохранилищах находится на критическом уровне и не восстанавливается, система включает тревожную сигнализацию и оповещает доступными средствами о необходимости дозаправки жидким азотом.

15.3.3 Развитие принципов организации и структуры криобанков

Расширение сети криобанков различной специализации, увеличение номенклатуры и количества биологического материала, который можно хранить длительное время, - всё это заставляет искать возможности усовершенствования и автоматизации криохранения. При этом будущее криобанков — это *автоматические станции хранения*. Пока это только проекты.

Но в будущем автоматические станции позволят:

- осуществлять автоматическую загрузку, поиск, выборку и выгрузку находящихся на хранении биообразцов;
- за счёт автоматизации технологических процессов и уменьшения влияния человеческого фактора повысить стабильность условий низкотемпературного хранения;
- проводить контроль за образцами и защищать их от постороннего доступа (пароли, штрих-коды);
- с высокой скоростью осуществлять поиск биообразцов в криобанке;
- осуществлять интеграцию с лабораторными роботизированными системами (автоматизированными раскапывающими станциями и другими платформами);
- развивать интеграцию электронных баз данных криобанков с базами данных научно-исследовательских структур, клиник и т.п.

15.4. Оборудование и инвентарь криобанка

15.4.1. Сосуды Дьюара

Основным оборудованием криобанка являются криохранилища или сосуды Дьюара (Рис. 15.8).



Рис.15.8. Схема строения сосуда Дьюара ([https://ru.wikipedia.org/wiki/сосуда Дьюара](https://ru.wikipedia.org/wiki/сосуда_Дьюара))

Данный сосуд имеет двойную стенку и представляет собой как бы две ёмкости, одна из которых, находится внутри другой. Из пространства между стенками откачивается воздух, создаётся вакуум, который и является надёжным термоизолятором. Обычный термос (Рис. 15.9), которым мы пользуемся в быту, устроен как маленькое криохранилище и может хранить не только горячий чай, но также и жидкий азот.



Рис. 15.9. Термос - разновидность сосуда Дьюара (<http://bergner.ua/blog/18/>)

В криобанках сосуда Дьюара заполняются жидким азотом, затем внутрь хранилища помещаются специальные металлические штативы и контейнеры (Рис. 15.10,15.11) с биоматериалом.



Рис. 15.10. Металлические криостаты и контейнеры.
(<http://диаэм.рф/lab/sosudy-dyuara/thermo-labsystems>)



Рис. 15.11. Извлечение из криохранилища металлического штатива
с замороженными биообразцами.

Криохранилища бывают различной конфигурации и объёма. На рис. 15.12 представлено стационарное криохранилище MVE серии Stock (США) и его схема. Хранилища серии Stock позволяют хранить биообразцы как в жидком азоте, так и в его парах.



Рис. 15.12. Стационарное криохранилище MVE 1877P-2T-150 и схема его внутреннего строения. *На схеме внутри хранилища видны криоштативы и контейнеры, в которые помещают биообразцы.*

В зависимости от практических задач, возникающих при работе криобанка, применяются различные по объёму и конфигурации сосуды Дьюара. Для длительного хранения биоматериалов используются стационарные криохранилища объёмом от 35 до 1400л. Также в криобанке имеются транспортные сосуды Дьюара объёмом 3-34л для перевозки замороженных биообразцов и жидкого азота (Рис.15.13).



Рис.15.13.Транспортные сосуды Дьюара фирмы Taylor-Wharton (США) (http://www.stormoff.ru/xt_20/)

Рынок современных криоёмкостей и оборудования для криобанков очень обширен и разнообразен.

15.4.2. Контейнеры для заморозки и хранения биологических образцов

Для полноценного замораживания и низкотемпературного хранения биологического материала используются пластиковые контейнеры различной конфигурации. Чаще всего – это криомешки для замораживания крови и её компонентов и криопробирки для замораживания суспензий клеток различного происхождения (Рис. 15.14).

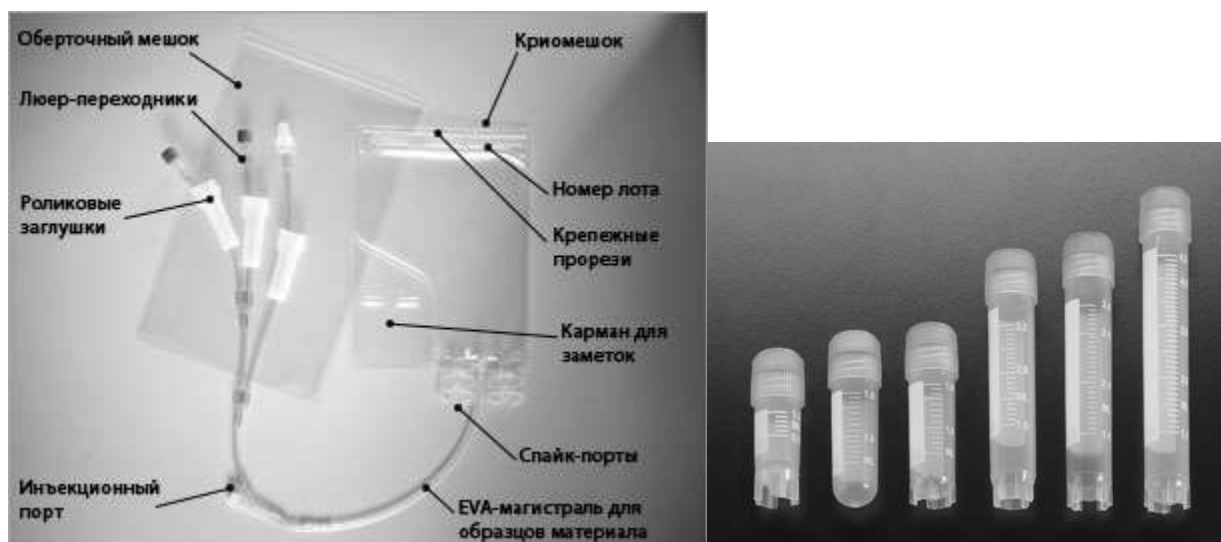


Рис. 15.14. Фото криомешка и криопробирок. Криомешок имеет достаточно сложное устройство, т.к. непосредственно используется в процессе заготовки крови; криопробирки являются просто ёмкостями, которые заполняются биологическим материалом после его заготовки и подготовки к криоконсервированию.

(<http://www.cryocatalog.ru/account/cryomacs.php>)

(<https://biochemmack.ru/catalog/element/14335/38928/>)

Криомешки и криопробирки изготавливают из специального пластика, который выдерживает температуру жидкого азота и совместим с биологическим материалом. Они герметичны, их объём позволяет максимально сохранить биологический материал при замораживании.

Размеры и конфигурация пластиковых контейнеров находятся в соответствии с размерами и конструкцией металлических штативов и контейнеров, размещенных в криохранилищах (Рис. 15.15,15.16).



Рис. 15.15. Металлический штатив с криопробирками. В криопробирках находится замороженный биологический материал; штативы с пробирками хранятся в криохранилище, заполненном жидким азотом.



Рис. 15.16. Криомешок с замороженной кровью. Его после криоконсервации помещают в криохранилище для дальнейшего низкотемпературного хранения (<https://www.krasmama.ru>)

В состав оборудования криобанков входят также различные замораживатели, которые подробно описаны в главе 6.

15.5. Криобанк ИПКиК

В 1972 г, в год создания Института проблем криобиологии и криомедицины, по инициативе член-корр. АН УССР Н.С. Пушкаря, в структуре отдела заготовки органов и тканей с низкотемпературной консервацией был создан низкотемпературный банк биологических объектов (Рис 15.17). Основными направлениями работы банка в то время были заготовка, криоконсервирование и долгосрочное хранение трупного материала, донорского костного мозга, плацентарной крови. Сотрудники банка разрабатывали и внедряли имеющиеся программы криоконсервирования биологических объектов, изучали влияние условий низкотемпературного хранения на сохранность биообъектов, работали над созданием контейнеров для хранения биологического материала, создавали схемы учета и движения криоконсервированных образцов.



Рис 15.17. Помещение низкотемпературного банка ИПКиК НАН Украины. В банке хранятся половые и соматические клетки животных, клетки крови, семена и меристема растений, штаммы микроорганизмов, мицелий грибов, культуры клеток опухолей и многие другие биологические образцы, которые используются в качестве моделей для создания технологий криоконсервирования.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины имеет 45-летний опыт работы в области исследования действия низких температур на биологические объекты различного происхождения и уровня дифференцировки. На основе глубоких фундаментальных разработок сформулированы теории, объясняющие повреждающее действие холода и сопровождающих его факторов на биологические объекты, созданы методы

криоконсервирования многих биологических объектов животного и растительного происхождения, что подтверждается многочисленными научными публикациями и патентами.

По своей научной направленности, методическим подходам в решении научно-практических задач, обеспеченности квалифицированными кадрами институт не имеет аналогов в мире. Уникальные разработки института, созданные передовые биотехнологии опережают зарубежные аналоги в области криобиологии и обеспечивают институту широкое признание научной общественностью, что способствовало созданию при институте кафедры криобиологии под эгидой ЮНЕСКО. Институт является ведущей организацией в Украине по проблемам криобиологии и криомедицины. В настоящее время в криохранилищах банка при температуре жидкого азота (минус 196 ° C) сохраняются криоконсервированные биологические объекты разного происхождения - от биологических соединений и композиционных биологических суспензий до клеток и тканей эукариот.

Уникальность криобанка института состоит в его широкой специализации. Аккумулированный в институте опыт научно-исследовательской работы в этой области позволяет разрабатывать и внедрять современные криотехнологии для работы других криобанков различной, более узкой, специализации (банки гамет, банки растительных объектов, аутобанки кордовой крови, плаценты и др.). Существующий низкотемпературный банк биологических объектов выполняет также информационную функцию своеобразного хранилища (накопителя) научных и практических знаний в области криобиологии и биобанкинга.

Достижения низкотемпературного банка биологических объектов института высоко оценены государством. Так постановлением Кабинета министров низкотемпературный банк ИПКиК НАНУ в 2002 году признан национальным достоянием, этот статус поддерживается и подтверждается и сегодня.

Современные банки биологических объектов – это далеко не только хранилища биоматериалов, это инструмент создания современных наукоёмких биотехнологий в медицине, фармацевтике, сельском хозяйстве.

15.6. Криобанк клеточных культур Национального Научного Центра «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» НААН Украины, г. Харьков.

В Национальном научном центре «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» (г. Харьков), на базе лаборатории биотехнологии усилиями ученых всего института была собрана *Коллекция клеточных культур для ветеринарной медицины и биотехнологии*, которая признана научным объектом, составляющим Национальное достояние Украины.

Создание новых биотехнологий и развитие наиболее перспективных направлений фундаментальных и прикладных исследований в области биологии, вирусологии и ветеринарной медицины невозможно без широкого

использования культур клеток животных и человека. Клеточные культуры необходимы для изучения процессов клеточного деления, для выявления механизмов канцерогенеза и наследственных заболеваний животных и человека, а также для развития новых технологий заместительной терапии и генотерапии различных заболеваний.

Практической вирусологии клеточные культуры нужны для создания диагностических и вакцинных препаратов и проведения диагностических исследований путем выделения возбудителей вирусных инфекций на сертифицированных культурах клеток животных. Эпизоотическое благополучие животноводства во многом зависит от внедрения клеточных культур в практику ветеринарии.

В развитых странах функцию обеспечения эталонными культурами клеток выполняют Национальные коллекции клеточных культур. Наиболее крупными мировыми коллекциями являются Американская коллекция типовых культур (ATCC), Европейская Коллекция клеточных культур (ECACC).

Стремительное развитие биотехнологии, возрастающая ценность клеточных линий с сопутствующим ограничением международного распространения клеток, имеющих практическое применение, стимулировало создание Национальных коллекций клеточных культур в Германии, Англии, Японии, Китае, Франции, Италии, Дании. Поэтому Национальные коллекции становятся сейчас областью государственных и деловых интересов.

В коллекции клеточных культур ННЦ «ИЭКВМ» поддерживаются 38 линий перевиваемых клеток 18-ти видов животных, которые паспортизированы и внесены в каталог.

Клеточные культуры Коллекции хранятся при температуре жидкого азота (минус 196°C) с 1983 года по настоящее время. Национальная коллекция клеточных культур является некоммерческим автономным неприбыльным объектом, получающим целевое Государственное финансирование.

Криобанк клеточных культур ННЦ «ИЭКВМ» выполняет следующие функции:

1. Сохранение биоразнообразия соматических клеток животных путем постоянного расширения состава коллекционных линий разного видового и тканевого происхождения;
2. Регулярное обеспечение научных и прикладных исследований эталонным охарактеризованным, стерильным клеточным материалом.
3. Депонирование и длительное хранение уникальных клеточных линий, имеющих ценные свойства для страны, изучение влияния длительного хранения на их качество;
4. Отбор и селекция клеточных линий, чувствительных к вирусам, для использования их в производстве иммунобиологических препаратов и создания новых методов для диагностики вирусных инфекций;

5. Обеспечение качественным клеточным материалом санэпидстанций ветеринарно-диагностических лабораторий и биофабрик Украины;

6. Создание криобанка стволовых клеток животных.

Но возможны трудности, связанные с использованием клеточных линий. Наблюдаются случаи, когда обмен клеточными линиями между разными лабораториями приводил к загрязнению одних штаммов и линий клеток клетками других штаммов и линий.

Бактериальные и грибковые загрязнения создают определенные проблемы, но они легко выявляются и приводят к менее серьезным последствиям, чем незаметное заражение микоплазмами. Поэтому одной из функций Коллекции является изучение стабильности свойств культур в процессе длительного хранения в жидком азоте.

Ежегодно 8-12 штаммов и линий клеток рекультивируются после размораживания. При этом определяется процент жизнеспособных клеток, пролиферативная и митотическая активность, модальный класс хромосом, отсутствие микоплазма-контаминации. Проводится изучение биологических и описание морфологических свойств культур.

Культуры клеток, полученные из других лабораторий или от авторов, размножают для получения первого пробного материала, который должен быть охарактеризован по таким показателям как: проверка на контаминацию посторонними вирусами, микоплазмами и т.д.; проверка видовой принадлежности, с использованием молекулярно-генетических и кариологических методов; эффективность клонирования, тесты на культурально-морфологические показатели. Эти клетки составляют эталонный запас. Дополнительно размножаются клетки для выдачи в другие учреждения - "рабочий запас". По мере его использования из эталонного запаса клетки рассеивают для дальнейшего размножения (Рис 15.18).



Рис 15.18. Культуры клеток коллекции, которые культивируются в термальной комнате после размораживания.

Очень важно отделить эталонный запас, который служит резервом для пополнения рабочего запаса. В ином случае частые замены культивированного материала, могут привести к сокращению ценного "эталонного" запаса, который трудно, а иногда невозможно восстановить. Если придерживаться такого правила работы с культурами клеток, то можно избежать проблем, связанных с генетической нестабильностью, старением и трансформацией.

Способы консервирования клеточных культур в жидком азоте

Повреждения клеток, происходящие при замораживании и оттаивании клеточных линий обусловлены, в первую очередь, образованием внеклеточных и внутриклеточных кристаллов льда, а также нарушением осмотического гомеостаза. Добавление криопротекторов, а также оптимальные режимы замораживания и оттаивания сводят повреждения клеток к минимуму.

Возможно кратковременное сохранение замороженных клеток в низкотемпературном холодильнике при минус 70°C, но оптимальные условия достигаются при хранении в жидком азоте, либо в его парах. Метод замораживания в жидком азоте имеет преимущество не только из-за низкой температуры, обеспечивающей прекращение метаболизма в клетке, но и вследствие отсутствия риска механического повреждения клеток.

Методики криоконсервирования клеточных культур в жидком азоте

Для сохранения клеток животного происхождения в жидком азоте используются перевиваемые клеточные линии, первичные, диплоидные культуры клеток и субкультуры.

Приготовление клеточной суспензии. Первично-трипсинизированные клеточные суспензии готовят с помощью метода дробной трипсинизации. Монослойные культуры клеток первичные, диплоидные, перевиваемые, выращенные в матрасах, просматривают под малым увеличением микроскопа и отбирают те из них, которые находятся в хорошем морфологическом состоянии. Клетки снимают со стекла смесью растворов версена (0,02%) и трипсином (0,25%) в соотношении 9:1. Для этого из матрасов с выросшим монослоем клеток удаляют питательную среду, в них вносят подогретый до 36°C диспергирующий раствор и помещают в термостат на 5-10 минут при 37°C, за это время матрасы несколько раз покачивают. Как только клетки в результате действия диспергирующего вещества начнут отделяться от стекла и переходить в среду, матрас осторожно встряхивают и клетки полностью отслаиваются от стекла. Для того, чтобы прекратить действие версена и трипсина на клетки, к суспензии добавляют 2-3% сыворотки крупного рогатого скота. Суспензию клеток из матрасов собирают в один сосуд, измеряют объем суспензии для подсчета клеток. Взвесь клеток помещают в центрифужные стаканы и центрифугируют 10 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок клеток ресуспендируют в защитной среде.

Криопротекторы. Все криозащитные вещества применяемые при криоконсервировании клеток делятся на проникающие в клетку, связывающие воду эндо- и экстрацеллюлярно, и не проникающие, действующие лишь экстрацеллюлярно. Хотя это разделение достаточно условно. Например, глицерин может проникать в клетку, если его добавлять при комнатной температуре, или не проникать, если его добавлять при температуре 0°C.

Для криоконсервации клеточных культур используют такие криопротекторы, как диметилсульфоксид (ДМСО), различные сахара, глицерин, этиленгликоль и их производные. Действие криопротекторов состоит в снижении количества свободной воды, повышении вязкости раствора. Классическими криопротекторами являются глицерин, а также диметилсульфоксид (ДМСО), быстро проникающие в клетки и наиболее прочно связывающие воду внутри и вне ее. Используют также поливинилпирролидон (ПВП), полиэтилен оксид (ПЭО) и другие криопротекторы. Механизмы защитного действия этих веществ основаны, главным образом, на их способности создавать прочные связи с молекулами воды, более прочные, чем связи молекул воды между собой, что препятствует формированию правильной кристаллической решетки льда и замедляет рост кристаллов.

Режимы замораживания и оттаивания клеточных суспензий.

Перевиваемые клеточные линии животного происхождения криоконсервируют, применяя различные режимы замораживания в зависимости от их вида. Каждая клеточная линия имеет свой индивидуальный режим криоконсервирования разработанный криобиологами и оптимальный именно для этого вида клеточных культур, который позволяет максимально сохранить их жизнеспособность и биологические свойства. В качестве примера приведем 2 режима замораживания разных видов клеточных культур:

1) Осадок клеток, полученный после центрифугирования, разводят защитной средой до концентраций оптимальных для каждого вида клеточных культур (от 0,8 - 3,5 до 5) × 10⁶ в 1 см³, полученную взвесь клеток разливают в криопробирки емкостью (от 1,5-2,0 до 5 см³) с соблюдением правил асептики. После чего криопробирки и держат в холодильнике при 4°C в течение 1-2 часов (для контакта клеток с консервантами – процесс инкубации). Охлаждение криопробирок от 4°C до минус 156°C проводят в парах жидкого азота с последующим погружением в жидкий азот.

Замораживание суспензий некоторых других видов клеток осуществляют по 2-ступенчатому режиму понижения температуры от 0 до минус 30°C со скоростью 1 градус в минуту, от минус 30°C до минус 70°C со скоростью 4-6 град в минуту. Для этого пользуются программные замораживатели. Охлажденные до минус 70°C криопробирки с суспензией клеток помещают на хранение в сосуды Дьюара с жидким азотом в специальных кассетах.

В случае необходимости ампулы с замороженными клеточными суспензиями извлекают из сосудов Дьюара и для оттаивания помещают в водяную баню с температурой 37°C. Оттаянную суспензию клеток переносят из ампул в матрасы, в которые вносят небольшое количество ростовой среды. Одновременно производят подсчет сохранных клеток в камере Горяева с красителем (трипановым синим) и концентрацию клеток доводят средой до посевной концентрации также индивидуальной для каждого вида клеточных культур в 1 см³. Это количество суспензии разливают по 50 см³ в матрас емкостью 0,5 литра. Через сутки роста клеток в матрасах производят смену среды для удаления криозащитного вещества. Монослой клеток обычно формируется на 3-4 сутки.

Сохранность клеток. Жизнеспособность клеток при длительном хранении различна и зависит от вида культур клеток. Так, в среднем процент сохранения жизнеспособности перевиваемых клеток колеблется от 60 до 97%, субкультур – 65%. Наименьший процент живых клеток (30-45%) отмечается при хранении первично-трипсинизированных суспензий.

Размороженные клетки восстанавливаются в среднем в течение 3х пассажей, начиная с 4 пассажа формируют монослой примерно в те же сроки, что и до замораживания. В течение последующих 5-10 пассажей они в зависимости от условий культивирования снимаются со стекла и пересеваются. Восстановленные после размораживания культуры клеток сохраняют исходные морфологические признаки лишь при оптимальных режимах их замораживания, хранения и размораживания. Лишь в этом случае длительное хранение в жидком азоте (до 30 лет) не оказывает отрицательного влияния на стабильность кариотипа, культурально-морфологические характеристики и биологические свойства перевиваемых клеточных линий. Жизнеспособность клеток таких культур после длительного хранения и размораживания составляет от 60 до 80%.

Большое значение имеет контроль качества размороженных используемых культур клеток и тканей, которые, являясь живыми биологическими объектами, постоянно подвергаются воздействию неблагоприятных факторов криоконсервирования хранения и оттаивания.

Транспортировка криопробирок с культурами клеток в жидком азоте

Криопробирки с культурами клеток переносят в специальный термос или сосуд Дьюара емкостью 2, 5, 10 или более литров и перевозят любым видом транспорта. Главное условие - в период транспортировки в сосуде Дьюара должно быть достаточное количество жидкого азота. Кроме того криопробирки с замороженными клетками можно транспортировать в течение 1-24 часов в упаковке с сухим льдом (минус 70°).

На каждую клеточную культуру, отправляемую по запросу, выдается паспорт установленного образца. Восстановление клеток, выращенных и транспортируемых во флаконах, проводят следующим образом: обработанный спиртовым тампоном флакон вскрывают, сливают средо-наполнитель и вносят 30-40 мл 0,2% раствора версена, подогретого до температуры 35-37°C. Через 3-5 минут, по мере "набухания" монослоя,

версен сливают и флакон помещают в термостат до полного снятия клеток от стекла. Затем клетки суспендируют в 15-20 мл питательной среды, подсчитывают количество живых клеток во взвеси и переносят ее в посевные емкости. Посев клеток проводится из расчета количества сохраненных клеток в культуре. При относительно благоприятных условиях транспортировки (время в пути 7-8 дней) клетки сохраняют жизнеспособность до 80%.

Для накопления клеточной культуры и адаптации ее к тем условиям культивирования, которые приняты в лаборатории, необходимо провести два-три пассажа. Состав среды культивирования должен соответствовать тому составу, который указан на этикетке, т.е. среде на которой данная культура клеток культивировалась до транспортировки. При необходимости перевод клеточных культур на среду нового состава следует проводить постепенно. Если доставлены замороженные клетки, то их размораживание и дальнейшее культивирование проводят по методам, которые описаны выше.

15.7. Криобанк ННЦ «ИЭКВМ» «Коллекции возбудителей инфекционных болезней животных»

В настоящее время в ННЦ «ИЭКВМ» собрана большая «Коллекция возбудителей инфекционных болезней животных». Среди них имеются возбудители бактериальной и вирусной природы.

Возбудители вирусной природы.

Институт имеет большую коллекцию патогенов вирусного происхождения, которая насчитывает более 160 штаммов. Каждое подразделение института имеет разрешение на работу со штаммами соответствующей группы, а движение штаммов и правила работы с ними регулируются согласно действующих ДСП 9.9.5.035-99 Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности, ДСП 9.9.5.064-2000. Порядок выдачи разрешений на работу с микроорганизмами I - IV групп патогенности и рекомбинантными молекулами ДНК, ДСП 9.9.5.080-2002.

В лаборатории биотехнологии разработаны биобезопасные технологии криоконсервирования, сохранения и оттаивания вирусных патогенов. Созданы электронные базы данных учета вирусных патогенов и проведена паспортизация патогенов вирусного происхождения. По паспортным данным в ННЦ «ИЭКВМ» насчитывается 164 патогена вирусного происхождения и том числе в отделе изучения болезней птицы - 92; лаборатории вирусологии - 12; лаборатории биотехнологии - 12; лаборатории болезней свиней - 48.

Штаммы вирусов, в зависимости от их криоустойчивости, хранятся при температурах от минус 70°C в низкотемпературных морозильниках до минус 196°C.

Коллекция патогенов вирусного происхождения является составной частью «Коллекции из возбудителей инфекционных болезней животных», которая распоряжением кабинета министров от 28.08.2014 года отнесена к объектам Национального достояния.

Криоконсервирование вируса герпеса птиц

Вирусы герпеса птиц – это клеточно связанные вирусы, очень нестойки к воздействию факторов внешней среды, особенно к температурному

фактору, поэтому для продолжительного их сохранения разработан и используется способ криоконсервирования в жидком азоте. Разработаны оптимальные условия для замораживания и хранения культур клеток для накопления вирусной биомассы, и клеточно связанных штаммов вируса болезни Марека (ВБМ).

Поскольку ВБМ является клеточно-связанным, антигенные и иммуногенные свойства живой вирусвакцины зависят от жизнеспособности клеток, в которых репродуцируется вирус. Поэтому разработаны оптимальные протоколы криоконсервирования и хранения компонентов вирусвакцины в жизнеспособных клетках фибробластов эмбрионов кур.

Применение быстрой, со скоростью 300-400° в минуту, программы криоконсервирования с использованием поддерживающей среды и поддерживающей среды с добавлением 10% димексида не обеспечивало сохранности инфицированных клеток выше 30%. Максимальная сохранность инфицированных клеток криоконсервированных с применением быстрой программы и среды консервирования, включающей 199 питательную среду с добавлением 10% инаktivированной сыворотки крови к.р.с. и 10% димексида, составляла 33,7%. Применение димексида в концентрации 15% в составе той же криозащитной среды вызывало тенденцию снижения инфекционной активности вируса.

Коллективом авторов был разработан способ консервирования вирусов болезни Марека, который заключается в применении двухэтапного режима замораживания вируссодержащих суспензий - до минус 70°С со скоростью 5-10° в мин с последующим погружением в жидкий азот в составе защитной среды с добавлением 10% диметилсульфоксида.

Сохранность вирусов после криоконсервирования.

Сохранность ультраструктуры вирусных частиц после замораживания и длительного хранения в жидком азоте контролировали с помощью электронного микроскопа, с использованием методов негативного контрастирования и ультратонких срезов. Было установлено, что сохранность морфологии зависит от таксономического положения вирусов, применяемых режимов замораживания и хранения, состава среды консервирования. Показана возможность успешного криоконсервирования вирусных суспензий без криозащитных добавок за счет подбора оптимального режима замораживания.

Электронно-микроскопические исследования показали разрушение структуры вирионов, а также наличие повреждений капсида и суперкапсидной оболочки вирусов, криоконсервированных по неоптимальным программам. Степень повреждений вирионов коррелирует со снижением инфекционной активности вирусов.

Оболочечные вирусы (например, вирусы гриппа птиц), как правило, более чувствительны к замораживанию, чем безоболочечные. Однако, даже некоторые безоболочечные вирусы, например, вирус диареи крупного рогатого скота, плохо переносят хранение в условиях умеренно-низких

температур (минус 20°) С и снижают или теряют свою инфекционную активность при длительном хранении в данных условиях.

Возбудители бактериальной природы.

В «Коллекцию возбудителей инфекционных болезней животных» ННЦ «ИЭКВМ» входят также и возбудители бактериальных болезней животных.

Штаммы бактерий Коллекции, например, сальмонелл, стафилококков, кишечной палочки сохраняются в холодильниках в условиях гипотермии при температуре 4°С. Возбудители туберкулеза животных штаммы (*Mycobacterium bovis*) сохраняются тоже при температуре 4°С в течение года без изменения их биологических свойств. Рекультивирование штаммов для получения туберкулина с целью диагностики туберкулеза животных с помощью кожно-аллергической пробы после их длительного хранения в условиях гипотермии проводят на среде Павловского.

Патогены животного происхождения, которые выдерживают процедуру лиофилизации, например, некоторые штаммы возбудителей бруцеллеза, хламидиоза и микоплазмоза животных сохраняются в лиофилизированном состоянии также в условиях холодильника при 4°С.

В этом случае режимы лиофилизации вышеупомянутых штаммов предусматривают их замораживание до температуры минус 55°С с экспозицией при этой температуре в течение двух часов и последующим понижением до минус 70°С. Высушивание из замороженного состояния происходит до температуры плюс 25°С в течение трех часов в пенициллиновых флаконах под вакуумом. Длительность сохранения биологических свойств зависит от вида возбудителя и прописана в соответствующих технологических регламентах

Для целей биотехнологии производства диагностических препаратов, а также вакцин для профилактики вышеупомянутых инфекций рекультивирование бактерий проводят на специальных средах в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП), которые разрабатывает каждое подразделение института отдельно.

Бактериальная часть Коллекции ННЦ «ИЭКВМ» состоит более чем из 400 возбудителей, которые сохраняются в соответствующих подразделениях института при температуре 4°С. Каждое подразделение института имеет разрешение на работу со штаммами соответствующей группы, а движение штаммов и правила работы с ними регулируются согласно действующих строгих правил техники безопасности.

Рекомендуемая литература:

1. Амстиславский С.Я. Замороженный зоопарк. Введение в криоархивирование Наука из первых рук -2013. - №5/6(53/54). – С.34-45.
2. Ю.Смирнова. Банковское дело как путь к персонифицированной медицине. [Интернет ресурс]. URL: <http://www.nkj.ru/archive/articles/21579/>

3. Еропкин М.Ю. Биобанки и их роль в системах биобезопасности, здравоохранения, биотехнологии, экологии и «экономике знаний» [Интернет ресурс]. URL: <http://www.influenza.spb.ru/files/publications/rrii-epub-biobanks-2015>.
4. Грищенко В.І., Висеканцев І.П., Кудокоцева О.В. та інш. Обладнання низькотемпературного банку біологічних об'єктів та умови довгострокового зберігання біологічних об'єктів у низькотемпературному банку: Метод. рекомендації ІПКіК НАН України. – Х., 2004.- 14с.
5. Чижевський В.В., Висеканцев І.П., Грошевой М.І. Оптимізація умов зберігання біологічного матеріалу в низькотемпературному банку// Сучасні аспекти репродуктології, перинатальної медицини та кріобіології. - 2003.- С.242–247.
6. Чижевский В.В., Грошевой М.И., Прокопюк О.С., Беспалов А.А. Криогенное хранилище: геометрия температурного поля и оптимизация условий хранения биоматериалов// Цитология. - 2004. - Т.46. - №9. - С.881 – 882.
7. Чижевский В.В., Грошевой М.И., Прокопюк О.С., Беспалов А.А. Исследование особенностей использования парового низкотемпературного хранилища для долгосрочного хранения биологического материала// Проблемы кріобіології. - 2006. - Т.16, №2. - С.132 - 134.
8. Особенности криоконсервирования клеток, инфицированных вирусами / М.Ю. Стегний, И.Л. Дикий, Б.Т. Стегний// Експериментальна і клінічна медицина. – 1999. – №2. С. 111-113.
9. Сергеев В.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии [Текст] / В.А. Сергеев, Ю.А. Собко. – К.: Урожай, 1993. – 151 с.
10. Стегний Б.Т. Сравнительное изучение криозащитного эффекта различных криопротекторов для культур и тканей [Текст] / Б.Т. Стегний // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тезисы докладов научной конференции. – Владимир, 1986. – С. 50-52.
11. Спосіб консервування вірусу хвороби Марека (№ заявки 20040503887) Деклараційний патент 4912. Бюл. №2. 15.02.2005. Стегній М.Ю., Стегній Б.Т., Заремба О.В.
12. Фрешни Р. Культура животных клеток: методы [Текст] / Р. Фрешни. – М.: Мир, 1989. – 332 с.
13. Стегний М.Ю., Семенченко А.Ю. Анализ белков вируссодержащих суспензий, хранившихся в условиях умеренно-низких температур./ Проблемы кріобіології -2004, №2.- С.71-75.
14. Стегний М.Ю. Изучение биологических свойств вирусов парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи крупного рогатого скота при различных режимах хранения./

Ветеринарна медицина Міжвідомчий темат. наук.зб., 2004 - №84.С.695-699.

15. Стегний М.Ю. Влияние продолжительности хранения вирусов в условиях умеренно-низких температур на их ультраструктуру и биологическую активность / Експериментальна і клінічна медицина – 2004. №2.С.68-71.
16. Стегний М.Ю., Стегній Б.Т. Морфологические и биологические особенности вирусов после криоконсервации и хранения в условиях умеренно-низких температур /Материалы конференции «Сохранение генетических ресурсов».Санкт-Петербург (19-22 октября 2004) Цитология. 2004.Т.46. №9. С.68-71.
17. Стегний М.Ю. Изучение влияния режимов замораживания и хранения штаммов вируса диареи на стабильность нуклеотидных последовательностей их генома методом ПЦР/ Ветеринарна медицина Міжвідомчий темат. наук.зб., 2005 - №85.С.1026-1032.
- 18.Стегній М.Ю. Исследование РНК штаммов вируса диареи, подвергнутых воздействию низких температур /Проблемы криобиологии, 2005. Т.15. №3. С.276-278./

Часть 2. Кробиология растений

Глава 16. Холодоустойчивость растений

16.1. Особенности организации клеток растений. 16.2. Стресс и приспособительные реакции растений. 16.2.1. Стресс. 16.2.2. Адаптация. 16.2.3. Акклимация. 16.2.4. Акклиматизация. 16.3. Холодоустойчивость. Морозоустойчивость. Закаливание. 16.3.1. Холодоустойчивость. 16.3.2. Морозоустойчивость. Закаливание.

16.1. Особенности организации клеток растений

Немецкие ученые М. Шлейден и Т. Шванн создали основополагающую для всей биологии клеточную теорию. Эта теория утверждает, что все организмы, как растительные, так и животные, начиная с низших и заканчивая самыми высокоорганизованными, состоят из простейших элементов – клеток. Это было одним из великих открытий XIX в.

На нашей планете в настоящее время сосуществуют представители нескольких царств живых существ. Несмотря на значительное различие в строении и образе жизни, очевидно, что между ними сходств больше, чем различий, и все они имеют общих предков. Это наглядно подтверждается строением клеток эукариот (Рис.16.1., табл.16.1) и функциями клеточных органелл.

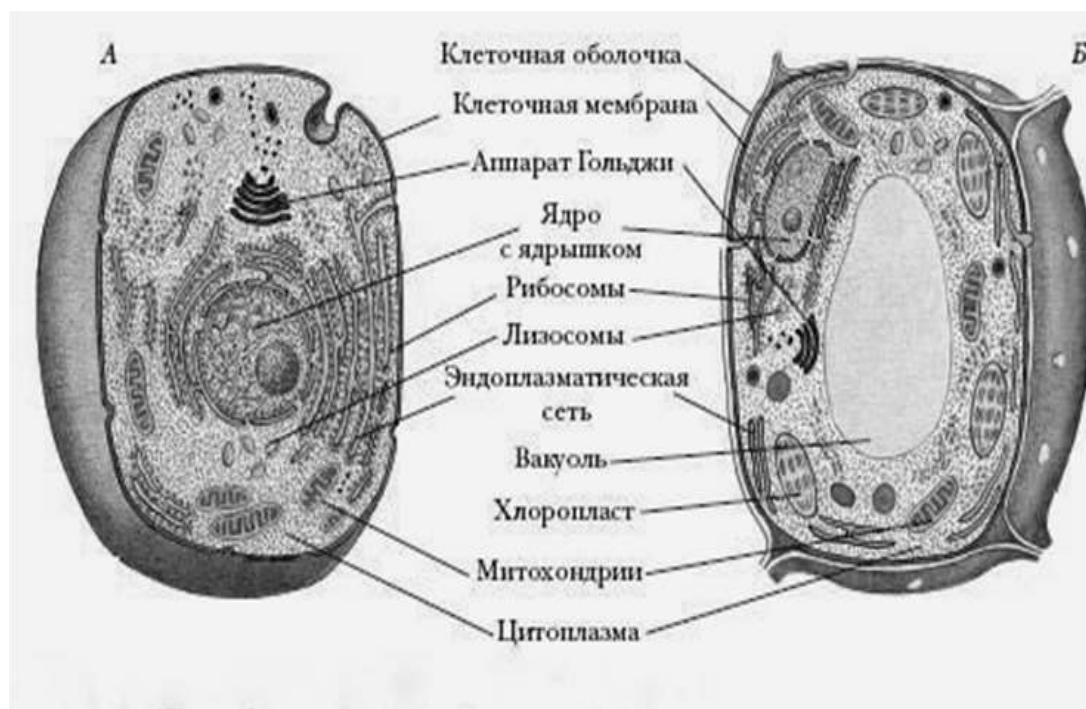


Рис. 16. 1. Схема строения животной (А) и растительной (Б) клеток

Таблица 16.1. Сходство и различия клеток животных и растений

Строение клетки	Клетка животных	Клетка растений
Форма	округлая (неправильной формы)	разная (фиксированная форма)
Клеточная стенка	нет	есть
Ядро	есть	есть
Вакуоли	одна или несколько мелких вакуолей (намного меньше, чем у клеток растений)	одна большая центральная вакуоль, занимает 90% от объема клетки.
Пластиды	нет	есть
Цитоплазма	есть	есть
Лизосомы	есть	есть
Микротрубочки/микрофиламенты	есть	есть
Эндоплазматическая сеть	есть	есть
Рибосомы	есть	есть
Митохондрии	есть	есть
Аппарат Гольджи	есть	есть
Клеточная мембрана	есть	есть
Жгутики	можно найти в некоторых клетках	можно найти в некоторых клетках
Реснички	есть	очень редко
Центриоли	есть	присутствуют у низших растений

Однако у растительных клеток есть свои специфические признаки, в частности, наличие клеточной стенки, пластид и крупных вакуолей. Эти структуры могут обуславливать особенности реакции растений на охлаждение и замораживание.

16.2. Стресс и приспособительные реакции растений

16.2.1. Стресс

Термин «стресс» в физиологию и психологию впервые ввел У. Кэннон в 1932 году. В дальнейшем благодаря Г. Селье этот термин получил широкое применение. Он определил «стресс» как совокупность всех неспецифических изменений, возникающих в организме под влиянием любых неблагоприятных и повреждающих факторов. Предложенный термин стал популярен, поскольку позволяет одним словом объединять воздействие любых повреждающих факторов, в том числе низкотемпературный стресс, на любой организм. Понятие «стресс» впоследствии было перенесено в физиологию растений и сформировало самостоятельное направление в науке «стресс-физиология растений», а комплекс метаболических перестроек у растений назван *фитострессом*. В фитофизиологии термин «стресс» используется в двух разных аспектах:

- служит синонимом слову «воздействие» (стрессовое воздействие, стрессовый фактор, стрессовые нагрузки, индуцированный стресс и т.д.), если стресс отражает количественную сторону раздражителя;

- в случаях, когда, например, говорят о водном, солевом или окислительном стрессе, то под стрессом понимают целый комплекс ответных неспецифических и специфических реакций растения.

Одним из важных понятий в стресс-физиологии растений является *холодовой (низкотемпературный) стресс*, возникающий либо при пониженных положительных температурах, или при температурах ниже 0°C. Способность растения переносить холодовой стресс, не снижая своей продуктивности, называется *холодоустойчивостью* или *толерантностью к холоду*.

16.2.2. Адаптация

Любой живой организм, в том числе и растения, обладает способностью к защите от действия неблагоприятных факторов среды. Эта функция появилась одновременно с возникновением первых живых организмов и в ходе эволюции развивалась и совершенствовалась. Устойчивость растений к действию стресса обеспечивается *адаптацией* (приспособлением). Адаптация и устойчивость взаимосвязаны, поскольку адаптация отражает устойчивость растений к условиям среды обитания и одновременно является процессом их приспособления к изменениям окружения. На каждой стадии развития способность растений адаптироваться к неблагоприятным условиям (низкая температура, засуха, засоление почвы и т.д.) выражена в разной степени и сопровождается глубоким изменением обменных процессов; определяется быстротой и глубиной их изменения без нарушения согласованности между отдельными функциями всего организма. Эволюционные (филогенетические) адаптации наиболее надежны, так как возникают на основе генетических мутаций и отбора, передаются по наследству, т.е. осуществляют, по сути, «подгонку» организма к условиям обитания и, в конечном счете, определяют жизнедеятельность организма и его выносливость.

16.2.3. Акклимация

Поскольку изменения окружающей среды происходят довольно быстро, у растений не всегда достаточно времени для эволюционных изменений. В этом случае растениями используются не постоянные, а индуцируемые стрессором защитные механизмы, формирование которых генетически предопределено (*детерминировано*). Защитные механизмы затрагивают все изменения в экспрессии генов, метаболизме, физиологических функциях и гомеостазе, что позволяет растениям приспосабливаться к новым стрессам. Ответные реакции растений в этом случае называются *акклимацией*. Иными словами, если говорить о холодовом воздействии, то это, по сути, закаливание растений, во время которого закладываются механизмы адаптации. При закаливании проявляется

неспецифическая устойчивость, поэтому закаливание к одному агенту может повышать устойчивость и к некоторым другим типам стрессов.

16.2.4. Акклиматизация

Помимо понятия «*акклимация*» некоторые авторы используют понятие «*акклиматизация*», подразумевая в данном случае такой адаптивный процесс, при котором организм приспосабливается к изменению нескольких параметров окружающей естественной среды, в то время как акклимация – это приспособление, наблюдаемое в лабораторных условиях, где все параметры среды, за исключением какого-то одного, поддерживаются на неизменном уровне.

Основное отличие адаптивных реакций от генетической адаптации состоит в том, что они протекают исключительно на фенотипическом уровне. Для приспособления организма к изменениям среды в этом случае может использоваться только та информация, которая уже содержалась в его геноме с самых первых дней жизни.

Холодовая реакция растений – очень сложный процесс, который затрагивает все уровни организации растения. Идентификация ключевых механизмов, лежащих в основе холодового стресса, и более глубокое понимание реакций растений на него, являются основной базой для повышения урожайности сельскохозяйственных и промышленно важных растений, а также выведения новых сортов с более высоким уровнем холодовой агрономической толерантности. Разработанные растениеводами современные устойчивые к холоду сорта пшеницы и масличных культур не намного лучше тех сортов, которые были выведены более ста лет назад.

16.3. Холодоустойчивость. Морозоустойчивость. Закаливание.

16.3.1. Холодоустойчивость

Холодоустойчивость – это способность организмов развиваться в условиях пониженных температур, но не ниже температур замораживания. Растения – филогенетически гетерогенная группа организмов с широким ареалом распространения в природе. Основными детерминантами, определяющими их рост и развитие, являются доступность воды, света и температура окружающей среды. Только одна треть общей площади суши свободна ото льда, а некоторые ее регионы (около 42%) регулярно испытывают снижение температуры ниже минус 20°C или повышение выше 50°C. В таких условиях растения выработали специализированные механизмы для выживания, например, криопелагические водоросли, обитающие во льдах Арктики, и водоросли горячих источников; растения тропических и полярных широт. Поэтому очевидно, что оптимальные условия существования для разных видов растений не могут быть одинаковы, и то, что вредно для одного растения, не может быть стрессом для другого.

Способность растений переносить низкие положительные температуры называется *холодоустойчивостью*, степень которой обычно зависит от комбинации величины снижения температуры, ее скорости и продолжительности воздействия.

Традиционными примерами толерантных сельскохозяйственных культур, переносящих температуру 5°C, являются ячмень, овес, яровая и озимая пшеница, лен, гречиха, картофель, томаты и т.д. К теплолюбивым растениям относятся сорго, огурцы, кабачки, соя, дыня, бананы и т.д. Установлено, что к пониженным температурам у теплолюбивых растений устойчивость варьирует от растения к растению, а также зависит от времени суток – максимальная наблюдается в темновой фазе фотопериода. Органы и ткани растений отличаются разной чувствительностью к холоду: у одних в первую очередь повреждаются листья (огурец, фасоль); у других – стебель (кукуруза, гречиха), цветки (томат), корневая система (арахис). Наиболее часто кратковременное снижение температуры до 10...15°C у теплолюбивых растений приводит к стерильности пыльцы во время цветения, абортации цветка, потере тургора у листьев, ухудшению роста саженцев, всхожести семян. Более длительное воздействие пониженных температур на теплолюбивые растения (48 – 72 часа) сопровождается визуально фиксируемыми фенотипическими изменениями, а именно, увяданием и хлорозом (пожелтение) листьев, некрозом тканей и, как следствие этих изменений, гибель всего растения.

Растения, как и все живые организмы, воспринимают и обрабатывают информацию из окружающей среды на клеточном уровне, с помощью различных рецепторов активизируют нисходящие сигнальные каскады в ответ на холодостресс. Ответные реакции клеток на действие стресса интегрируются в ответ целого растения, регулирование и координация функциональной активности при этом осуществляются связанными между собой генетической, метаболической и мембранной системами.

Роль мембранных липидов. Первопричиной устойчивости или чувствительности клеток растений к охлаждению являются изначальные различия в составе ненасыщенных жирных кислот, входящих в мембранные фосфолипиды. Так, у чувствительных к холоду растений в составе мембранных липидов доминируют пальмитиновая и стеариновая кислоты. Мембраны такого типа характеризуются тем, что стремятся к затвердеванию даже при положительных температурах, теряя свою эластичность, что приводит к увеличению проницаемости мембраны. Из-за этого в клетке происходят различные неблагоприятные изменения: из клетки в окружающую среду выходят различные вещества, нарушается структура митохондрий и пластид, что в свою очередь приводит к подавлению фотосинтеза и аэробного дыхания. Далее нарушается согласованность работы ферментов, в результате чего в клетке начинают накапливаться всевозможные токсичные вещества (этанол, ацетальдегид и др.).

Структура мембран у холодоустойчивых растений более стабильна, поскольку содержит больше ненасыщенных жирных кислот (линоленовой и

линолевой кислоты), а наличие ферментов десатураз обеспечивает даже при пониженных температурах превращение насыщенных липидов мембраны в ненасыщенные.

Белки холодового шока. При холодовом воздействии растениями синтезируются стрессовые белки холодового шока, этот процесс имеет временный характер. Например, в проростках озимой пшеницы трехчасовая гипотермия при 3°C индуцирует синтез большого набора стрессовых низкомолекулярных и гидрофильных белков. Кроме того, особенностью клеток растений, отличающей их от других эукариотических организмов, является синтез низкомолекулярных полипептидов (мол.массой 15–22 кД) в ответ на холодовой стресс. В настоящее время установлено, что эти белки играют важную роль в приобретении растением устойчивости к действию неблагоприятного температурного фактора. Также у холодоустойчивых растений возрастает роль пентозофосфатного пути дыхания, повышается эффективность работы антиоксидантной системы; а достаточно большой запас сахаров позволяет длительное время поддерживать дыхание и различные биосинтетические процессы.

Повышение холодоустойчивости. В сельском хозяйстве для повышения холодоустойчивости растений используют достаточно эффективный прием – замачивание семян перед высаживанием в грунт в растворах микроэлементов (Zn, Mn, Cu, B, Mo), используя 0,25%-е солевые растворы (борная кислота, сульфат цинка, сульфат меди, перманганат калия).

Применение агротехнических приемов, основанных на создании условий, при которых происходит накопление в тканях растений "защитных веществ" – сахаров, липидов и др. позволяет повысить устойчивость к действию холода. До сих пор эффективным способом является внесение фосфорно-калийных удобрений в почву, выращивание рассады перед высадкой в поле при нижнем уровне оптимальных температур.

16.3.2. Морозоустойчивость. Закаливание.

Генетически детерминированная способность того или иного вида растений переносить температуру ниже 0°C называется *морозоустойчивостью* и является одним из параметров *зимостойкости* растения, т.е. устойчивости к комплексному влиянию всех неблагоприятных факторов окружающей среды, возникающих в зимне-весенний период.

Морозостойкость и зимостойкость среди сортов одного вида растений различна. Например, среднеазиатские сорта винограда являются наименее морозостойкими (рис. 16.2.А), тогда как распространенные в Центральной Европе, Северном Кавказе, Грузии, Молдавии, районах Дона - морозоустойчивые (рис. 16.2. Б).

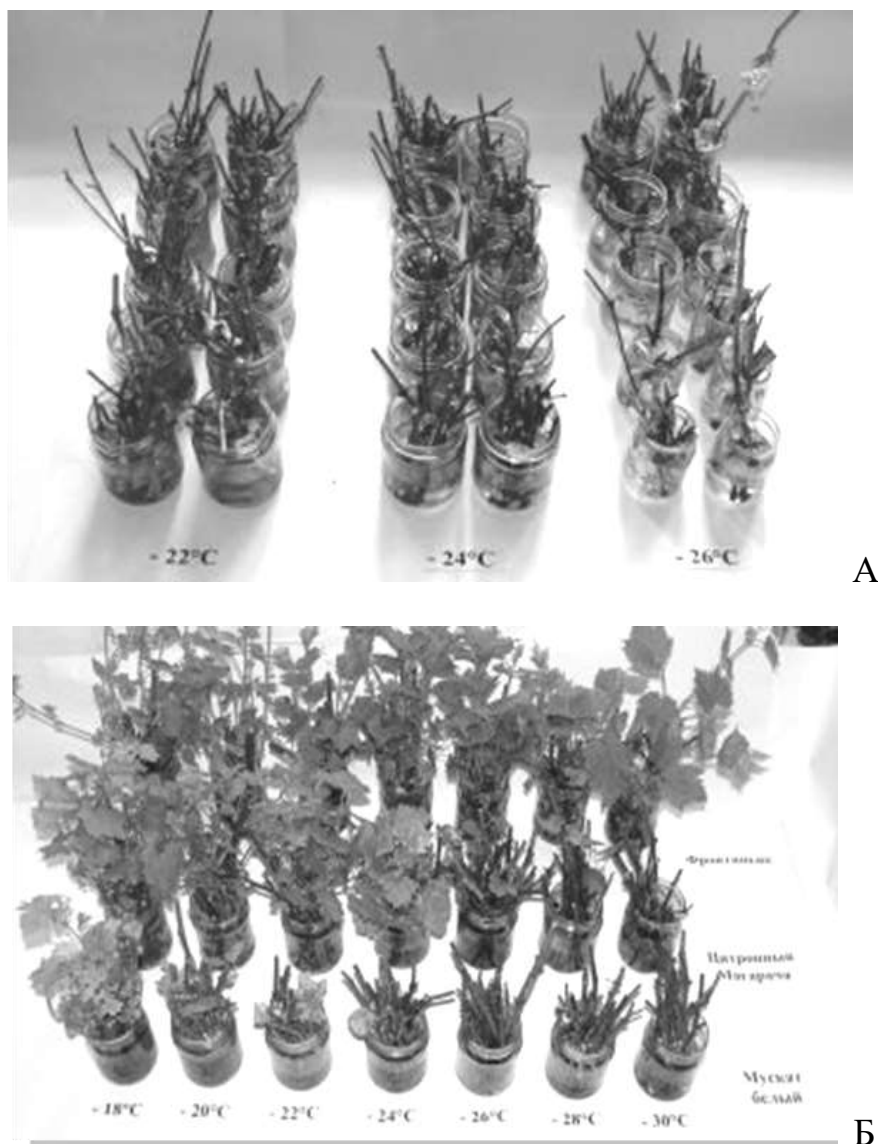


Рис.16.2. Морозоустойчивость разных сортов винограда в эксперименте (Волынкин В.А., 2012). *А - Результаты промораживания черенков среднеазиатских сортов (развития побегов нет). Б – Образование зеленых побегов после промораживания черенков морозоустойчивых сортов винограда.*

Снижение температуры ниже 0°C вызывает образование льда в растительных объектах разного уровня организации, что является дополнительным повреждающим фактором к вышеперечисленным (подраздел 16.2.). Многочисленные результаты криомикроскопических исследований доказали, что образование льда может происходить внутриклеточно, внеклеточно и внеорганно. Локализация образования льда в двух вариантах понятна из названия «внутриклеточное» и «внеклеточное», а в случае внеорганного образования льда речь идет о тканях меристемы, не имеющих межклеточных пространств (почки растений).

При понижении температуры в процессе роста внеклеточного кристаллообразования происходит обезвоживание растительных клеток и, как следствие, уменьшается содержание воды в протопластах, то есть

сокращается объем вакуолей и обезвоживается сама протоплазма. Происходит денатурация мембранных белков, связанная с дегидратацией и высаливанием макромолекул, а это, в свою очередь, приводит к нарушению активного транспорта. Мембранно-связанные ферментативные системы инактивируются, вызывая накопление (вплоть до токсических концентраций) неорганических и органических веществ, образующихся вследствие дегидратации клеток в процессе заморозания. Сжатие протопластов, соединенных с клеточными стенками, приводит к развитию механических напряжений. Клетки, первоначально соединенные плазмодесмами, отделяются друг от друга, что может еще сильнее нарушать проницаемость клеточных мембран. В результате повреждения мембраны теряют свойства полупроницаемости, ускоряется выход веществ из клеток. Это определяет дальнейшие необратимые повреждения клеток (рис.16.3).

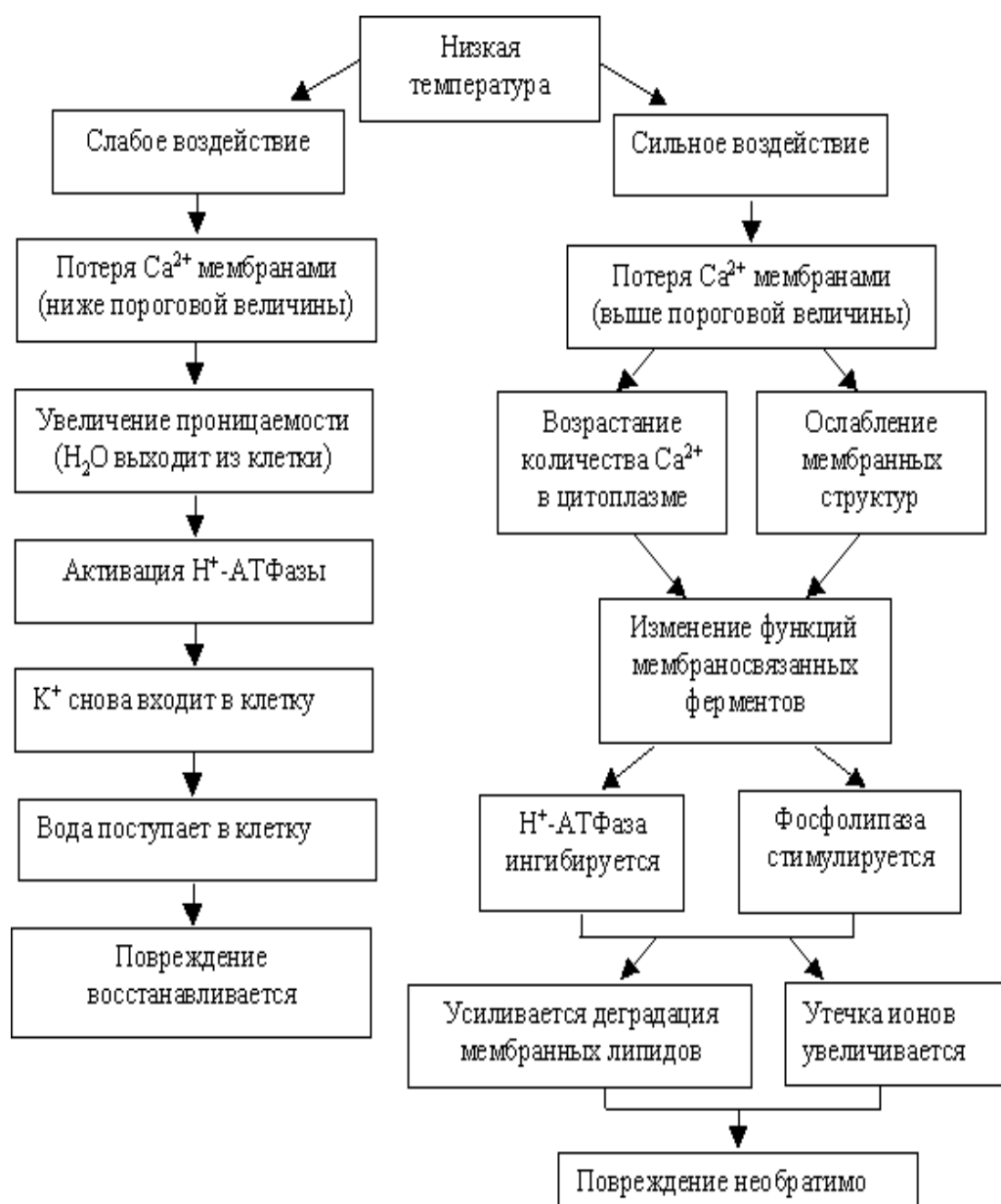


Рис. 16.3. Схема влияния низких температур на мембраны (Т.В. Чиркова, 2002)

Морозоустойчивость зимующих растений основана главным образом на предотвращении образовании льда в клетках. Лед преимущественно образуется только в межклетниках. Некоторые ткани при этом остаются переохлажденными, сохраняя воду в клетках в незамершем состоянии, и могут переносить морозы до минус 30...40°C.

Формирование физиологического механизма устойчивости к перезимовке (закаливание) складывается из 2х этапов: первый этап – уход от повреждающего действия фактора (*пассивная адаптация*); второй этап – возникновение физиологических и биохимических приспособлений в ходе естественного закаливания в осенний период для повышения выживаемости (*активная адаптация*).

Пассивная адаптация. Под уходом от повреждающего действия низких температур подразумевается короткий онтогенез. Например, однолетние растения заканчивают свой жизненный цикл до наступления зимы, успевая дать семена, многолетники теряют свои надземные органы, перезимовывая при этом в виде луковиц, клубней или корневищ, хорошо защищенных от мороза слоем почвы и снега.

Активная адаптация. Закаливание. Для формирования морозоустойчивости растений необходимо сочетание короткого фотопериода с изменением спектрального состава света, увеличением перепадов температуры в течение суток и ее снижением. *Закаливанием* является обратимое физиологическое приспособление к воздействию холода.

В первой фазе закаливания у растений под действием низких температур накапливаются сахара и другие соединения.

Вторая фаза закаливания (дальнейшее повышение морозоустойчивости) происходит уже при отрицательных температурах немного ниже 0°C, но без повреждения клеток растений, и следует сразу же после первой. В эту фазу наблюдается частичная потеря воды клетками под действием накопившихся сахаров. При этом изменяется цитоплазматический коллоид и возрастает относительное количество связанной им воды. Эти изменения делают клетки более устойчивыми к низким температурам. Подготовительные процессы закаливания должны осуществляться постепенно, за счет чего растения лучше успевает приспособиться к изменению температурного режима.

Прекращение роста того или иного органа растений сопряжено с повышением содержания в нем сахаров. Затем наступает период глубокого покоя. В почках и ветках древесных растений в этот период накапливаются биополимеры и другие высокомолекулярные органические соединения (РНК, белки, фосфолипиды, олигосахаририды, кислоторастворимые фосфорно-органические соединения и др.). Накопление таких веществ сопровождается увеличением водосвязывающей способности тканей и повышением морозоустойчивости. При закаливании растений плазмодесмы клеток не функционируют, что повышает устойчивость последних к внеклеточному кристаллообразованию и обезвоживанию.

Таким образом, в период подготовки к глубокому покою в зимующих органах растений происходят сложные изменения, повышающие зимостойкость и создающие резерв для более интенсивного роста в новом годичном цикле.

Формирование морозоустойчивости зимующих покоящихся растений в онтогенезе рассматривается как цепь адаптивных перестроек углеводного, аминокислотного, белкового, липидного метаболизма, а также изменений окислительно-восстановительных, энергетических и других процессов, направленных на ограничение или устранение кристаллизации воды в клетках и тем самым способствующих сохранению целостности и поддержанию функциональной активности клеточных структур.

В то же время при определенных условиях глубокого охлаждения растительные клетки могут оставаться неповрежденными даже после замерзания воды внутри них. И наоборот, их повреждения могут быть обусловлены переохлаждением внутриклеточной воды, без перехода ее в твердое состояние. Кроме того, возможны нарушения мембранных структур клетки, связанные с изменениями фазового состояния липидов бислоя, происходящими до замерзания воды в клетках.

Современные представления об устойчивости растений к температурам ниже нуля в естественных условиях не могут адекватно применяться для объяснения эффектов, возникающих при действии низких и сверхнизких температур при криоконсервировании.

Рекомендуемая литература

1. Красильникова Л.А., Садовниченко Ю.А. Анатомия растений. Растительная клетка, ткани, вегетативные органы. Харьков, Колорит: 2004. – 245с.
2. Chloroplasts: Current Research and Future Trends/ Ed. by Helmut Kirchhoff/Caister Academic Press, 2016 . –289 p.
3. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений: учеб. пособие. СПб: С.-Петерб. ун-та, 2002.-244 с.
4. Yadav S.K. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review.//Agronomy for Sustainable Develop.,2010, Volume 30, Issue 3, pp 515–527/
5. Самыгин Г.А. Причины вымерзания растений/ М.:наука.–1974.–191с.

Глава 17. Замораживание растительных тканей

17.1. Основные подходы и условия криоконсервирования. 17.1.1. Метод медленного программного замораживания. 17.1. 2. Методы, основанные на витрификации. 17.1.3. Криоконсервирование методом сверхбыстрого замораживания. 17.2. Особенности криоконсервирования гермоплазмы растений. 17.2.1. Семена. 17.2.2. Криоконсервирование меристем. 17.2.3. Криоконсервирование пыльцы. 17.2.4. Криоконсервирование черенков плодовых и ягодных культур.

17.1. Основные подходы и условия криоконсервирования

Криоконсервирование как система единого процесса включает в себя несколько этапов: подготовку объекта, добавление криопротектора, замораживание по определенному режиму, хранение в жидком азоте, размораживание, удаление криопротектора и рекультивирование с последующей регенерацией целых растений.

Одним из наиболее важных условий успешного криоконсервирования является избежание формирования кристаллов льда внутри клеток на этапе охлаждения до минус 196°C, что можно достичь комбинацией высоких скоростей охлаждения и низким содержанием воды в тканях растений. В таких условиях можно избежать формирования крупных кристаллов льда, которые повреждают клеточные структуры. Другой подход – медленное замораживание, во время которого происходит дегидратация клеток, снижающая вероятность образования внутриклеточного льда. Как при первом, так и при втором подходах *устойчивость растительного материала к сильной дегидратации* является ключевым фактором успешного криоконсервирования.

Кроме того, уменьшение формирования внутриклеточного льда и увеличение устойчивости биообъектов к обезвоживанию обеспечивает предварительное культивирование образцов на средах, обогащенных сахарозой; насыщение криопротекторами; холодовая закалка *in vitro* растущих проростков. Все эти процедуры проводят с целью снижения осмотической активности клеток, стабилизации белков и мембран, понижения точки замерзания и повышения склонности оставшегося раствора к витрификации (стеклованию). Обычно разные способы подготовки биообъектов к криоконсервированию применяются в комбинации.

Для растений умеренных климатических зон насыщение криопротекторами часто комбинируют с холодовым закаливанием, что приводит к развитию природной устойчивости. Поскольку акклиматизированные естественным образом образцы успешно криоконсервируются без предварительной обработки или криопротекторов, например, зимующие почки или одревесневшие черенки.

Обычно для повышения устойчивости к сверхнизким температурам закаливание применяется при криоконсервировании изолированных

меристем, каллуса, побегов древесных. Особо целесообразно проводить закаливание растений, обладающих выраженной холодоустойчивостью.

Некоторым растениям для холодовой адаптации нужны только пониженные температуры, например, черенкам винограда и побегам плодовых, большинству же растений требуются еще и изменения условий фотопериода. Чаще всего для них устанавливают короткий световой день: 16ч ночь/8ч день.

Многие виды растений (тропических и субтропических зон произрастания) не имеют механизмов холодовой акклиматизации, но их устойчивость к дегидратации можно повысить культивированием меристем на средах с высоким содержанием углеводов или высокомолекулярных спиртов. При этом накапливается значительно большее количество растворимых сахаров, пролина и крахмала, чем у меристем, культивируемых на обычных средах.

Методы криоконсервирования, в зависимости от применяемых скоростей охлаждения, делятся на три группы: методы медленного программного замораживания, методы, основанные на витрификации и методы сверхбыстрого замораживания.

17.1.1. Метод медленного программного замораживания

Метод предусматривает дегидратацию клеток в процессе замораживания и включает в себя медленное охлаждение со скоростью не больше 10 град/мин до определенной отрицательной температуры. Возможны варианты с последующим погружением в жидкий азот или его пары (рис. 17.1.). Оптимальная скорость медленного замораживания зависит от проницаемости клеток для воды и может изменяться в широких пределах.



Рис. 17.1. Методы медленного (контролируемого) замораживания.

По мере снижения температуры клетки и внешняя среда переохлаждаются, с последующим формированием льда. В случае растительных клеток клеточная стенка и плазматическая мембрана действуют как физиологический барьер, они предотвращают проникновение внутрь клеток кристаллов льда, которые растут во внеклеточном растворе примерно до температуры минус 10°С – 15°С. Следовательно, в момент,

когда может начаться кристаллизация воды в цитоплазме, уже существует значительное переохлаждение, и клетки остаются незамороженными, но переохлажденными. Такая ситуация, возникающая при быстром охлаждении, оказывается очень неблагоприятной, если вдруг вся внутриклеточная вода кристаллизуется и повредит органеллы. Но если температура снижается медленно, то клетка успевает потерять часть свободной воды, которая выходит из нее, замерзая на поверхности медленно растущих кристаллов льда во внешнем растворе. Тогда формируются небольшие кристаллы, не оказывающие сильных повреждений. Идеальным было бы удаление всей свободной воды из клетки, что сделало бы невозможным ее замерзание внутри. Для этого необходимо постепенное снижение температуры. С дальнейшим снижением температуры увеличивается количество внеклеточного раствора за счет обезвоживания клетки внеклеточным льдом, а внутриклеточный раствор концентрируется, и клетки сжимаются.

Такие факторы как скорость замораживания, криопротекторы и их концентрация, конечная температура медленного замораживания перед погружением в жидкий азот, тип и физиологическое состояние растительного материала – все влияет на сохранность и жизнеспособность объекта. Скорости, которые используются для криоконсервирования растительных объектов, находятся в диапазоне от 0,3 до 2 град/мин. Обычно медленное программное замораживание проводят до минус 30 – 70°C. К этому времени вся вода, которая находится в клетках в несвязанном состоянии, выходит из них за счет образования внеклеточного льда, а последующее погружение в жидкий азот несет незначительный повреждающий эффект.

Криоконсервирование методом медленного программного замораживания проводят под защитой криопротекторов в невысоких концентрациях. Наиболее часто используют диметилсульфоксид, глицерин, сахарозу.

Большинство почвенных и водных микроводорослей могут быть успешно криоконсервированы с использованием медленного программного замораживания со скоростями охлаждения 1град/мин в ростовой среде с добавлением 5% (0.7M) диметилсульфоксида. Однако было отмечено, что практически все водоросли с большим размером клеток и большинство макроводорослей еще не удалось криоконсервировать.

17.1. 2. Методы, основанные на витрификации

Витрификация (стеклование) – переход жидкости при понижении температуры в стеклообразное состояние. Методы витрификации основаны на существенной дегидратации клеток до замораживания путем выдержки в высококонцентрированных криозащитных растворах и/или высушивании воздухом, с последующим погружением в жидкий азот. В результате снижается вероятность формирования внутриклеточного льда и уменьшается количество повреждений.

В настоящее время различают несколько способов подготовки растительных объектов к криоконсервированию методом витрификации:

традиционная подготовка к витрификации; высушивание; предварительное выращивание в средах, содержащих криопротектор и высушивание; инкапсуляция-витрификация; инкапсуляция-дегидратация.

Традиционная подготовка к витрификации начинается, прежде всего, с выделения *апикальных меристем* (группа меристематических клеток, организованных в ростовой центр, занимающая терминальное положение в стебле и обеспечивающая образование всех органов и первичных тканей побега) или выделения *эмбриоидов* (соматический зародыш, образующийся неполовым путем из соматической клетки растения). Затем их предварительно культивируют на питательных средах с постепенно увеличивающимся содержанием сахарозы (0,3 – 0,7М). На следующем этапе образцы погружают в раствор глицерина и сахарозы на 20 мин. После этого дегидратируют (обезвоживают), выдерживая 60-120 мин в концентрированных криозащитных растворах при температурах от 25 до 0°C (рис. 17.2., А). Наиболее часто при криоконсервировании методом

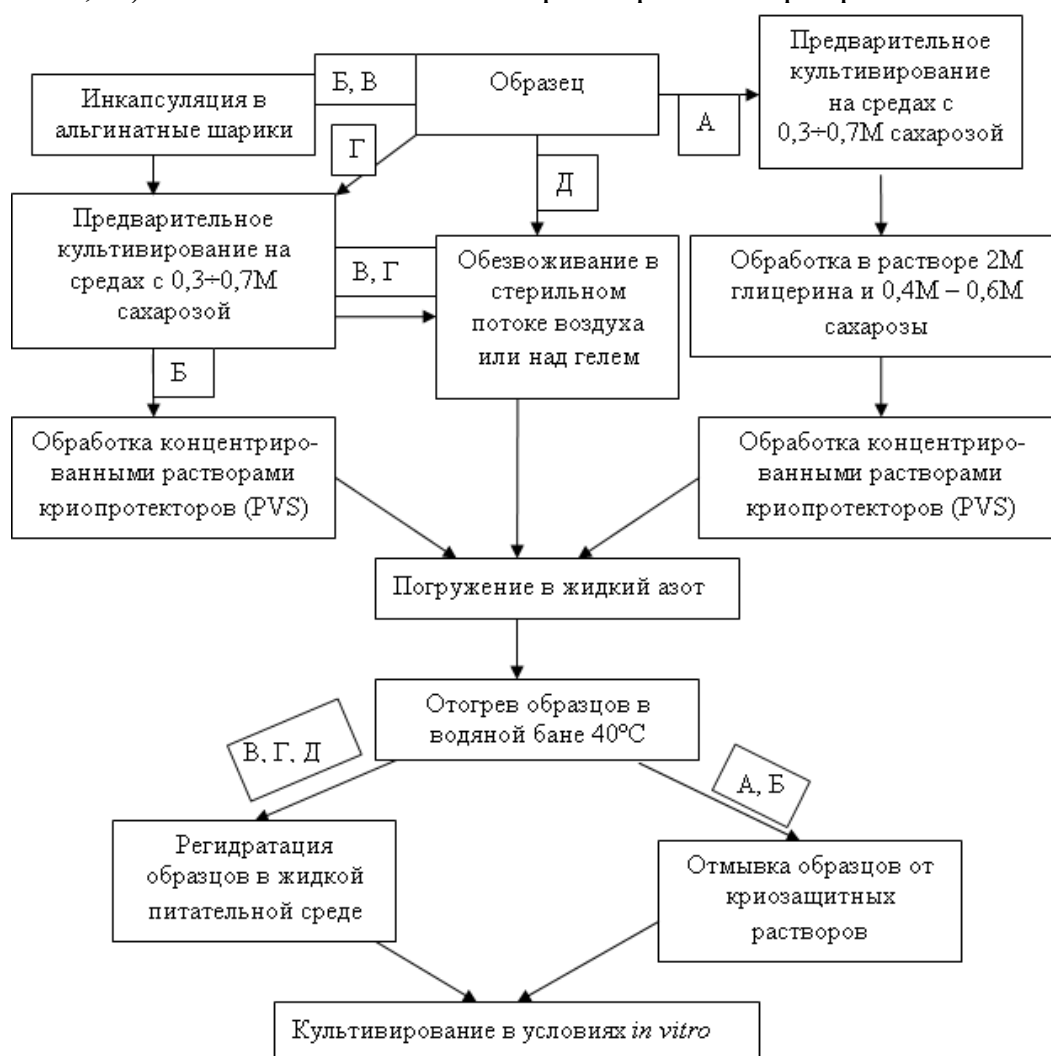


Рис. 17.2. Методы криоконсервирования, основанные на витрификации: А – традиционная подготовка к витрификации; Б – инкапсуляция-витрификация; В – инкапсуляция-дегидратация; Г – предварительное культивирование-высушивание; Д – высушивание

витрификации дегидратация образцов сопровождается использованием концентрированных криозащитных растворов (plant vitrification solution – PVS). Так как эти растворы содержат большие концентрации различных криопротекторов (глицерин, ДМСО, ЭГ, 1,2-ПД и др.), то важным условием для успешного криоконсервирования считают укорочение времени экспозиции меристем в растворах для избежания токсического эффекта. При этом время должно быть достаточным для получения существенной дегидратации. Чувствительность к дегидратации данными растворами различна для разных видов растений.

Помещение апексов непосредственно в PVS часто приводит к повреждающему эффекту, избежать которого позволяет этап предварительного насыщения образцов при комнатной температуре в течение 20 мин в «насыщающем» растворе, состоящем из 2М глицерина и 0,4М – 0,6М сахарозы. На этом этапе наблюдается значительный плазмолиз клеток, который, в то же время, сопровождается незначительным проникновением глицерина в цитозоль. Положительный эффект действия насыщающего раствора является результатом концентрирования в клетке криопротекторных веществ, накопленных в течение предварительного культивирования с сахарозой или высокомолекулярными спиртами и защитного действия первичного плазмолиза. Присутствие насыщающего раствора в околопротопластном пространстве плазмолизированной клетки также может уменьшать механический стресс, вызванный сильной дегидратацией. Положительное действие при дегидратации витрифицирующимся раствором оказывает также снижение температуры до 0°C. Существует несколько витрифицирующихся растворов, которые успешно применяются для криоконсервирования растительных объектов (табл. 17.1.). Наиболее широкое применение получил PVS 2, успешно используемый для криоконсервирования более 200 видов растений.

Таблица 17.1. Состав различных витрифицирующихся растворов, которые используются для криоконсервирования растительного материала

Раствор	Состав
PVS 1	22% глицерина+13% 1,2-пропандиола+13% этиленгликоля+6% диметилсульфоксида+0,4М сахарозы
PVS 2	30% глицерина+15% этиленгликоля+15% диметил-сульфоксида+0,4М сахарозы
PVS 3	50% глицерина+50% сахарозы
PVS 4	35% глицерина+20% этиленгликоля+0,6М сахарозы
PVS N	18,5 % глицерина+15% этиленгликоля+1М сахарозы
Раствор Steponkus	50% глицерина+15% сорбитола+6% бычьего сывороточного альбумина+0,4М сахарозы
Раствор Towill	35% глицерина+10% диметилсульфоксида+10% полиэтиленгликоля-8000+0,4М сахарозы

Инкапсуляция-витрификация основывается на заключении образцов в альгинатные сферы. *Альгинат натрия* – это соль альгиновой кислоты, получаемой из бурых водорослей. Образец помещают в жидкую питательную среду с добавлением 3%-го альгината натрия и 100 мМ хлорида кальция, вследствие чего образец заключается в альгинатную капсулу, которая защищает объект при подготовке к замораживанию, вероятно, способствуя уменьшению флуктуаций окружающих параметров (температуры, осмолярности, условий питания, относительной влажности). После инкапсулирования образцы культивируют на средах, содержащих сахарозу и дегидратируют в концентрированных криозащитных растворах (PVS). Этот метод применяется для криоконсервирования меристем большинства сельскохозяйственных культур (рис. 17.2., Б).

Инкапсуляция-дегидратация также основывается на заключении объектов в альгинатные капсулы, после чего их помещают на жидкую питательную среду, обогащенную сахарозой, на 1 – 7 дней, что повышает устойчивость к обезвоживанию. Затем их подсушивают в потоке стерильного воздуха или над силикагелем до содержания воды $\approx 20\%$ с последующим погружением в жидкий азот. Метод широко применяется для криоконсервирования разных видов растений (рис. 17.2., В). Преимуществом данного метода является отсутствие воздействия криозащитных растворов в высоких концентрациях, необходимых для обезвоживания объекта перед погружением в жидкий азот.

Метод высушивания применяется для криоконсервирования зиготических эмбриоидов (зародыш, выделенный из завязи) или эмбрионидных меристем (выделенных из зародышей) семян тропических растений. Высушивание до 10 – 20% влажности обычно проводят в потоке воздуха в стерильных условиях или над поверхностью высушивающего геля (рис. 17.2, Д).

Предварительное выращивание в средах, содержащих криопротектор, и высушивание предусматривает культивирование выделенных объектов на питательных средах в присутствии осмотически активных веществ с последующим обезвоживанием в потоке стерильного воздуха или над поверхностью высушивающего геля (рис. 17.2., Г). Этот метод применяется для некоторых морских микроводорослей, однолетних побегов, соматических и зиготических эмбриоидов растений.

17.1.3. Криоконсервирование методом сверхбыстрого замораживания

Увеличение скорости снижения температуры имеет несколько преимуществ: во-первых, возможно уменьшить концентрацию криопротектора и, следовательно, осмотические и токсические эффекты; во-вторых, происходят менее серьезные криоповреждения, как результат быстрого прохождения через критическую температурную зону кристаллообразования.

В настоящее время метод сверхбыстрого замораживания является наиболее востребованным для криоконсервирования меристем картофеля. В Германии на основе данного метода создана низкотемпературная коллекция меристем сортов картофеля при низкотемпературном банке. Меристемы насыщают 10 % (1,4М) ДМСО и помещают на алюминиевые пластины в капельках криопротектора или на конец гиподермальной иглы и погружают в жидкий азот. Размораживание проводят в стерильных условиях погружением меристем в жидкую питательную среду. Результаты сохранности составляют от 37 до 88 % в зависимости от сорта.

В процессе погружения образца в жидкий азот наблюдается кипение хладагента, этот период составляет 80% – 90% от всего времени охлаждения и характеризуется слабой теплоотдачей. С целью исключить снижение отвода тепла, вызываемого кипением жидкого азота во время охлаждения, целесообразно использовать его шугу, скорость охлаждения при этом повышается в 3,5 раза.

Существенным моментом успешного криоконсервирования биообъектов посредством сверхбыстрого замораживания является необходимость, во избежание образования крупных кристаллов, применять как достаточно высокую скорость охлаждения, так и достаточно высокую скорость нагрева, причем абсолютное значение последней должно быть выше, чем первой.

Отогрев криоконсервированных образцов чаще всего проводят погружением объекта в водяную баню при температуре 20 – 40°C, однако иногда необходимо программное размораживание. После чего происходит отмывка образцов от криопротекторов или регидратация, рекультивирование для определения жизнеспособности, микрклонального размножения; введение объектов в условия *in vivo*.

17.2. Особенности криоконсервирования гермоплазмы растений

Гермоплазма – это зародышевая плазма, представляющая собой набор генов, которые передаются путем размножения потомству через гаметы или репродуктивные клетки (Табл.17.2). Поскольку растениям свойственно явление тотипотности, то любая живая часть растения является источником гермоплазмы. Чтобы сохранить ее в любой из репродуктивных форм (семена, черенки, клубни и т. д.), в мире созданы так называемые банки зародышевой плазмы. Основная задача которых – найти, собрать, сохранить и охарактеризовать зародышевую плазму растений, а также оптимизировать сохранение и использование этих генетических ресурсов растений.

Единственно возможным в настоящее время приемом, обеспечивающим длительное хранение стабильности генома, считается криоконсервирование. В отличие от других способов, хранение при ультранизких температурах имеет существенные преимущества, поскольку позволяет исключить истощение запасных веществ, накопление токсинов,

распад и активацию ферментативных комплексов, самоокисление липидов, деградацию функциональных и генетических систем, а также другие, еще не исследованные, биохимические или биофизические процессы, связанные со старением клетки.

17.2.1. Семена

Семена растений различаются по размеру, массе и форме. Они могут весить до 18-20 кг (сейшельская пальма) или составлять несколько микрометров, как, например, у орхидных. В большинстве случаев семена по форме шаровидные, удлинено-шаровидные, цилиндрические (рис. 17.3).

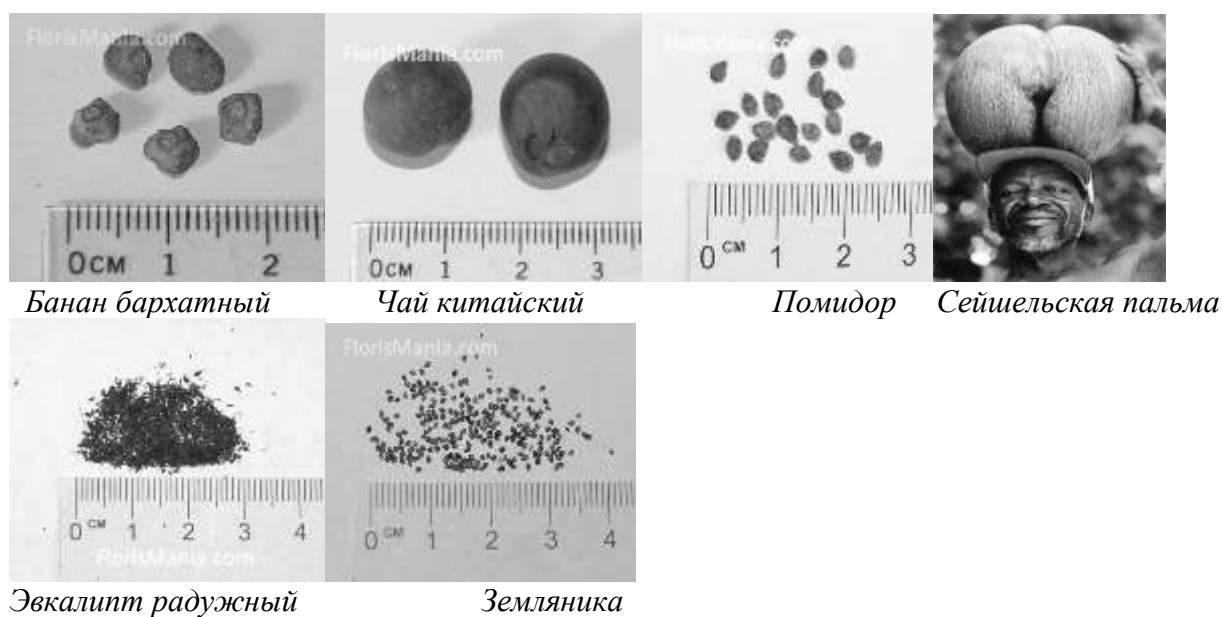


Рис.17.3. Форма и размеры семян некоторых растений.

Главной частью семени растений является зародыш, отличающийся, в зависимости от вида растений, по форме, его расположению в семени и степени развития. Строение семян также сильно различается и по характеру запасющих тканей (рис.17.4).

Строение зрелых семян, биохимические и физиологические свойства зародышей, способность семян высухать, не теряя жизнеспособность, определяют их свойство находиться в покое.

Семена традиционно подразделяют на ортодоксальные и рекальцитрантные.

Особенность *рекальцитрантных* семян заключается в том, что они гибнут при высыхании. *Ортодоксальные* семена теряют воду и высыхают до влажности около 10 %, и в таком состоянии они могут храниться многие годы без потери всхожести. Это свойство ортодоксальных семян получило название «устойчивость к высыханию». В отличие от них, потеря воды рекальцитрантными семенами приводит к потере всхожести и гибели. Поэтому их считают чувствительными к высыханию.

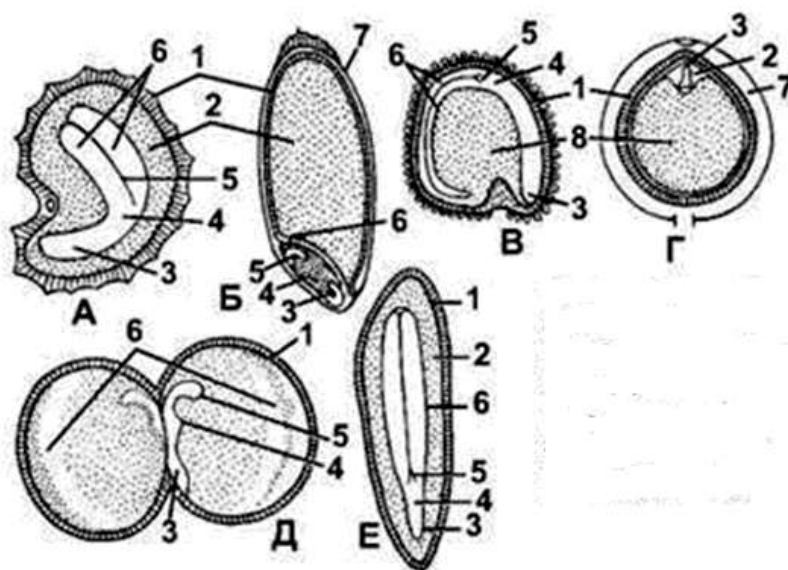


Рис. 17.4. Типы семян. *А* – с эндоспермом, окружающим зародыш – у мака; *Б* – с эндоспермом, лежащим рядом с зародышем – у пшеницы; *В* – с периспермом – у куколя; *Г* – с эндоспермом, окружающим зародыш и мощным периспермом – у перца; *Д* – с запасными продуктами, отложенными в семядолях зародыша – у гороха; *Е* – с эндоспермом и с запасными продуктами, отложенными в семядолях зародыша – у льна; 1 – спермодерма; 2 – эндосperm; 3 – корешок; 4 – стебелек; 5 – почечка; 6 – семядоля; (3 - 6 – зародыш); 7 – околоплодник; 8 – перисperm.

Рекальцитрантные семена содержат большое количество влаги, но их нельзя высушивать ниже определенного уровня, который у них довольно высок (около 20%). К рекальцитрантным относят семена древесных (дуб, каштан, лещина), тропических, citrusовых и некоторых других видов растений. Семена данного типа могут храниться только во влажной среде и при относительно высокой температуре непродолжительное время, так как имеют достаточно низкую естественную жизнеспособность и прорастают в течение достаточно ограниченного времени после созревания (неделя/месяц). Часто рекальцитрантные семена слишком крупные как для того, чтобы быстро их высушить, так и для того, чтобы быстро охладить криогенным веществом (что требуется для успешного криосохранения). Поэтому предпочтительнее в качестве объекта для низкотемпературного хранения выделять из семян отделенный зародыш или зародышевую ось, поскольку они могут быть обезвожены до такого уровня, когда кристаллизация льда будет сведена к минимуму. Зародыши/оси можно сушить потоком воздуха (мгновенная сушка), что значительно сокращает время, в течение которого материалу может быть нанесен ущерб от обезвоживания. В случаях, когда подготовить зародыши/оси для успешного криосохранения не представляется возможным, можно использовать апикальные меристемы побегов, которые отделяют от ростков, взошедших из пророщенных *in vitro* семян.

Таким образом, несмотря на достигнутые успехи, проблема длительного хранения и криоконсервирования растительного генофонда остается актуальной.

Таблица 17. 2. Части растения, используемые для криоконсервирования

Форма хранения	Группы растений	Преимущества	Недостатки
Семена	Мелкосемянные. С семенами, толерантными к засухе, холоду. Не размножаются вегетативно	Простая форма хранения	Невозможно применить для рекальцитрантных семян и вегетативно размножаемых растений
Пыльца	Многочисленные	Простая форма хранения для многих родов растений. Используется в селекции	Геном исходного растения сохраняется не полностью
Спящие почки	Древесные растения умеренного климата	Растительный материал легко доступен из полевых коллекций	Степень холодоустойчивости варьирует в зависимости от генотипа и от сезона; требуются прививки и изучение частоты регенерации почек
<i>In vitro</i> апексы побегов	Многочисленные	Доступны в любое время года, удобны в использовании	Методы криоконсервирования разработаны не для всех видов растений. Требуются определенное лабораторное оборудование и обученный персонал. Необходима культура <i>in vitro</i> для восстановления целого растения
Эмбриональные оси	Некоторые виды рекальцитрантных семян	Легко вычлнять и выращивать	Необходима культура <i>in vitro</i> для восстановления целого растения
Зародыши	Некоторые виды рекальцитрантных семян	Удаление кожуры семян может улучшить их восстановление	Процесс обработки семян занимает много времени и часто технически сложен

17.2.2. Криоконсервирование меристем

Сохранение генетических ресурсов путем криоконсервирования меристем имеет много преимуществ по сравнению с другими способами хранения *in vitro*. Это вызвано тем, что меристемы непосредственно развиваются в растения, это обеспечивает большую генетическую стабильность. Помимо этого они легче переносят замораживание до ультранизких температур, поскольку имеют мелкие клетки, в которых отсутствуют крупные вакуоли. Клонирование с использованием культуры меристем перспективно, поскольку позволяет избежать трудоемких операций черенкования, контроля морфогенеза и получить растения, лишенные вирусов.

Существенное влияние на результат криоконсервирования имеет размер и стадия развития меристем, которые выделяются из *in vitro* растущих растений. Скорость насыщения меристем криопротекторами и степень дегидратации зависят от размеров меристем. Большие *апексы* имеют гетерогенный гистологический состав и содержат более дифференцированные и гидратированные ткани, в которых происходит внутриклеточная кристаллизация в течение замораживания. *Апекс* - меристематическая верхушка побега, стебля, корня, основная часть которой представляет собой конус нарастания. Проникновение криопротекторов в центр апекса и выход воды из него может быть более медленным, чем в поверхностных слоях. В свою очередь, апексы маленьких размеров не имеют достаточного регенерационного потенциала для развития проростка. Криоконсервирование меристем проводят как медленным, так и сверхбыстрым замораживанием, и всеми описанными способами, основанными на витрификации.

17.2.3. Криоконсервирование пыльцы

Пыльца растений имеет преимущественно эллипсовидную или шаровидную форму (рис.17.5). Сбор пыльцы проводят в период бутонизации, за сутки перед распусканьем цветков. С одного сорта определенной культуры собирают в один сезон от 150 до 250 бутонов, после чего в комнатных условиях отделяют пыльники. В бумажной коробочке, закрытой марлей, пыльцу высушивают при комнатной температуре. В зависимости от культуры период сушки составляет от одного до трех дней.

Пыльца довольно устойчива к замораживанию, поэтому её замораживают без добавления криопротекторов прямым погружением контейнеров с образцом в жидкий азот. Жизнеспособность определяют по количеству пыльцевых зерен, проросших на искусственной среде, содержащей 15% сахарозы и 0,1% агар-агара (рис.17.6).

Криоконсервирование пыльцы плодовых культур имеет значение не только для сохранения их генетических ресурсов, но и для обеспечения селекционеров жизнеспособным материалом для скрещивания, полученного из разных регионов, от сортов, различающихся по времени цветения.

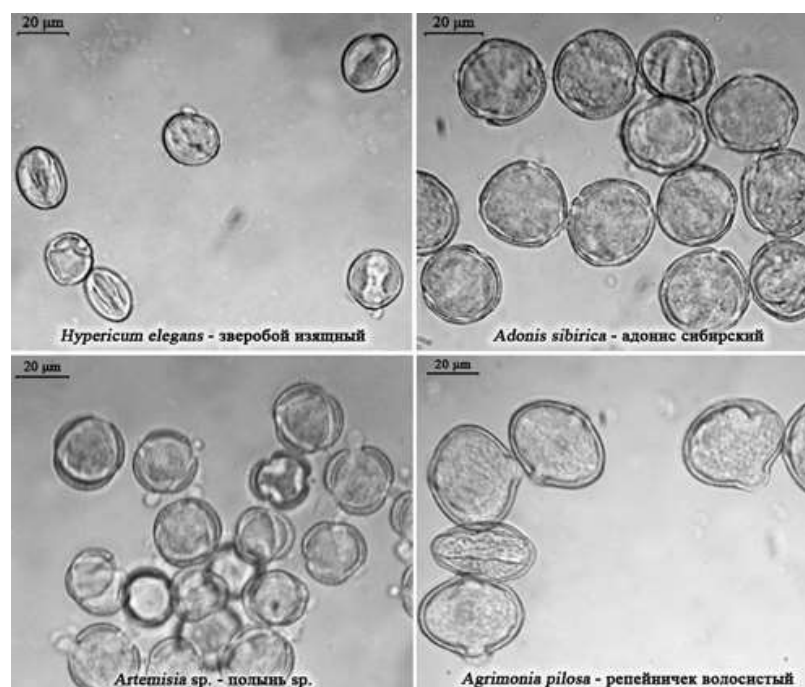


Рис.17.5. Пыльца различных растений (световой микроскоп).
Размеры пыльцевых клеток колеблются от 0,0025 до 0,25 мм.

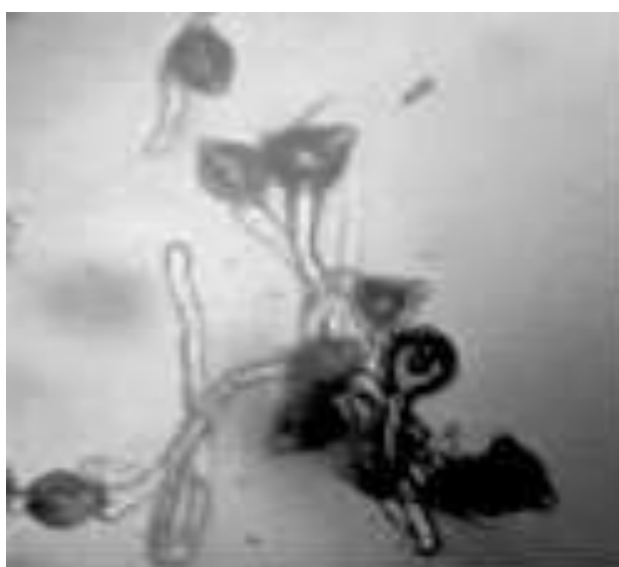


Рис.17.6. Прорастание пыльцевых клеток яблони на питательной среде.

17.2.4. Криоконсервирование черенков плодовых и ягодных культур.

Для криоконсервирования используют черенки длиной 20–35 см, которые нарезают в декабре – январе, после того как температура воздуха опускалась ниже -5°C и держалась не менее 3–5 суток. Заготовленные черенки хранят в морозильнике при минус $5 \div 20^{\circ}\text{C}$. Далее образцы нарезают на однопочковые сегменты длиной до 35 мм и диаметром 4–9 мм для окулировки, или на отрезки длиной 6–8 см с 2–3 почками для прививок черенком. Затем образцы помещают в холодильную камеру с осушителем

воздуха для обезвоживания при минус 4°C. Подсушивание длится 2 – 6 недель. При достижении влажности черенка 28–32% их упаковывают в контейнеры и помещают в морозильную камеру с программным охлаждением от 1 до 2 град/мин до –50°C, выдерживают при этой температуре в течение суток, после чего их погружают в жидкий азот (рис.17.7). В апреле – мае партию черенков после низкотемпературного хранения отогревают при 20 – 22°C. Жизнеспособные черенки прививают или окулируют в крону деревьев.

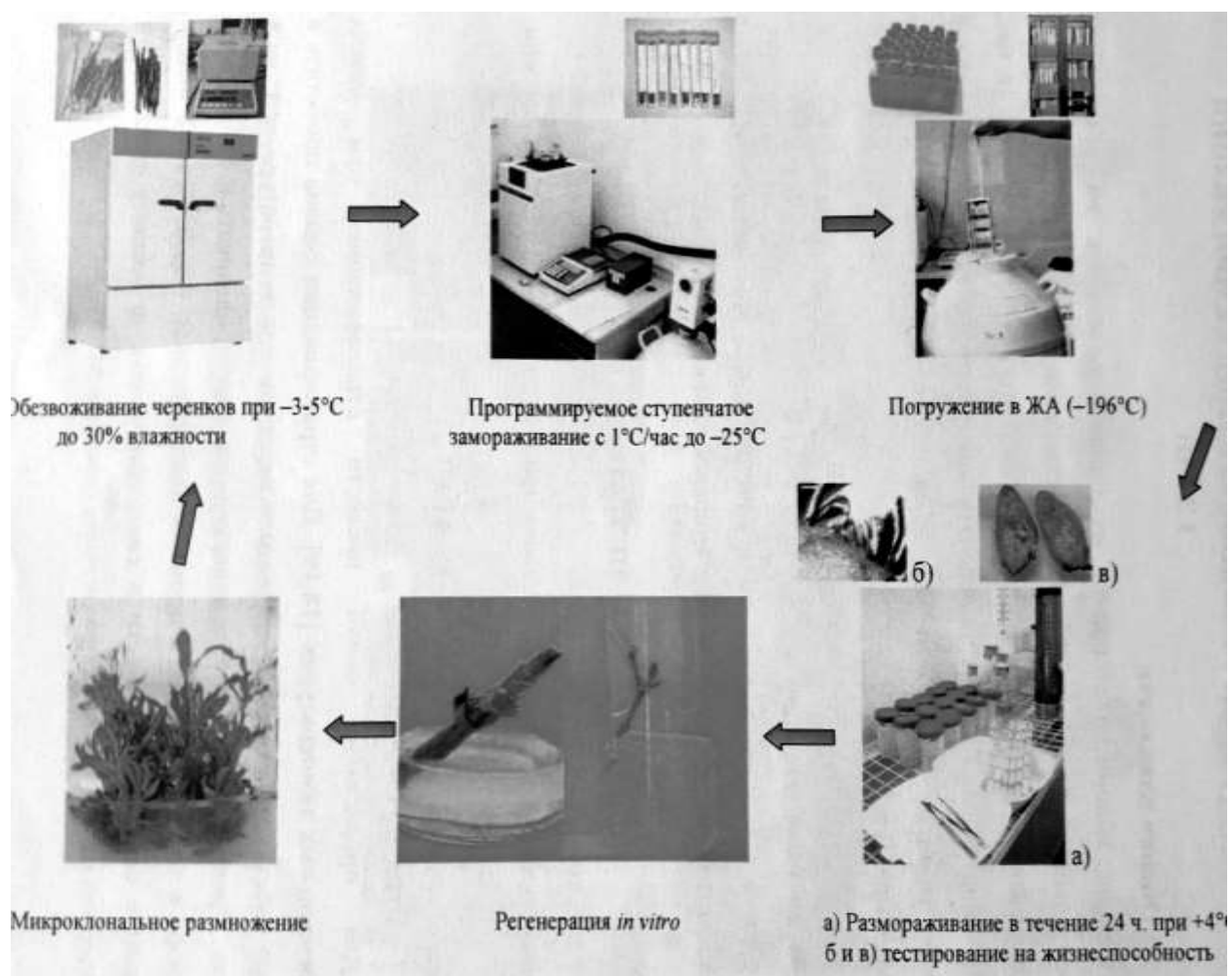


Рис.17.7. Этапы криоконсервирования черенков.

Рекомендуемая литература:

- 1.
2. Reed B.M. Plant cryopreservation: a practical guide. Springer, New York, 2008.- 513p.
3. Panis B., Lambardi M. Status of cryopreservation technology in plants (crops and forest trees). In: Ruane ., Sonnino A. (eds) The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources/Food and Agriculture Organization, Rome, 2006. pp 61–78.

Глава 18. Сохранение генофонда растений

18.1. Стратегии хранения генетических ресурсов растений. 18.2. Сохранение генофонда в условиях *in situ*. 18.3. Сохранение генофонда в условиях *ex situ*. 18.4. Низкотемпературные банки. 18.4.1. Низкотемпературные банки семян. 18.4.2. Низкотемпературный банк ДНК

18.1. Стратегии хранения генетических ресурсов растений

Необходимость сохранения биоразнообразия традиционно связывают с этноботаническим использованием растений как источника пищи, медикаментов, волокон, строительных материалов, для удовлетворения культурных потребностей. Кроме того, растения играют непосредственную роль в создании широкого спектра жизненно необходимых для человека условий существования (качество воздуха, почвы и воды, утилизация токсичных отходов и т.д.).

В последнее время растет интерес к использованию природного разнообразия растений как источника новых аллелей для увеличения производительности, приспособленности, качества и пищевой ценности сельскохозяйственных культур.

В настоящее время около 9000 дикорастущих видов требуют той или иной степени охраны. Количество охраняемых видов варьирует от 8% в Австралии до 15% в Соединенных Штатах и 18% в Европе. Задача Глобальной стратегии сохранения растений предусматривает защиту 60% видов мировой флоры, находящихся под угрозой исчезновения, 10% из них включены в программы восстановления популяций.

Существуют две базовые стратегии для сохранения генетического разнообразия: *in situ* и *ex situ*. Сохранение *ex situ* означает поддержание компонентов биологического разнообразия вне естественных местообитаний, сохранение *in situ* – поддержание и восстановление жизнеспособных популяций и экосистем в естественных местообитаниях.

18.2. Сохранение генофонда в условиях *in situ*

Стратегия сохранения *in situ* – поддержание компонентов биологического разнообразия на особо охраняемых природных территориях: заповедниках, заказниках, национальных парках, памятниках природы, сохранение агробиоразнообразия в условиях фермерских хозяйств и на приусадебных участках.

Заповедник - это определённая территория (акватория), охраняемая законом, на которой запрещены любые виды человеческой деятельности из-за обитания на ней редковстречающихся или вымирающих видов растений.

Заказник - это природная территория, на которой под охраной находится не весь природный комплекс, а некоторые его части: только растения, только животные либо определенные их виды.

Национальный парк - особо охраняемая природная территория, которая имеет особое природоохранное, эколого-просветительское, рекреационное значение и представляет собой уникальный природный комплекс. Отличается высоким природным разнообразием и наличием редких или хорошо сохранившихся типичных природных сообществ, редких и уязвимых видов растений и животных. Использование территории национального парка допускается для регулируемого отдыха населения в специально выделенных с этой целью местах.

Памятники природы – уникальные, неповторимые, ценные в экологическом, научном, культурном и эстетическом отношении природные комплексы, а также объекты естественного или искусственного происхождения. К ним относят:

- одиночные природные объекты (деревья-долгожители, имеющие историко-мемориальное значение);

- растения причудливых форм; единичные экземпляры экзотов и реликтов;

- вулканы, холмы, реки с их поймами, озера, ледники, валуны, водопады, гейзеры, родники, истоки рек, скалы, утёсы, гроты и др. (рис. 18.1).

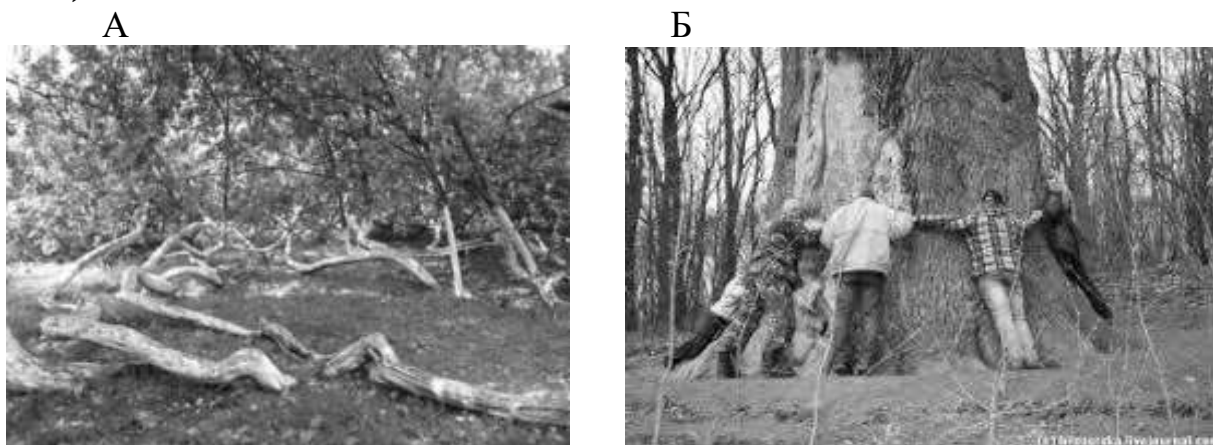


Рис. 18.1. Памятники природы Украины: Кролевецкая яблоня-колония (А), дуб Максима Железняка (Б).

Фермерские хозяйства и приусадебные участки имеют важное значение для сохранения сортов народной селекции и, как следствие, для создания новых сортов сельскохозяйственных культур. Международным институтом генетических ресурсов растений (IPGRI) издано специальное пособие для внедрения программы сохранения генетического разнообразия в условиях *on farm* с целью вовлечения фермеров в национальные программы по сохранению биоразнообразия и селекции.

Стратегии *in situ* позволяют сохранить как генетический материал, так и процессы, дающие начало разнообразию. Однако важно отметить сложность контроля за сохранением генетического разнообразия в условиях *in situ* в связи с проблематичностью доступа к растениям, влиянием

природных факторов (наводнений, пожаров, засух), антропогенной нагрузкой и др.

18.3. Сохранение генофонда в условия *ex situ*

Под сохранением *ex situ* подразумевается сбор образцов генетического разнообразия каждого вида и их хранения вне условий естественного существования, в которых этот вид эволюционировал. Консервация *ex situ* рассматривается как важное дополнение к методам сохранения *in situ*, а для отдельных видов растений является единственным способом сохранения. Методы *ex situ* позволяют сохранять отдельные образцы генетического разнообразия популяции на протяжении длительного времени для изучения анатомических, физиологических, биохимических особенностей материала, для использования в программах селекции и реинтродукции растений, в системе образования и т.д. *Реинтродукция* – возвращение вида в места естественного обитания. Как видно из схемы (рис.17.2), методы *ex situ* предоставляют крупнейший спектр возможностей, которые позволяют применять современные экспериментальные подходы, в частности, методы биотехнологии растений. В настоящее время в коллекциях *ex situ* в мировом масштабе сохраняется около 6 млн. образцов, которые, однако, относятся к ограниченному числу видов. Около половины из них – современные сорта или селекционные линии, треть – местные старые сорта, и только 15% – дикорастущие родственные виды.

Для большинства сельскохозяйственных культур разработаны методы хранения генофонда в банках семян.

Создание *in vivo*-коллекций является базовой стратегией для охраны долгоживущих многолетников, вегетативно размножающихся видов, особенно древесных, вне природных мест обитания.

Основу системы сохранения биоразнообразия дикорастущих видов в составе *in vivo*-коллекций составляют ботанические сады.

Ботанические сады – это особо охраняемая природная озеленённая территория, на основе ресурсов которой создаются ландшафтные сады, содержатся задокументированные коллекции живых растений и/или законсервированные образцы растений, содержащие функциональные единицы наследственности. Они представляют фактическую или потенциальную ценность для научных исследований, образования, публичных демонстраций, сохранения биоразнообразия, устойчивого развития, туризма и рекреационной деятельности, производства услуг и товарной продукции на основе растений. Как правило, при ботанических садах действуют вспомогательные подразделения или учреждения – оранжереи, гербарии, библиотеки ботанической литературы, питомники, экскурсионно-просветительские отделы. Ботанические сады, в которых изучаются, в основном, деревья, называются дендропарками, или арборетумами; кустарники – фрутицетумами; лианы – витицетумами.

Большинство сельскохозяйственных культур для сохранения генетического разнообразия поддерживаются в полевых условиях или в условиях теплицы (рис. 18.2, А). Такой вид деятельности для культур однолетников предполагает ежегодный посев материала, уход за выросшими растениями, сбор и хранение урожая. Многолетние культуры предусматривают ежегодную обработку образцов инсектицидами, фунгицидами, обрезку и ряд других мероприятий, связанных с обеспечением их жизнеспособности.

Поддержание растительного генофонда в живых коллекциях связано с рядом проблем. Прежде всего, такая работа требует больших земельных участков и значительных финансовых и трудовых затрат. Растения, выращиваемые в полевых условиях, могут быть повреждены или уничтожены вредителями, заболеваниями или неблагоприятными погодными условиями.

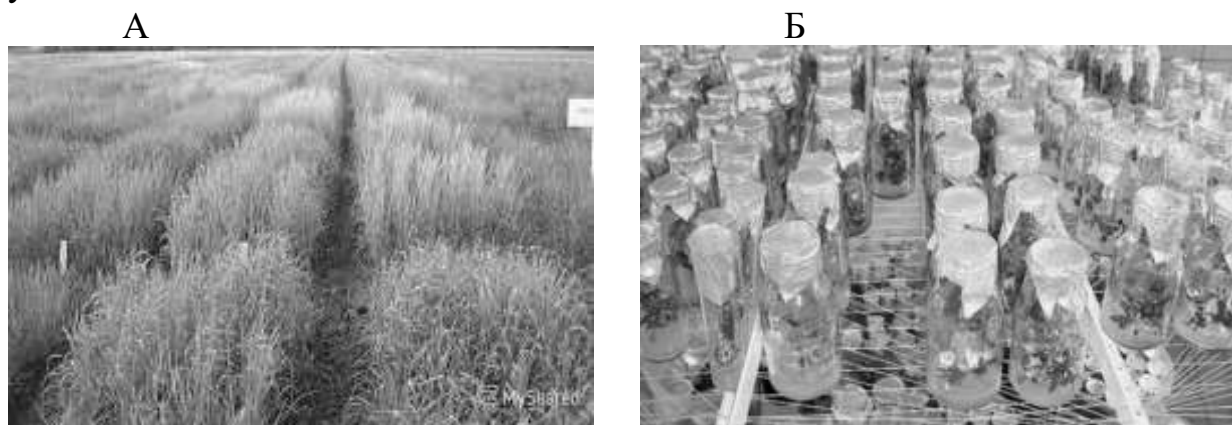


Рис. 18.2. Полевая (*in vivo*) (А) и *in vitro* (Б) коллекция растительных образцов

Важными и эффективными методами сохранения растительного многообразия является использование биотехнологических подходов, а именно методов культуры *in vitro* («в пробирке») (рис.18.2, Б) и криоконсервирования. Применение биотехнологических методов способствует сохранению генетического разнообразия растений как прямым, так и косвенным образом. Во-первых, методы биотехнологии позволяют сохранять растительный материал в виде асептических культур *in vitro* или с применением криоконсервирования с дальнейшим восстановлением природных популяции за счет клонально размноженных растений. Во-вторых, особенно если речь идет о видах, которые имеют практическую ценность (например, лекарственные растения), асептические культуры могут быть использованы как сырье, что снижает нагрузку на природные популяции.

Коллекции *in vitro* – это сохранение стерильных образцов в искусственных контролируемых условиях среды. Их использование для сохранения растительного генетического материала имеет ряд преимуществ перед *in vivo*-коллекциями. Среди них – независимость от природных и

климатических условий, отсутствие риска поражения насекомыми и заболеваниями, высокий коэффициент размножения, возможность длительного хранения растений, а также оздоровления от вирусных, бактериальных и грибковых заболеваний, потребность в относительно небольших площадях и тому подобное. Важной особенностью применения методов *in vitro* является то, что клетки растений способны в определенных условиях полностью реализовать свой потенциал развития с образованием целого организма, так как клетки самых разных органов (листа, корня, цветка, эндосперма семян и т. п.) способны к последующей регенерации в целый организм (явление тотипотентности).

Поддержание растительного материала в асептических условиях может осуществляться с использованием двух основных методологических подходов. Первый базируется на хранении материала без нарушений процессов роста (субкультивирование), второй – на хранении в условиях медленного роста или при полной его остановке (рис. 18.3). *Субкультивирование* – регулярный перенос объекта на свежую питательную среду – необходимо проводить раз в три недели. Недостатками этой системы хранения является увеличение затрат труда и базовых материалов. Особенно это касается крупных коллекций, которые содержат значительное количество видов, принадлежащих к различным таксономическим группам. Надо принимать во внимание также, что длительное культивирование может сопровождаться увеличением вероятности генетических изменений, существует риск потери материала в результате человеческой ошибки или контаминации патогенами в процессе переноса из одной пробирки в другую. В связи с этим желательно, чтобы культуры во время хранения испытывали минимальное вмешательство. Культивирование *in vitro* в условиях замедления роста – способ хранения растительного материала в измененных условиях с целью увеличения интервалов между переносами на свежую питательную среду. Для этого разработан целый ряд подходов, среди которых можно назвать снижение температуры, изменение режимов освещения, уменьшение количества минеральных элементов в среде, добавление в состав сред осмотических веществ или других соединений, которые способны замедлять рост (рис.18.3). Растения разных таксономических групп различаются по своей реакции на снижение температуры культивирования. Как правило, растения умеренного климата, для которых оптимальная температура составляет 20 – 25°C, хранят при 4–10°C. Тропические виды, для которых оптимальные значения температуры выше, культивируют при 10 – 20°C. Часто сниженные температуры применяют в комбинации с изменениями светового режима, инкубируя образцы в условиях уменьшенного освещения или в темноте на питательных средах с обедненным минеральным составом. Эффективным способом индукции замедленного роста является изменение концентрации сахаров или добавление в состав среды осмотически активных веществ (маннитол, сорбитол), которые создают эффект водного стресса и, как следствие, тормозят рост культур.



Рис. 18.3. Стратегия сохранения генетических ресурсов растений.

18.4. Низкотемпературные банки

Для создания низкотемпературной коллекции генетического разнообразия растений необходимо решить несколько задач. Во-первых, необходимо собрать, идентифицировать и описать образцы с применением анатомо-морфологических, биотехнологических, биохимических и молекулярно-генетических методов; во-вторых, оптимизировать условия длительного сохранения образцов *in vitro* с целью дальнейшего устойчивого воспроизводства; в-третьих, создать базу данных, включающую информацию по каждому конкретному образцу, с возможностью удаленного доступа посредством сети Internet. С целью выявления наиболее перспективных видов и сортов декоративных, лекарственных, а также редких и исчезающих растений, для создания банка проводится массовый скрининг коллекционных фондов ботанических и селекционных учреждений.

При разработке и оптимизации методики криоконсервирования для начала необходимо определить стратегию исследования: выбрать тип экспланта, подобрать условия культивирования до и после низкотемпературного хранения, отработать методику насыщения

криозащитными средами и последующей отмывки, подобрать режим охлаждения и обогрева, определить условия хранения (жидкий азот или его пары).

Процессы криоконсервирования осуществляются в криобанках, которые представляют собой комплекс оборудования для обеспечения процессов замораживания-отогрева, длительного хранения биологических объектов, а также для проведения криобиологических исследовательских работ (Глава 15). Аппаратура для подготовки материала для криоконсервирования состоит из общелабораторного оборудования и специального (ориентированного на объект работы), в котором основную роль играет программный замораживатель, осуществляющий программируемое, контролируемое, протоколируемое и воспроизводимое серийное охлаждение объекта до заданной температуры.

После достижения образцом температуры хранения объект помещается в криохранилище, которое обычно представляет собой сосуд Дьюара большого объема (от 100 до 1000 л) с широкой горловиной для удобного доступа внутрь и размещения материала. Внутреннее пространство хранилища снабжается системой стоек, выдвижных боксов и ячеек, обеспечивающих удобную систематизацию и быстрый доступ к нужному образцу. Для надежного хранения материала криохранилища оборудуют системой сигнализации уровня жидкого азота и температурных параметров, влажности и оксигенации с возможностью ведения протоколов условий хранения на компьютере. Для большей надежности и удобства эксплуатации криохранилища могут быть оборудованы системой автоматического долива жидкого азота из резервуара, который можно разместить вне стен криобанка и заправлять привозным азотом или производить собственный жидкий азот из атмосферного воздуха, используя азотные установки различной мощности.

18.4.1. Низкотемпературные банки семян

Ортодоксальные семена – это семена, которые можно высушивать до низкого уровня влажности (около 5%) без потери всхожести, что свойственно большинству культурных видов растений. К фундаментальным факторам, которые влияют на жизнеспособность данного типа семян при хранении, относят температуру хранения, уровень влажности и содержание кислорода в воздухе. Оптимальные температурные режимы хранения находятся в пределах от минус 15 до 20°C; могут также использоваться от 0 до 4°C. Нормальной считается влажность на уровне 5% при хранении в герметичных контейнерах. Последовательность процедур при создании банка семян следующая: сбор, подготовка, сушка, упаковка, хранение, периодические испытания всхожести, регенерация семян, повторное хранение и документация на каждом этапе деятельности.

Несмотря на большие преимущества банков семян по сравнению с другими методами сохранения *ex situ*, следует отметить, что их содержание затратное из-за высоких расходов на электроэнергию для холодильных установок и на обслуживание (регулярное тестирование на всхожесть,

регенерация и др.). К тому же существует риск полной или частичной потери коллекций при воздействии экстремальных факторов среды или антропогенных факторов. Недавний пример: гибель почти половины банка семян из-за цунами в Японии.

С 1984 г. в Нордическом генном банке проводятся работы по сохранению образцов в условиях вечной мерзлоты в заброшенной угольной шахте на архипелаге Шпицберген, сейчас там находится Свальбордское Мировое хранилище семян (рис. 18.4).



Рис. 18.4. Хранение генофонда растений в условиях вечной мерзлоты в Свальбардском Мировом хранилище семян.

Хранилище семян на Шпицбергене представляет собой три камеры, вырубленные в скале. Причем вход в них расположен так, что он не будет затоплен в случае возможного подъема уровня Мирового океана при потеплении. Семена хранятся в герметичной упаковке при минус 18°C. Даже если рефрижераторное оборудование выйдет из строя, температура в камерах за счет мерзлых грунтов будет держаться на уровне минус 3°C. Мировое хранилище семян рассчитано на 4,5 млн образцов. В настоящее время там находится более 500 тыс. образцов семян растений. Украина передала на хранение 2780 образцов (1350 пшеницы, 790 фасоли, 280 нута, 300 чины и 60 чечевицы).

18.4.2. Низкотемпературные банки ДНК

Создание сети банков ДНК в дополнение к другим коллекциям *ex situ* является сравнительно новым способом хранения генетических ресурсов в стабильном состоянии. Это своеобразная “капсула времени” для длительного и надежного хранения гермоплазмы, без затрат на регенерацию материала. Однако использование его как основного способа для сохранения редких и исчезающих видов невозможно, так как при хранении ДНК удастся восстановить отдельные гены, а не геномы или целые растения, поэтому этот подход не может заменить другие технологии сохранения *ex situ* (банки семян, полевые коллекции или коллекции *in vitro*). Выделенная ДНК в криопробирках хранится при температуре минус 80°C.

Протокол выделения растительной ДНК включает в себя стандартные процедуры осаждения, отмывки с последующей очисткой в градиенте плотности и диализ. Образцы очищают до такой степени, что они стабильны при температуре окружающей среды в течение нескольких дней на время транспортировки, что осложняется тем фактом, что подавляющее большинство образцов растительной ДНК имеет высокую молекулярную массу и может деградировать при положительных температурах. Еще одна сложность связана с выделением ДНК. Она обусловлена значительной биохимической *дивергенцией* (расхождение признаков и свойств у первоначально близких групп организмов, возникших в ходе эволюции) между видами растений. В отличие от тканей животных, где один и тот же тип ткани у разных видов обычно имеет сходные характеристики, растения имеют различия структурных биомолекул и уровня метаболизма. Полисахариды и полифенолы – это два класса биомолекул растений, которые структурно варьируют между видами и очень осложняют изоляцию ДНК. Контаминирование этими веществами может привести к значительным сложностям в ходе изоляции ДНК. Решение этой проблемы заключается в использовании СТАВ (cetyl trimethylammonium bromide) буфера, который стал широко использоваться. Несмотря на вышесказанное, несомненным достоинством банка ДНК является то, что это – готовый экспериментальный материал для проведения целого ряда исследований в молекулярной филогенетике и систематике таксонов, для оценки биоразнообразия растений, в селекционных целях и др.

Длительную консервацию генетических ресурсов растительных объектов осуществляют путем создания криобанков, в которых длительное время хранят семена, меристемные ткани, пыльцу, эмбриониды и другие ткани растений, содержащие генетическую информацию. Наиболее сложно сохранить при криоконсервировании меристемные ткани растений. После предварительного культивирования они могут быть заморожены прямым погружением в жидкий азот или в результате программного замораживания под защитой растворов ДМСО, глицерина или этиленгликоля. После культивирования меристемы лучше переносят замораживание, так как у них после этого отсутствуют крупные гидратированные вакуольные образования и избыточное обводнение.

Рекомендуемая литература:

1. Белокурова В.Б. Біотехнології в системі заходів зі збереження біорізноманіття рослин // Цитология и генетика. 2010. № 3. - С. 58-72.
2. FAO/IPGRI, 1994. Genebank standards. FAO and IPGRI, Rome.
3. Волкова Н.Е. Банки ДНК рослин для збереження генетичних ресурсів (огляд)// Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. - 2016. №4 (33). - С. 33-39

Часть 3. Адаптация и гипобиоз

Глава 19. Температурный гомеостаз и терморегуляция у животных

19.1. Роль температуры. 19.2. Температурный гомеостаз у животных. 19.2.1. Пойкилотермные животные. 19.2.2. Гомойотермные животные. 19.2.3. Гетеротермные животные. 19.3. Терморегуляция у млекопитающих. 19.3.1. Теплопродукция. Химическая терморегуляция. 19.3.2. Теплоотдача. Физическая терморегуляция. 19.3.3. Механизмы регуляции температуры тела.

19.1. Роль температуры

Температурные условия явились одними из главных в появлении живых тел на нашей планете. Это довольно узкий температурный диапазон от 0 и до 100⁰С, в котором вода находится в *жидком состоянии*. Только в таких условиях обеспечивается интенсивное Броуновское движение элементов живых систем, на основе чего происходит диффузия, осмос и миллиарды вариантов молекулярных взаимодействий. Это невозможно в твердых телах, где малы межмолекулярные расстояния и велики силы молекулярных взаимодействий. Это невозможно в газообразных объемах, где велики расстояния между молекулами и мала вероятность взаимодействий.

Таким образом, жизнь возникла в водной среде Земли в результате эволюции на основе интенсивного движения, взаимодействий и химических превращений молекул в жидкой водной среде. Она существует до сих пор в соответствующих ей температурных условиях (см. главу 2), и абсолютно все клеточные организмы, обитающие на Земле, являются *жидкими* коллоидными растворами на основе воды и органических веществ, существующие в узкой температурной зоне (Рис. 2.1, 2.2, 2.3).

19.2. Температурный гомеостаз у животных.

Температурный гомеостаз – это диапазон температур тела, в пределах которого животные существуют в достаточно функциональном состоянии, без угрозы жизни или здоровью.

По способности жить в определенных температурных границах и поддерживать температуру тела животные условно подразделены на холоднокровных, или пойкилотермных (poikilos – изменчивый), теплокровных, или гомойотермных (homoios – одинаковый) и гетеротермных (heteros – разный).

Температурный гомеостаз *пойкилотермов* непостоянен, может колебаться практически от 0 до 50⁰С, и зависит от температуры окружающей среды. Такие животные не способны принудительно поддерживать свою оптимальную температуру в разных условиях.

Температурный гомеостаз *гомойотермов* контролируется поддерживается на постоянном уровне $36 - 40^{\circ}\text{C}$ независимо от условий среды обитания.

Гетеротермными называют подгруппу гомойотермных животных, способных во время зимней спячки управляемо понижать и повышать температуру своего тела от $38-40^{\circ}\text{C}$ вплоть до 0°C .

Все живые организмы на протяжении первых трёх миллиардов лет были холоднокровными. Только с появлением птиц и млекопитающих определилась группа теплокровных организмов, которые в скором времени стали бурно развиваться и доминировать. Но и до сих пор основную биомассу Земли (примерно 99%) составляют пойкилотермные организмы.

19.2.1. Пойкилотермные животные

Пойкилотермные (холоднокровные) организмы – это живые тела с переменной температурой тела, которая может меняться в зависимости от температуры внешней среды (Рис. 19.1). К таким объектам относится большинство биологического мира на нашей планете: все бактерии, грибы, растения, беспозвоночные и низшие позвоночные животные (рыбы, земноводные и пресмыкающиеся).



Рис. 19.1. Пойкилотермный организм. Обыкновенная квакша, или древесница *Hyla arborea*, семейство бесхвостых земноводных. Небольшая лягушка из рода квакш до 5 см длиной. Температура ее тела непостоянна и зависит от температуры среды обитания. Она активна при температурах окружающей среды от 10 до 25°C . Перед зимой лягушки прячутся в ямы, дупла деревьев, норки, впадают в оцепенение и не пробуждаются в течение полугода. Температура их тел может понижаться вплоть до около нулевых температур. Пробуждаются в конце марта – апреле и сразу приступают к активному образу жизни.

Температура тел холоднокровных животных *непостоянна*, обычно выше температуры внешней среды лишь на 1—2°C или же равна ей. Изменчивость температуры тела является главной отличительной чертой пойкилотермов. Это свойство связано:

- а) с низким уровнем метаболизма (в 20-30 раз ниже, чем у теплокровных);
- б) отсутствием необходимых внутренних механизмов терморегуляции, что обусловлено слабым развитием нервной и эндокринной систем по сравнению с теплокровными организмами;
- в) отсутствием «базального метаболизма» - стабильно высокого уровня метаболизма и теплопродукции в состоянии покоя;
- г) использованием только *внешних источников тепла* для обогрева тела;
- д) отсутствием теплозащитных покровов тела.

Повышение температуры их тела происходит, главным образом, в результате поглощения тепла извне: поглощения солнечного тепла, тепла нагретых твердых поверхностей, тепла воды или воздуха. В периоды двигательной активности определенное количество тепла может вырабатываться также во время работы мышц. Так как пойкилотермные животные не имеют теплоизоляционных покровов, внутреннее тепло очень быстро рассеивается.

Активность пойкилотермных организмов зависит от температурных условий. Например, насекомые, лягушки, ящерицы и многие другие животные наиболее активны в теплое время суток и в жаркие солнечные дни, тогда как в условиях холода они становятся менее подвижными. Однако следует отметить, что даже в таких условиях обмен веществ и уровень метаболизма поддерживается на достаточном уровне для обеспечения всех жизненных функций. То есть, даже при пониженных температурах такие животные способны в достаточной мере обеспечивать себя пищей, энергией и движением.

Несмотря на широчайший диапазон колебаний температуры у пойкилотермов: от 0 и до 40°C, интенсивность их метаболизма изменяется не столь значительно. То есть холоднокровные животные, их функции и обмен веществ более приспособлены к значительным колебаниям температуры тела. Тогда как большинство теплокровных животных не переносят повышение или понижение температуры тела даже на 5-7°C.

Холоднокровные животные, как и теплокровные, имеют стандартный метаболизм, основанный на биологическом катализе. Клетки всех видов животных построены и функционируют по единому принципу. Все животные имеют одинаковые принципы организации и пути клеточного метаболизма, например: транскрипция ДНК, синтез белков на рибосомах, образование липидов и углеводов в эндоплазматической сети, гликолиз в цитозоле, цикл трикарбоновых кислот, образование АТФ в митохондриях, бета-окисление жирных кислот и т.д. Каждая биохимическая реакция

катализируется одинаковыми ферментами. Однако способность пойкилотермных животных жить в просторном диапазоне температур связана, в первую очередь, с широким температурным оптимумом функционирования основных ферментов, обеспечивающих все стороны метаболизма и функций.

Главным недостатком пойкилотермности является нестабильность активности и медлительность животных при пониженных температурах. Основным достоинством – широкий температурный диапазон жизни (широкий температурный гомеостаз), холодоустойчивость и экономичность метаболизма.

Холодоустойчивость пойкилотермных животных.

Несмотря на приспособленность к холоду и холоднокровность тела, пойкилотермные животные с трудом переживают зиму и снижение температур ниже нуля. Их клетки также легко разрываются кристаллами льда при замораживании. Большинство таких организмов зимой, при понижении температуры внешней среды за пределы допустимой, входят в состояние гипобии и в таком состоянии «оцепенения» переживают неблагоприятный период в ямах, дуплах или норах при температурах тела около нуля. При этом у них поддерживается минимальный уровень метаболизма и основных функций, обеспечивающих жизнеспособное состояние.

Чтобы в состоянии гипобии пережить зимовку, эти организмы заранее накапливают природные криопротекторы (сахара, полиолы) и питательные вещества (жиры, углеводы). Природные криопротекторы препятствуют кристаллизации и рекристаллизации воды, понижают точку замерзания жидких сред на несколько градусов ниже нуля, что обуславливает способность к переохлаждению и выживанию пойкилотермных организмов. Таким образом, устойчивость животных и временное переживание ими низких температур связаны с процессами: а) предотвращения кристаллизации воды в теле и клетках и б) частичным обезвоживанием, в) накоплением специальных веществ, понижающих точку замерзания тканей (см. главу 21).

Кроме этого, для холоднокровных животных характерно изменение спектра синтезируемых клетками белков и обратимые трансформации метаболизма в периоды подготовки к гипобии, при гипобии и выходе из него. Это свидетельствует об участии генома в процессах регуляции адекватных состояний животных при разных температурах и в различные сезоны года. Это, в свою очередь, доказывает генетическую обусловленность как гипобии, так и активного состояния у холоднокровных.

Терморегуляция у пойкилотермных животных.

Истинная, аналогичная гомойотермным организмам (см. ниже), терморегуляция у пойкилотермов отсутствует. Это связано:

а) с наличием широкого диапазона температурного гомеостаза в несколько десятков градусов, в котором животные чувствуют себя относительно комфортно;

б) с отсутствием необходимости регулировать температуру тела в пределах своего температурного гомеостаза, так как это не угрожает их жизни;

в) с отсутствием анатомических органов и физиологических структур регуляции температуры;

г) с недостатком производства внутреннего «метаболического тепла» в связи с низким уровнем обмена веществ;

д) отсутствием теплозащитных слоёв и покровов тела;

е) быстрым рассеиванием тепла через поверхность тела.

Однако холоднокровные животные могут специально повышать или понижать температуру своего тела благодаря: а) поведенческим реакциям и б) мышечной активности.

С помощью поведения животные выбирают места во внешней среде, которые способствуют или нагреву, или охлаждению. Например, перемещаясь от солнца в тень или нору и наоборот, они поддерживают свою температуру в определенном диапазоне, который соответствует функциональному состоянию животного.

Некоторые пойкилотермные животные способны к произвольной генерации тепла при определенных условиях. Например, шмели, бражники, крупные вараны, отдельные виды рыб могут повышать температуру тела в периоды высокой мышечной активности. При мышечной активности выделяется дополнительная порция тепла, которая может также идти на временный подогрев тела холоднокровных животных при необходимости. Это говорит о наличии зачатков терморегуляции у некоторых холоднокровных организмов.

19.2.2. Гомойотермные животные.

Гомойотермные (эндотермные, теплокровные) организмы составляют значительно меньшую часть мира животных (Рис. 19.2). К ним относятся млекопитающие и птицы. Они имеют постоянную температуру тела, не зависящую от температуры внешней среды. Такие животные способны генерировать много тепла и поддерживать температурный гомеостаз своего тела за счет регуляции процессов теплопродукции и теплоотдачи. Температура их тел относительно высокая — у млекопитающих она составляет 36—38°C, а у птиц до 40—41 °C.

Но следует учитывать, что говорить можно о постоянстве только температуры «ядра» млекопитающих (органы грудной и брюшной полостей, а также мозг). Так как температура ядра может изменяться без негативных последствий не более чем на 2°C, а температура оболочки тела (кожа, подкожная клетчатка, поверхностные мышцы и ткани конечностей) может изменяться на 10 и более градусов.



Рис. 19.2. Гомойотермный организм. Млекопитающее, собака *Canis lupus* – одно из наиболее распространённых животных-компаньонов человека. Собаки известны своими способностями к обучению, любовью к игре, привязанностью к человеку. Выведено около четырех сотен разнообразных пород. Температура тела их постоянна 37-38⁰С. Животные активны в любые сезоны года, в любое время суток, независимо от окружающей среды и температуры.

Постоянство температуры тела гомойотермных животных является их основной отличительной чертой. Это свойство связано:

- а) с высоким уровнем метаболизма и теплопродукции, на порядок выше, чем у пойкилотермных животных;
- б) с наличием «базального метаболизма» - высокой продукции тепла в состоянии покоя;
- в) с присутствием необходимых структур и механизмов терморегуляции, что обусловлено достаточным развитием нервной и эндокринной систем;
- г) со способностью регулировать интенсивность метаболизма и усиливать теплопродукцию при понижении температуры внешней среды,
- д) с применением механизмов регуляции не только теплопродукции, но и теплоотдачи;
- е) с обладанием теплоизоляционных покровов (перья, шерсть);
- ж) с использованием внутренних источников энергии для повышения температуры тела.

19.2.3. Гетеротермные животные

Среди гомойотермных животных имеется небольшая группа, представители которой в зимнее время способны понижать температуру своего тела вплоть до 0⁰С (Рис. 19.3). Их называют *зимоспящими животными*, или *гибернирующими животными*. Типичными

представителями этой группы животных являются, например, суслики, летучие мыши и ежи. Перед зимней спячкой животные запасают питательные вещества в виде большого количества жира. Во время спячки они не питаются и не пьют воду.



Рис. 19.3. Гетеротермный организм. Млекопитающее, суслик длиннохвостый *Citellus undulates*. Длина его тела может достигать 20—30 см, масса тела – 300-400 г. Имеет постоянную температуру тела 37-38⁰С на протяжении полугода активности, но зиму длиннохвостые суслики, как и другие суслики, проводят в спячке, в норках, глубоко под землёй, где окружающая температура сохраняется около 0⁰С. Общая продолжительность зимней спячки около 6 месяцев. Температура тела животного опускается до 2-4⁰С. Однако суслики в норах периодически пробуждаются (примерно 2 раза в месяц) и разогревают свое тело за счет внутренних ресурсов до 38⁰С. За 3-5 часов периода разогрева животные полностью восстанавливают функции сердца, легких, печени, мозга. В таком состоянии теплокровности они проводят некоторое время. Затем, спустя несколько часов бодрствования, вновь снижают активность внутренних органов, понижают температуру тела и снова впадают в холонокровную спячку.

Когда температура окружающей среды понижается до отрицательной, выпадает снег и ощущается недостаток пищи, такие животные забираются в подземные норы и впадают в состояние зимней спячки. Температура тела, например, сусликов, понижается постепенно и контролируемо в течение нескольких часов вплоть до нуля, но не ниже. В таком состоянии животные остаются в течение 15-20 дней, после чего они вновь самостоятельно разогреваются до нормальной температуры. В активном состоянии гибернаторы проводят примерно сутки, после чего вновь впадают в спячку. Через две-три недели снова пробуждаются, а затем опять понижают температуру и т.д. То есть шестимесячный процесс зимней спячки состоит из определенного количества циклических процессов (баутов), которые, в свою очередь, состоят из нескольких периодов (Рис.19.4).

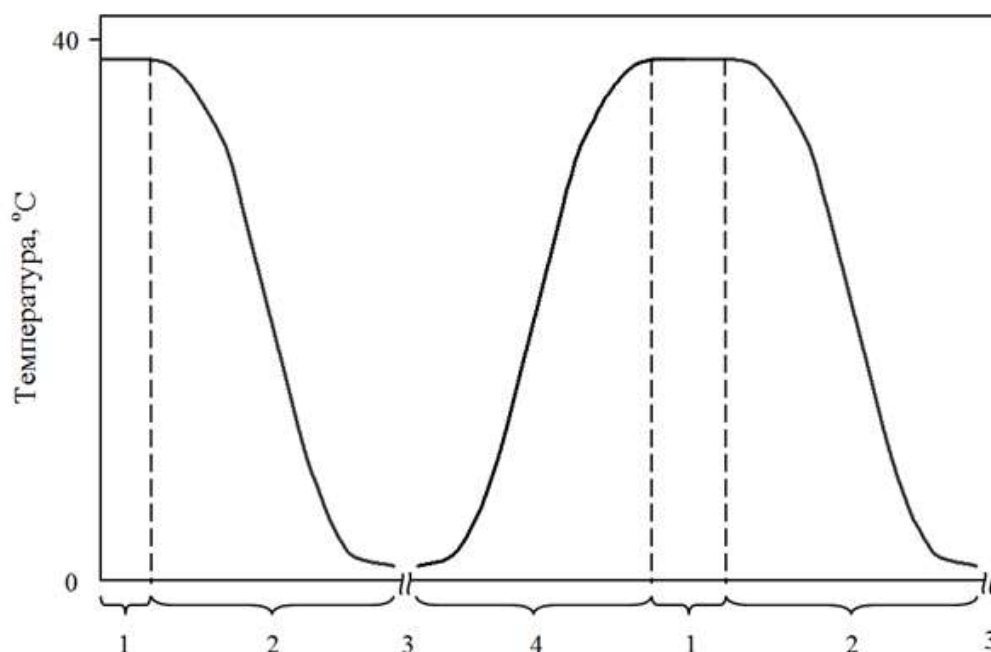


Рис. 19.4. Динамика температуры тела сусликов в период шестимесячной зимней спячки при температуре внешней среды в норе 0°C.

- 1) период активности (нормотермия) между баутами в течение 5 - 10 часов
- 2) период впадения в спячку (охлаждение) длительностью 5 -10 часов,
- 3) период спячки (гипотермия) в течение 15 -20 дней,
- 4) период выхода из спячки (разогрев) в течение 3 – 5 часов.

Интенсивность метаболизма у зимоспящих в состоянии гипотермии понижается в десятки раз, что позволяет им благополучно пережить голод и морозную зиму. В состоянии гибернации существенно снижается интенсивность многих функций (Табл.19.1). Таким образом, гибернаторы обладают способностью координировать работу органов в широком диапазоне температур от 0 и до 38°C. Так, например, если в норме частота сердечных сокращений у сусликов составляет 250-300, то во время спячки при 5°C всего – 5-10, а при пробуждении и температуре тела 35°C может достигать 420 ударов в минуту. При этом орган очень быстро восстанавливает свою функциональность и уже при температуре тела 12-15°C бьётся на уровне нормы, обеспечивая быстрый разогрев животного. Частота дыхания у сусликов также снижается со 100 при 38°C до 2-3 вздохов в мин при температуре гибернации 5°C. При разогреве животных частота дыхания быстро восстанавливается.

Синтез и обмен белков в клетках сусликов не прекращается даже во время гипобиоза, хотя его интенсивность снижается в 100 раз по сравнению с активными животными. При пробуждении животных осуществляется гиперактивация синтеза в сотни раз, даже в несколько раз по сравнению с активными животными. При этом наблюдается индукция синтеза протеинов,

характерных только для этого состояния, что свидетельствует о наличии генных механизмов регуляции зимней спячки.

Таблица. 19.1. Физиологические показатели гибернирующих животных

	Внутренняя температура тела (°C)		Число сердечных сокращений (в минуту)		Дыхание (вдохов в минуту)	
	актив.	гиберн.	актив.	гиберн.	актив.	гиберн.
Суслик	38÷39	1÷5	250÷300	5÷10	100	1÷10
Хомяк обыкновенный	36	4÷5	200÷450	10÷15	50÷80	8
Еж	34÷35	2÷4	200	15÷20	40÷50	5÷9
Летучая мышь	37÷38	2÷4	420	15÷20	90÷100	5÷15
Сурок	36÷37	3÷10	70÷120	5÷15	20÷30	2÷3
Черный медведь	38	22÷25	50-55	8-10	8÷14	2÷3

В разные сезоны года и при изменении температурного состояния сусликов на разных периодах баута происходит частичное обновление мембран клеток. Если липидный состав меняется незначительно, то белковый состав претерпевает существенные изменения на уровне ферментов, мембранных переносчиков и рецепторов.

Таким образом, основой адекватной функциональной активности органов и тканей гетеротермных животных в разных состояниях являются циклические структурно-функциональные перестройки их клеток, обусловленные реализацией через белковый синтез специальных генетических программ. Причём, наряду с сезонными изменениями функциональной активности разных органов и тканей зимоспящих животных существуют неоднократные модификации направленности и интенсивности метаболизма их клеток в течение каждого баута.

При впадении в зимнюю спячку выключается система терморегуляции и включаются другие механизмы регуляции метаболизма. Причиной этого является перестройка активности гипоталамо-гипофизарной системы мозга, изменение регуляции метаболизма и функций, модификация содержания ряда гормонов. Кроме этого, в организме гетеротермов во время охлаждения и гибернации синтезируется «*триггер зимней спячки*» - пептид, который обладает гипометаболическим действием. Под его действием практически все клетки организма переходят в состояние гипобиоза. Регулируя содержание *триггера* в организме через гипоталамо-гипофизарную систему,

животные регулируют уровень активности и периодичность циклов зимней спячки.

Таким образом, гибернация млекопитающих связана со сложными процессами метаболической и физиологической перестройки в организме под влиянием как внешних (температура, продолжительность светового дня, наличие пищи), так и внутренних (терморегуляция, эндокринная и нервная деятельность) факторов. Это связано с глубокими биохимическими перестройками углеводного, липидного и белкового метаболизма.

Подготовка млекопитающих к зимней спячке заключается в накоплении гликогена и жира. Например, у сусликов накопленный жир может составлять до 50% веса тела. Жир является основным источником энергии и эндогенной воды на протяжении нескольких месяцев зимней спячки. Важным источником энергии и тепла у гибернирующих млекопитающих (особенно на ранних стадиях пробуждения) является бурая жировая ткань. Пробуждение гибернирующих животных связано с огромными затратами энергии и расходом жировой ткани, а иногда и тканей внутренних органов. Так, суслики за полгода зимней спячки (после нескольких циклов гибернации) теряют до 99% жировой ткани, до 50% веса печени и 30% мышц.

В процессе гибернации задействованы почти все железы внутренней секреции. Особенно важна в ней роль гипоталамуса - части ядра промежуточного мозга, регулирующего эндокринную систему. При удалении передней доли гипоталамуса суслики не могут выйти из состояния спячки, а после повреждения задней части гипоталамуса они не впадают в спячку.

Важную роль играют генетические механизмы регуляции зимней спячки. На каждом из этапов зимней спячки: в активном состоянии, охлаждении, спячки или разогреве, в органах и тканях синтезируется специфический набор белков и ферментов (в том числе и изоферментов), соответствующих данным физиологическим условиям. Это означает, что в каждом из состояний работает своя система генов. То есть способность к зимней спячке закреплена генетически. Эта уникальная способность некоторых млекопитающих жить при разных температурах обусловлена периодическими переключениями генетических сетей в геноме каждой клетки, обеспечивая синтез необходимых для данного состояния структурно-функциональных белков и ферментов.

Таким образом, гетеротермные млекопитающие способны без затруднения переходить из состояния нормотермии (биоза) в состояние гипотермии (гипобиоза) и назад, что не свойственно другим млекопитающим, в том числе и человеку. Зимоспящие могут довольно легко и быстро охлаждаться более чем на 30°C и также свободно разогреваться без всякого ущерба для своего здоровья. Это свидетельствует о потенциальной возможности ввести и человека в состояние гибернации, что будет иметь большое медицинское и социальное значение.

19.3. Терморегуляция у млекопитающих

Существенную роль в поддержании температурного гомеостаза теплокровных животных играет их способность к *терморегуляции*, то есть их способность регулировать как *телопродукцию*, так и *телоотдачу*.

Источником *телопродукции* как у гомойотермных, так и у пойкилотермных животных является химическая энергия усвоенных питательных веществ. Она преобразуется и запасается в форме макроэргических связей, расходуется на работу и частично *преобразуется в тепло*.

Телоотдача регулируется разными физическими механизмами. Например, наличием теплоизоляции в виде шерсти, жира или перьев. Она растёт с увеличением площади охлаждаемой поверхности, разницы температур среды и организма и с уменьшением теплоизоляции организма от окружающей среды.

Таким образом, температурный гомеостаз у животных поддерживается благодаря использованию баланса двух противоположных процессов: *телопродукции* и *телоотдачи*.

19.3.1. Теплопродукция. Химическая терморегуляция

В основе теплопродукции лежат окислительно-восстановительные биохимические процессы в организме во всех органах и тканях. Эти реакции обеспечивают энергией образование АТФ и разнообразные анаболические процессы, а также выполнение множества функций (синтез различных веществ, образование структур, транспорт, сокращение и др.). Часть энергии при этом рассеивается в виде тепла в близлежащем пространстве в виде кинетической энергии молекул. То есть превращения энергии в организме сопровождаются тепловыми потерями, которые и являются источником тепла.

Таким образом, в основе теплопродукции лежат активные процессы химического характера. При расщеплении химических связей питательных веществ в клетках часть освобождённой энергии аккумулируется в АТФ, а часть рассеивается в виде тепла (первичная теплота – 65–70% энергии). При использовании макроэргических связей молекул АТФ часть энергии идёт на выполнение полезной работы, а часть рассеивается (вторичная теплота). Таким образом, два потока теплоты – первичной и вторичной – являются теплопродукцией.

Кровь, протекая через функционирующие ткани и органы, нагревается. Из локальных мест выделения тепла кровеносная система разносит его по всему организму.

В основе *химической терморегуляции* лежат механизмы усиления теплопродукции путем *сократительного и несократительного термогенеза*.

Несократительный термогенез. Это базовый источник тепла в организмах животных. Его основой являются стабильные экзотермические

метаболические реакции (окисление, окислительное фосфорилирование, дефосфорилирование), постоянно протекающие в тканях и органах (печень, сердце, скелетные мышцы, почки, желудочно-кишечный тракт и др.). Не все ткани принимают одинаковое участие в выработке тепла. Печень служит энергичным центром теплообразования. Её температура у млекопитающих в норме достигает 40°C, а теплопродукция составляет до 25 %.

Головной мозг также служит местом теплообразования, так как установлено, что его температура оказывается даже выше притекающей к нему артериальной крови. Малоактивные ткани — кости, хрящи, соединительная ткань выделяют относительно малые количества тепла. Мышцы, печень, сердце и мозг являются основными калоригенными, теплообразовательными органами. Избыток тепла организм рассеивает в окружающее пространство.

Экзотермические биохимические реакции *в состоянии покоя* или *комфортных условиях* обуславливают у теплокровных животных наличие «базального метаболизма» и постоянную выработку побочного метаболического тепла. В результате такой достаточно стабильной продукции тепла и поддерживается постоянная температура их тела.

Органы и ткани гомойотермных животных вносят основной вклад в теплопродукцию организма, однако неспособны обеспечить ее быстрое и значительное увеличение при необходимости. Для этой цели используется сократительный термогенез.

Сократительный термогенез. Значительное и быстрое повышение теплопродукции в организме обеспечивается сократительной активностью скелетной мускулатуры, которая включает в себя произвольные мышечные сокращения, мышечную дрожь и мышечный тонус.

Произвольные мышечные сокращения связаны с выполняемой организмом работой, при этом теплопродукция быстро увеличивается в несколько раз. Источником тепла при сократительном термогенезе являются тепловые потери метаболизма, сопровождающие сократительную активность.

Холодовая мышечная дрожь представляет собой нерегулярные, периодически возникающие серии сокращений мышц-антагонистов.

Мышечный тонус — это особая форма сократительной активности мышц, повышенного тонуса, не обнаруживаемого визуально. Однако его можно обнаружить с помощью специальных чувствительных датчиков механических колебаний.

Вещества – источники энергии и тепла в организме.

Жировая ткань является главным источником энергии в организме животных. Её запасы могут составлять от 10 до 50% от веса тела. При окислении 1 грамма жира выделяется 39 ккал энергии, что более чем в 2 раза больше, чем при окислении 1 грамма глюкозы. Выделенная энергия используется организмом для совершения работы и для теплопродукции.

Бурый жир — откладывается у млекопитающих преимущественно в области шеи, в подмышечной области и между лопатками. Он играет важную роль в

пробуждении гибернирующих животных, когда необходим быстрый разогрев организма. У человека бурый жир присутствует в заметных количествах только в период новорожденности. Интенсивность окисления жирных кислот в бурой жировой ткани в 20 раз превышает скорость этого процесса в белом.

Гликоген и его моносахарид глюкоза являются универсальными источниками энергии, используемым животными как при сократительном, так и при несократительном термогенезе, хотя их энергетическая ценность менее высока по сравнению с жиром. При окислении 1 грамма глюкозы выделяется 17 ккал энергии. Глюкоза в виде гликогена может запасаться в клетках печени и мышцах, но её количество составляет только примерно 1% от веса тела животного.

19.3.2. Теплоотдача. Физическая терморегуляция

Физическая терморегуляция представляет собой совокупность механизмов, обеспечивающих теплоотдачу. Теплоотдача организма зависит от внутренних и внешних факторов. Внутренние - теплопроводность, площадь теплоотдачи, наличие покровов, испарения или излучения. Внешние – плотность и температура среды.

В живой природе используются разные способы снижения теплоотдачи. Миграция позволяет животным избегать действия слишком низких температур внешней среды. Поиск комфортных температурных условий также является одной из характерных форм поведения разнообразных организмов (от простейших до человека). К таким формам поведения могут быть отнесены простые термотаксисы и сложные миграционные процессы, поиск убежищ и различные формы группового поведения.

Относительно большие размеры тела позволяют гомойотермным животным поддерживать тепловой баланс при меньшем уровне удельной теплопродукции за счет уменьшения поверхностно-объемного отношения.

При перегреве организма единственным способом сброса излишков тепла является выделение пота потовыми железами и его испарение с поверхности кожи, а также испарение жидкости с поверхности слизистой оболочки, выстилающей дыхательные пути. Испарение 1 мл пота сопровождается потерей 0,58 ккал тепла. При высоких внешних температурах с поверхности тела испаряется ~ 500 мл пота, и 300÷400 мл жидкости испаряется с поверхности дыхательных путей.

Тепловые потери через поверхность тела существенно определяются уровнем *теплоизоляции* организма. Теплоизоляцию увеличивают подкожный жир, перьевое или волосяное покрытие. Так, песец способен поддерживать температуру тела 38°C при температуре окружающей среды минус 70°C с увеличением теплопродукции всего на 38%.

Величина тепловых потерь в условиях поддержания температурного гомеостаза равна теплопродукции и зависит от физиологического состояния организма (покой, работа и т.д.). Регуляцию теплоотдачи обеспечивают

частота дыхания и регуляция периферического кровообращения. Тепловые потери во влажном воздухе и воде выше и неодинаковы с различных участков тела. Даже в теплой воде при 28-30°C теплоотдача увеличивается в несколько раз. Наибольшие тепловые потери исходят от головы и шеи, обнаженных частей рук и туловища.

19.3.3. Механизмы регуляции температуры тела

Гипоталамус. Регуляция температуры тела, в первую очередь, осуществляется *центром терморегуляции* ЦНС, который локализуется в преоптической области передней части гипоталамуса (ПОПГ) около дна третьего желудочка. Этот центр отвечает за координацию функций организма, имеющих отношение к теплопродукции и теплоотдаче и обеспечивающих поддержание температуры «ядра» в необходимых пределах. Разрушение этого участка мозга или нарушение его связи с телом в результате пересечения на уровне среднего или спинного мозга ведет к тому, что у животных нарушается контроль над температурой тела. У экспериментальных животных химическое воздействие на ПОПГ также вызывает резкое изменение температуры тела.

Центр терморегуляции. Ведущую роль в терморегуляции играют структуры гипоталамуса. Предполагается наличие в гипоталамусе трех видов терморегуляторных нейронов:

- 1) афферентных нейронов, получающих сигналы от периферических и центральных терморецепторов;
- 2) вставочных нейронов, обрабатывающих информацию;
- 3) эфферентных нейронов, передающих сигналы на органы, контролирующую активность системы терморегуляции.

От периферических терморецепторов информация поступает в передний гипоталамус. Здесь расположены нейроны, в которых происходит сравнение полученных с периферии сигналов с информацией центральных рецепторов, отражающих температуру мозга. На основе обработки информации этих двух источников нейроны заднего гипоталамуса генерируют сигналы, управляющие механизмами теплопродукции и теплоотдачи.

Центр терморегуляции состоит из нескольких анатомически и функционально разных частей. Главными являются: термочувствительная область (термостат), термоустановочная область («установочная точка») и две эффекторных области (теплопродукции и теплоотдачи). Гипоталамус управляет процессами теплопродукции и теплоотдачи, посылая сигналы (либерины или статины) к гипофизу, где вырабатываются тропные гормоны, регулирующие активность желез внутренней секреции, главным образом, щитовидной и надпочечников.

Рецепторы. Известны центральные и периферические терморецепторы. Периферические рецепторы локализованы в коже и внутренних органах, центральные – в гипоталамусе. Кожные рецепторы обеспечивают передачу в центры терморегуляции сигналов о колебаниях

температуры внешней среды, а также формируют температурные ощущения. Среди кожных рецепторов имеются холодовые и тепловые. Число холодовых рецепторов значительно превышает число тепловых. Среди внутренних рецепторов также преобладают холодовые. Информация о температуре воспринимается терморецепторами и при помощи нервной системы попадает в мозг.

В спинном и среднем мозге, а также в гипоталамусе (более всего в его медиальной преоптической области) расположены центральные терморецепторы (термосенсоры). Это специальные нейроны, которые могут реагировать на охлаждение или нагревание даже на 0, 1°C и давать команду на изменение интенсивности теплопродукции или теплоотдачи.

Эфферентные пути терморегуляции. Стимуляция теплопродукции осуществляется соматической нервной системой, включающей сократительные терморегуляторные реакции, и симпатической нервной системой, активирующей несократительную теплопродукцию.

Норадреналин, освобождаемый симпатическими нервными окончаниями, стимулирует выделение из жировой ткани свободных жирных кислот и последующее включение их в метаболические экзотермические реакции. Выделение катехоламинов из надпочечников вызывает такие же метаболические эффекты. При этом происходит разобщение процессов окисления и фосфорилирования, что приводит к повышенному выделению тепла.

Соматическая нервная система при необходимости стимулирует мышечные сокращения, дрожание или повышенный тонус мышц, что также приводит к дополнительному получению тепла.

Регуляция теплоотдачи связана с активностью норадренергических симпатических нейронов, возбуждение которых может приводить к снижению просвета кровеносных сосудов кожи, и холинергических симпатических нейронов, возбуждающих потовые железы.

Эндокринная система. Гипоталамус управляет процессами теплопродукции и теплоотдачи, посылая химические сигналы к железам внутренней секреции, главным образом, щитовидной и надпочечникам.

Участие щитовидной железы в терморегуляции обусловлено тем, что влияние пониженной температуры приводит к усиленному выделению её гормонов, ускоряющих обмен веществ и, следовательно, теплообразование.

Роль надпочечников связана с выделением ими в кровь катехоламинов, которые, усиливая или уменьшая окислительные процессы в тканях (например, мышечной), увеличивают или уменьшают теплопродукцию и сужают или увеличивают кожные сосуды, меняя уровень теплоотдачи.

Процессы несократительного термогенеза регулируются путём активации симпатической нервной системы, повышенной продукцией гормонов щитовидной железы и гормонов мозгового слоя надпочечников. Гормоны щитовидной железы являются важнейшими регуляторами энергетики целостного организма и его систем. При экспериментальном

гипертиреозе увеличивается тепловая эффективность мышечного сокращения, а при гипотиреозе, наоборот, снижается.

Участие гуморальных механизмов терморегуляции особенно значительно при адаптации к повторным изменениям температуры среды. Например, у животных повышение секреции тироксина развивается при действии холода в течение нескольких недель, при этом на 20-40 % увеличивается масса железы. Повышение секреции тироксина приводит к активации клеточного метаболизма и выделению тепла.

Регуляция при охлаждении. При снижении температуры «ядра» тела происходит активация холодowych гипоталамических терморесепторов. Помимо гипоталамических термочувствительных нейронов (холодовые термосенсоры), происходит активация холодowych сосудистых и органных терморесепторов. Их импульсация вызывает дополнительную активацию нейронного аппарата гипоталамического центра химической терморегуляции. В результате повышения активности этого центра стимулируется эндокринная система и усиливается работа периферических органов химической терморегуляции, в результате чего увеличивается производство тепла в организме. Нейрофизиологическая активность центра физической терморегуляции, а также периферических аппаратов теплоотдачи в этой ситуации снижается. Взаимодействием этих двух систем блокируется понижение температуры ядра тела.

Гипотермия. Неспособность организма справиться с охлаждением (продолжительное пребывание при низкой температуре) приводит к гипотермии – постепенному понижению температуры тела. Процессы терморегуляции в этих условиях сначала включаются на полную мощность, но затем теплоотдача начинает превышать теплопродукцию, и температура ядра организма продолжает понижаться. И уже при температурах ниже $26\div 28^{\circ}\text{C}$ смерть у млекопитающих может наступить из-за фибрилляции и остановки сердца или блокировки дыхательного центра.

Рекомендуемая литература:

4. Калабухов Н.И. Спячка млекопитающих. М.: 1985. 260 с.
5. Мак-Мюррей В. Обмен веществ у человека. М., 1980.
6. Общий курс физиологии человека и животных / под ред. А. Д. Ноздрачева. М., 1991. кн.
7. Проссер Л. Сравнительная физиология животных. М.: Мир. 1977, 1, 608 с, 2, 571 с.
8. Слоним А. Д. Эволюция терморегуляции. Спб., 2005.
9. Лозина-Лозинский Л.К. Очерки по криобиологии/ Л.:Наука.-1972.- 287с.
10. Денков В. На грани жизни /М.:Знание.-1988.-192с.
11. Голдовский А.М. Анабиоз/ Л.:Наука.-1981.-136с.

12. Эккерт Р., Рэнделл Д., Огастин Дж. Физиология животных/ М.: Мир.-1992.-т.2.-424с.
13. Хаскин В.В. Энергетика теплообразования и адаптация к холоду/ Новосибирск-Наука.-1975.-198с.
14. Держинский Ф. Я., Васильев Б. Д., Малахов В. В. Зоология позвоночных. 2-е изд. — М.: Издат. центр «Академия», 2014. — 464 с.

Глава 20. Приспособленность организмов к низким температурам

20.1. Основные понятия и определения. 20.2. Жизнь в экстремальных температурных условиях. 20.3. Холодоустойчивость организмов. 20.4. Способы выживания организмов. 20.4.1. Анабиоз. 20.4.2. Гипобиоз.

20.1. Основные понятия и определения

Приспособленность (адаптация) – это способность обитать в определенных геофизических условиях, что обеспечивается особенностями строения, функционирования и развития организмов, а также комплексом поведенческих реакций, направленных на поддержание *гомеостаза* и повышение устойчивости к действию неблагоприятных факторов среды. Это также способность живых существ приспосабливаться к изменениям физико-химических факторов среды обитания.

Большинство обитателей Земли адаптированы к существованию в определенной температурной среде, хотя имеются примеры проникновения обитателей одной среды в другую.

Гомеостаз - поддержание постоянства параметров внутренней среды (температура, строение, функции, состав и др.) при изменении условий внешней среды в широких диапазонах.

Животные, которые способны поддерживать температурный гомеостаз, называются *гомойотермными* (homeo – одинаковый, подобный). *Пойкилотермные* организмы (от греч. poikilos - изменчивый), в отличие от гомойотермных, не способны поддерживать температуру тела на постоянном уровне.

Наряду с *пойкилотермными* и *гомойотермными*, в природе существуют так называемые *гетеротермные* организмы, для которых характерны суточные или сезонные колебания температуры, например, зимоспящие млекопитающие. В благоприятных условиях они (например, суслики, ежи) поддерживают температурный гомеостаз своего тела на уровне 38°C, а в неблагоприятных (зимой) – впадают в состояние гипобиоза при температуре тела 2-5°C. В этом состоянии они, как и пойкилотермные организмы, изменяют свою температуру при изменении температуры внешней среды.

Криофилия и термофилия – это устойчивая адаптация организмов к существованию в условиях пониженных и повышенных температур соответственно. Для криофилов и термофилов характерна способность к *стенотермии*, то есть приспособленность к сравнительно узкому диапазону температур.

Эвритермия - способность живых организмов поддерживать свои функции и жизнедеятельность при изменении температуры внешней (внутренней) среды в широком диапазоне.

Приспособительные возможности живых тел, направленные на поддержание жизнедеятельности в экстремальных условиях, не являются безграничными – для каждого организма существуют определенные интервалы температуры и других параметров внешней среды, за пределами которых адаптация к экстремальным факторам становится невозможной. В этих случаях в действие вступают поведенческие реакции избегания или механизмы гипобиоза и анабиоза.

Гипобиоз – это состояние, при котором жизнеспособность организмов поддерживается без выраженных признаков их жизнедеятельности и отличающееся низким уровнем метаболизма. Примерами гипобиоза являются оцепенение у рыб, земноводных и пресмыкающихся, диапауза у насекомых, торпидное состояние у птиц, гибернация (зимняя спячка) и эстивация (летняя спячка) у млекопитающих, состояние самадхи у йогов и, наконец, летаргический сон.

Анабиозом называется временное обратимое прекращение процессов метаболизма и функций в организме. Примерами анабиоза являются замерзающие на зиму семена, споры, цисты, бактерии, грибы, а также некоторые более крупные организмы, способные замерзнуть и отогреться, например, тихоходки, углозубы, некоторые виды насекомых, рыб, амфибий и пресмыкающихся.

20.2. Жизнь в экстремальных температурных условиях

Обитатели литосферы, избегая экстремальных температур, тем не менее, способны сохранять активность при достаточно низких температурах. Основными способами сопротивления холоду в этом случае являются повышение интенсивности питания, дыхания и хорошая теплоизоляция организма. Например, заселяющие районы Арктики со среднемесячной температурой января минус 50°C землеройки (самые мелкие млекопитающие), обладают необычайной прожорливостью: при 17°C они поедают количество пищи, составляющее в сутки $150\div 190\%$ веса тела, а при 0°C - еще больше. Эффективный способ адаптации избран пингвинами, накапливающими жир, обитающими в исключительно суровых условиях Антарктиды. Хорошая теплоизоляция пингвинов является существенным дополнением к их способности долгое время обходиться без еды.

На границах вечной снеговой линии в горах и в полярных областях в почве, во мхах и лишайниках встречаются организмы, у которых генетически выработалась способность ускоренно развиваться в течение короткого вегетационного периода, а затем переходить в состояние длительного покоя. В горах на высоте выше 4000 м большинство видов насекомых остаются активными. Предпочитаемая ими температура находится в пределах $2\div 10^{\circ}\text{C}$. Некоторые насекомые проходят развитие и метаморфоз при температурах от $1,7$ до минус $1,5^{\circ}\text{C}$. Их развитие протекает медленно, некоторые виды развиваются в течение нескольких лет, зимую один год в одной фазе, а

следующий - в другой. Всю жизнь на ледниках проводит червь из отряда *Oligochaeta*, обнаруживаемый в больших пространствах от Орегона до Аляски. На ледниках Альп обнаружен червь *Mesenchytralus solifugus rainierensis*, личинки которого вылупляются при температуре ниже 0°C. Большинство высокогорных насекомых имеют небольшие размеры тела (3 ÷ 3,5мм). Тело обитающих на снежных полях и скалах животных часто опушенное или покрыто восковым налетом.

Вблизи кромки снега в горах постоянно встречаются ногохвостки, жужелицы, чернотелки и двукрылые, питающиеся занесенными ветром и вмерзшими в лед насекомыми и другими органическими остатками. Подвижность взрослых жуков, полужесткокрылых и веснянок обнаружена ночью при температуре воздуха около минус 4,5°C. Активность ногохвосток (Рис.20.1) наблюдалась при температуре минус 10°C, снежной мухи *Ciona* - при минус 8°C. Ногохвостки, питаясь днем переносимой ветром пылью хвойных деревьев, ночью, оставаясь на поверхности Альпийских ледников, примерзали к ней. Пауки *Hypogastrura Proisotoma* на высоте 5000м охотятся за оцепеневшими двукрылыми даже во время снегопада, а жуки *Astagobius angustratus* проявляют активность даже при минус 17°C.



Рис. 20.1. *Hypogastrura nivicola* — вид ногохвосток, «снежная блоха». Синтезирует богатый глицином антифризный белок, который позволяет существовать в условиях минусовых температур. Белок предотвращает образование кристаллов льда в тканях.

В Антарктиде немногие виды активных беспозвоночных встречаются лишь в областях, где летом происходит оттаивание почвы. Это представители ногохвосток *Collembola* из семейств *Hypogastruridae*, *Onychiuridae* и *Isotomidae* и двукрылые из семейства *Chironomidae*. Ногохвостки *Isotoma klovstodi* встречаются при отрицательных температурах во мху, в скоплениях камней вместе с тихоходками (*Tardigrada*), нематодами (*Nematodes*) и простейшими. Активность этой микрофауны обычно наблюдается при температурах немного выше 0°C. Ногохвостки проявляют активность только утром до полудня при относительно высокой влажности воздуха. В Антарктиде на высоте 3600 м, где температура ночью опускается

до минус 10°C, обнаружен и описан биоценоз, состоящий из грибов, циановых водорослей, бактерий, коловраток и цист тихоходок.

В Арктике при температурах ниже 0°C большинство насекомых впадает в оцепенение, активность наблюдается в основном у двукрылых, в частности, у мух небольшого семейства *Helomyzidae*, ареал обитания которых простирается от пустынь Средней Азии и высот Памира до берегов Северного Ледовитого океана. Эти мухи, подобно многим другим видам двукрылых, отличаются эвритермностью и проявляют активность при температурах до минус 10°C.

В основе эвритермии микрофауны высокогорных областей и высоких широт и активности эвритермов при отрицательных температурах может лежать, по крайней мере, два механизма. Первый предполагает нагрев тела (например, под влиянием солнечной радиации или мышечной деятельности), в результате которого скорость биохимических реакций в организме возрастает до необходимого физиологического уровня. Второй механизм может быть связан с наличием в составе мембран молекул ненасыщенных жирных кислот, разжижающих липидные бислои при пониженных температурах и позволяющих неглубокое замерзание.

Криоустойчивость некоторых видов криофилов и эвритермов имеет в своей основе иные механизмы, связанные, по-видимому, с их способностью *избегать или переносить замерзание воды* в организме. Важно подчеркнуть, что криофилия практически всегда сопряжена с холодовой стенотермией (от греч. «узкий» и «тепло»), то есть существуют в условиях слабых колебаний температуры. Особо узок температурный оптимум ногохвосток (0 ÷ +5°C). При температурах выше 10°C они погибают. Наряду с ногохвостками наиболее стенотермны клещи, веснянки, некоторые двукрылые, жужулицы и полужесткокрылые.

Обитатели гидросферы демонстрируют не менее впечатляющие примеры адаптации, чем представители литосферы. Например, множество пресноводных организмов погибает при повышении “солености”, что происходит миллионы лет в устьях рек, впадающих в моря. Но в гипергалинных (от греч. “сверх” и “соленый”) озерах при почти предельном насыщении солями существуют и развиваются (да еще в огромных количествах!) листоногий рачок *Artemia salina* и служащее ему пищей жгутиковое *Dunaliella*.

Большинство животных может существовать только при достаточном насыщении среды *кислородом*. Есть и такие животные, которые не переносят даже небольшого снижения концентрации кислорода, например, турбеллярии *Planaria alpina* и ракообразное *Bythotrephes* - стенооксибионтные организмы. Но имеются примеры способности некоторых животных из разных групп существовать и при малом количестве кислорода или без него – некоторые водные личинки двукрылых, некоторые низшие ракообразные, нематоды и др.

В арктических морях обитает немало представителей животного мира, вся жизнь и размножение которых протекает при температуре около 0°C , а иногда на $1,5-1,8^{\circ}\text{C}$ ниже нуля, например, моллюск *Portlandia arctica*, офиуры *Ophiopleura borealis* и *Gorgonocephalus arctieus*, звезды *Asterias panopla* (Рис. 20.2) и *Pentaster temispinus*, креветка *Sclerocrangon ferox*, морской таракан *Mesidothea sabini*. В то же время коралловые рифы не могут развиваться при температурах ниже $21,5^{\circ}\text{C}$. И те и другие - stenotherms.

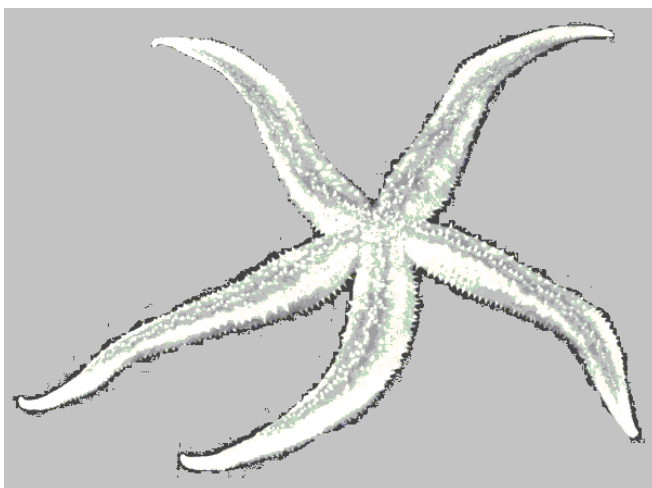


Рис. 20.2. Морская звезда *Asterias panopla*. Способна сохранять активность в переохлажденной морской воде при температурах $0 - \text{минус } 2^{\circ}\text{C}$.

Существует и фауна горячих источников - это животные, жизнедеятельность которых может протекать при температурах $40-50^{\circ}\text{C}$ и выше (нематоды, личинки мух, брюхоногие моллюски и др.). Термофилы, в отличие от криофилов, преимущественно содержат в мембранах насыщенные жирные кислоты и поэтому не могут функционировать при пониженных температурах из-за перехода мембранных липидов из жидкокристаллического в твердое гелеобразное состояние. Криофилы, в свою очередь, могут погибать при повышенных температурах из-за чрезмерного «разжижения» мембран, которое приводит к термоденатурации связанных с мембранами белков.

Абсолютной корреляции между предпочитаемой криофилами температурой и их холодоустойчивостью не обнаружено. Зимующие на высокогорье семиточечные божьи коровки *Coccinella septempunctata* не переносят замораживания ниже минус $10-12^{\circ}\text{C}$. Встречающаяся на льду и на снегу водоросль *Clamidomonas (sphaerella) nivalis* (красный налет) развивается при 5°C и выдерживает замораживание до минус 36°C . Обнаруженные в Арктике ногохвостки *Gomphiocephalus hadgsoni*, проявляющие активность при температурах выше 0°C , переносят замораживание до минус $20-28^{\circ}\text{C}$.

Таким образом, имеется достаточное количество примеров выживания живых тел в условиях экстремально низких температур. Пути приспособления могут быть разные. Главное, обладать способностью

переносить или предотвращать замерзание внутренней воды и образование повреждающих кристаллов. Большое значение имеет также способность поддерживать жидкость биомембран даже при очень низких температурах.

20.3. Холодоустойчивость организмов

Холодоустойчивость – это способность биологических объектов жить при низких положительных и без серьезных повреждений переносить периодическое действие отрицательных температур. Гомойотермные животные (млекопитающие, птицы), в отличие от пойкилотермных (пресмыкающихся, земноводных, рыб, моллюсков, насекомых), не обладают способностью выдерживать охлаждение (за редким исключением) даже на несколько градусов. В основе холодоустойчивости многих пойкилотермных организмов лежит их способность переносить полное или частичное замерзание тела или эффективно переохлаждаться в отсутствие льдообразования. Отметим некоторые закономерности, характерные для устойчивости различных организмов.

Холодоустойчивость организмов данного вида тем выше, чем более низкие температуры действуют в ареале их обитания. Обнаруженные в Антарктике ногохвостки переносили замораживание до минус 20-28°C. В то же время ногохвостки, обнаруженные на участке вечной мерзлоты в районе Железноводска в составе криофильного биоценоза, состоящего из личинок, червей, моллюсков, взрослых жуков, двукрылых и даже лягушек, замерзали и погибали при температурах ниже минус 5°C.

В основе криоустойчивости и криофилии лежат разные механизмы, что определяет различную криоустойчивость разных видов криофилов. Высокогорные божьи коровки не переносят замораживания ниже минус 10 - 12°C. Высокогорная водоросль *Chlamidomonas* выдерживает замораживание до минус 36°C, а ногохвостки Антарктиды до минус 20-28°C.

Пресноводные обитатели высоких и средних широт обладают разной криоустойчивостью. Обитатели пресных водоемов умеренной климатической зоны (насекомые, различные членистоногие, моллюски и др.) высокой криоустойчивостью не обладают. Моллюски, например, погибают при замораживании до минус 1-2°C. В то же время пресноводные личинки хирономид и некоторые другие пресноводные обитатели Арктики приспособлены к замерзанию: вмерзшие в лед личинки и ракообразные адаптированы к зимовке при температурах минус 20-24°C. Более того, личинки хирономид способны переносить многократное замораживание-оттаивание.

Холодоустойчивость морских обитателей высоких широт (Арктика) коррелирует со степенью воздействия на них атмосферного холода. Рыбам и беспозвоночным, все время находящимся в морской воде, нет необходимости развивать повышенную холодоустойчивость. Частично соприкасающиеся с воздухом во время отлива моллюски сублиторальной зоны *Lacuna vincta*

переносят замораживание только до минус 6°C . Сублиторальные моллюски *Cardium edule*, зарывающиеся в песок и полностью защищенные от действия атмосферного холода слоем воды, не переносят охлаждения ниже минус $1,9^{\circ}\text{C}$. В то же время литоральные животные, которые во время отлива длительное время подвергаются действию атмосферного холода (минус $20-25^{\circ}\text{C}$), в течение $6 \div 8$ месяцев могут находиться без особого вреда для себя при температурах до минус 30°C в замерзшем или частично замерзшем состоянии.

Температура воды в арктических водах достигает минус $1,9^{\circ}\text{C}$. Некоторые морские беспозвоночные и рыбы имеют точку замерзания крови и тканей несколько выше этой температуры и замерзают при соприкосновении со льдом. Мелководные рыбы, имеющие более низкую точку замерзания за счет повышенного содержания в организме солей и антифризных белков, имеют ничтожные шансы замерзнуть даже при соприкосновении с кристаллами льда.

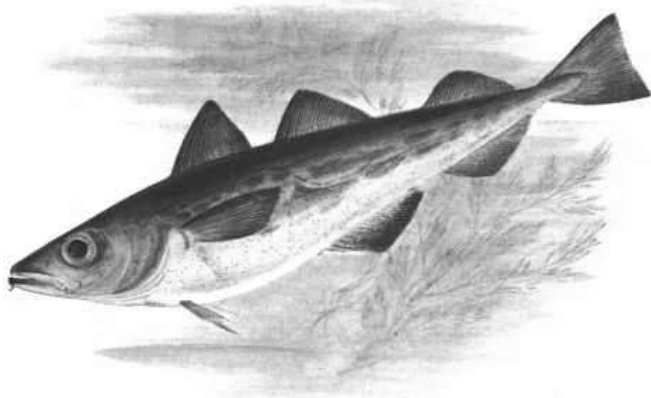


Рис. 20.3. Минтай *Theragra chalcogramma*.

Самая многочисленная тресковая рыба северных регионов Тихого океана. Обитает при экстремально низких температурах. Самка выметывает икру даже при отрицательных температурах воды, до $-1,8^{\circ}\text{C}$. Средний размер минтая 50 см, максимальный – 80 см при весе 1,4 кг.

Холодоустойчивость арктических рыб и литоральных животных подвержена сезонным колебаниям. Температуры замерзания крови минтая (Рис. 20.3) и бычка *Myoxocephalus scorpius* даже летом находятся в пределах минус $0,77-0,87^{\circ}\text{C}$, а зимой при температуре воды минус $1,7^{\circ}\text{C}$ - в пределах минус $1,47 \div 1,5^{\circ}\text{C}$. Многощетинковые колченцы *Spirorbis* в зимнее время переносят температуры минус $12-14^{\circ}\text{C}$ в течение 72 часов и минус $18-20^{\circ}\text{C}$ в течение 12 часов; в летнее время большинство этих червей повреждается температурами минус $12-14^{\circ}\text{C}$ в течение 12 часов. Яйца с зародышами и молодь брюхоногих моллюсков *Lacuna pallidula* и *Littorina obtusata*, развивающихся на литорали, выдерживают зимой и летом температуры минус $12-13^{\circ}\text{C}$ в течение 76 и 12 часов соответственно.

Холодоустойчивость насекомых изменяется в пределах вида: она связана с климатическими факторами и, по-видимому, закреплена наследственным отбором. В умеренном поясе зимующие близко к поверхности почвы, недостаточно адаптированные к холоду, беспозвоночные часто массово гибнут в суровые зимы при отсутствии снегового покрова. В

то же время некоторые виды приспособились к низким температурам, зимую на небольшой глубине в почве, например, луговой мотылек *Loxostege sticticalis*. Температуры до минус 30°C и ниже хорошо переносят древесные жуки, например, древоточцы *Diarisia virginata*, *Synchroa punctata*, *Polygraphys*, перепончатокрылые *Bracon cephy*, *Eurytova gigantea*, *Eurostasalidaginis* (среди двукрылых). Высокой устойчивостью к холоду обладают многочисленные бабочки. Наибольшей холодоустойчивостью характеризуются личинки, затем яйца и куколки, меньшей – имаго. Имеются свидетельства об «успешной» зимовке личинок короеда *Seolytus multistriatus* (под корой в переохлажденном или частично замерзшем состоянии) и гусениц озимой совки *Mamestra sp.* (на коре в замерзшем состоянии) при температурах, достигавших минус 55°C и длительное время не опускавшихся ниже минус 40°C. Диапаузирующие гусеницы кукурузного мотылька *Pyrausta nubilalis* из районов Украины, Ставрополя и Северного Кавказа, зимующие в полостях крупностебельчатых растений, переносят не только длительное замораживание до минус 30°C, но и многократное замораживание-оттаивание. В то же время гусеницы лугового мотылька из южных Штатов Америки, отличающихся короткими теплыми зимами, подобной холодоустойчивости не проявляют.

Таким образом, пойкилотермные животные обладают способностью обитать при пониженных температурах. Несмотря на температурный оптимум обитания 10 – 20°C, многие способны охлаждаться вплоть до 0°C. Но далеко не все пойкилотермы являются холодоустойчивыми и способны переносить температуры ниже нуля. У таких животных эволюционным путем выработались различные механизмы криоустойчивости, которые изложены в главе 21.

20.4. Способы выживания организмов

Среди приспособлений (адаптаций), при помощи которых живые организмы переживают неблагоприятные для них условия существования, видное место занимает переход в *состояние полного или относительного покоя*. Явление полного обратимого прекращения обменных процессов в организме получило название *анабиоз*, а существенное замедление этих процессов – *гипобиоз*.

20.4.1. Анабиоз

Стадии покоя. Цисты, яйца, споры, семена. Многие пресноводные микроскопические животные (коловратки, листоногие, ветвистоусые ракообразные и др.) образуют покоящиеся, или зимние, яйца, способные переносить высушивание или зимние низкие температуры. Например, низшие ракообразные *Entomostaca* – водяные блохи (род *Daphnia*) способны откладывать как летние, так и зимние яйца. Последние имеют более прочную оболочку. Интересно заметить, что для некоторых видов ракообразных высушивание или замерзание яиц является необходимым условием

продолжения их развития. Длительное время могут находиться во внешней среде яйца некоторых паразитических червей. По меньшей мере, 9 лет могут сохранять жизнеспособность яйца рачка *Artemia salina*. Сходные стадии покоя присущи пресноводным губкам и мшанкам (геммулы и статобласты), но это не яйца, а многоклеточные комплексы.

Многие пресноводные простейшие (корненожки, инфузории) и микроскопические многоклеточные (тихоходки, нематоды, коловратки и др.) при наступлении неблагоприятных условий преобразуются в *цисты*. У паразитических простейших образование цист связано с их выходом во внешнюю среду. Дизентерийная и другие формы амёб, паразитирующие в кишечнике человека, будучи выведены во внешнюю среду (воду, почву) в активном состоянии быстро погибают и не могут служить источником заражения. Заражение осуществляется особыми формами существования амёб – цистами. Образование цист происходит при попадании амёб в нижние отделы кишечника и прямую кишку. Другие паразиты человека – лямблии, живущие в верхних отделах тонкого кишечника, также могут инцистироваться: теряют жгутики и выделяют оболочку. Паразиты лягушек опалины (*Opalina*) образуют цисты, которые покоятся на дне водоемов, пока не проглатываются головастиками.

Приведенные примеры показывают, что не все цисты можно рассматривать как стадии покоя, некоторые выступают, скорее, в роли определенных стадий развития, не устойчивых к действию экстремальных факторов. Тем не менее, многие цисты демонстрируют примеры высокой устойчивости. Цисты коловраток, например, способны переносить не только замораживание в широком диапазоне температур, но и кратковременный (5 мин) нагрев до 100°C. Во льду Гренландии обнаружены цисты инфузорий *Colpoda*, оказавшиеся жизнеспособными. Опыты с циклическим изменением температуры в течение суток: 25 → минус 20-30 → 25°C, показали, что инфузории *Colpoda taupast* в течение первых суток преобразуются в цисты и сохраняются в последующем в такой форме. Интересно, что при таком температурном режиме бактерии *Micococcus luteus* и ряд других, в частности, выделенные из почв Антарктиды, успевали размножаться, хотя и менее интенсивно, чем в термостате.

К перечисленным стадиям покоя можно добавить *споры и семена растений*. Устойчивость стадий покоя во многом определяется способностью обратимо терять воду и переходить в состояние ангидробиоза. Например, оплодотворенные покоящиеся яйца артемий способны к обратимой потере практически всей воды. Способностью к высушиванию обладают яйца ногохвосток и коловраток, семена растений и даже некоторые целые растения.

Ангидробиоз. Другим важным условием длительного сохранения жизнеспособности при прекращении процессов метаболизма является контролируемая дегидратация. Дегидратация приводит, с одной стороны, к увеличению вязкости η среды по закону $\eta \sim \exp(E_A/k_0T)$, в результате чего замедляются транспорт метаболитов и биохимические реакции; с другой – к

сближению структур и их дезорганизации в результате нарушения гидрофильных связей. Адаптированные к высушиванию организмы для предотвращения негативных последствий высушивания используют стратегию замещения воды на потерявших ее поверхностях фосфолипидами, стеринами, сахарами и т.д. Возможно, благодаря именно этой стратегии происходит ингибирование части ферментов, наблюдаемое, в частности, при ангидробиозе семян. В связи с тем, что быстрая потеря воды при переходе в состояние анабиоза (ангидробиоза) может быть причиной чрезмерных механических деформаций и привести к повреждению клеток, в ходе эволюции наряду с развитием соответствующих особенностей строения выработались приспособления, обеспечивающие постепенное высушивание. У коловраток и тихоходок в начале высушивания происходит образование плотной бочкообразной конфигурации, нематоды сворачиваются в плотную спираль, что уменьшает поверхность испарения. От слишком быстрого высушивания предохраняет образование цист, имеет значение и наличие в окружении высушающихся организмов мха и песка.

Образование цист также может быть связано с потерей воды, сопровождающейся реструктуризацией цитоплазмы. Имеются свидетельства о «загустевании» и уплотнении цитоплазмы клеток коловраток и других животных при переходе в состояние ангидробиоза. Наблюдение процессов высушивания коловраток и тихоходок выявляет их заметное съеживание и уплотнение. Черепашья пиявка *Ozobranchus jantscanus* превращается при высушивании в пуговкообразную, твердую, как дерево, черную сухую пластинку, уже не похожую на червя. Протоплазма сухих семян приобретает свойства твердого геля. Вакуоли в клетках высушенных растений (например, папоротника *Ceterach*) превращаются в «твердые тела». Однако при всех случаях обводнение объектов возвращает их к жизни.

Ангидробиоз представляет собой чрезвычайно распространенное явление в жизни многих организмов. Иллюстрацией тому является фауна и флора пересыхающих водоемов. При увлажнении сухого ила, сохранявшего влажность $1,7 \div 4\%$ в течение $1 \div 10$ лет, в нем обнаружены в жизнеспособном состоянии многочисленные представители животного мира (инфузории- парамеции; сувойки; корненожки; ракообразные – жаброногие, ветвистоусые, ракушковые, веслоногие; коловратки и др.), а также разнообразные водоросли (зеленые, диатомовые, эвгленовые). Сообщалось о возможности высушивания личинок комара *Polypedilum vanderplanki* Hint, обитающего в Нигерии и Уганде. В соляных пластах на глубине 209 м обнаружены два вида галобактерий *Pseudomonas halocrenae*, просуществовавших в ангидробиотическом состоянии 180 млн. лет. В нерастворимых остатках ископаемых калийных солей обнаружены водоросли в возрасте 350 млн. лет. Синезеленая водоросль *Nostoc commune* 107 лет сохраняла жизнеспособность в гербарии. Некоторые виды синезеленых водорослей *Cyanophyte* из степных областей под водой образуют студенистую массу, а на суше превращается в сухую черную корочку, которую «оживляют» дожди. Способностью к ангидробиозу обладают

некоторые зеленые водоросли, покрывающие зеленым налетом нижнюю часть елей, некоторые виды мхов, лишайники – ягель (олений мох) и парамелия высыхают так, что при растирании пальцами превращаются в пыль, но после увлажнения «оживают». Из высших растений способностью к ангидробии обладают бронец (*Selaschnella lepidophylla*) – представитель прерий Американского континента и геберлея (*Heberlea rhodopensis*) – реликт третичного периода, цветок, похожий на примулу. Первое сохраняло жизнеспособность в течение 11 лет в гербарии, второе в высушенном состоянии сохраняло жизнеспособность свыше 2 лет. Семена злаков сохраняют всхожесть на протяжении 50 лет, а семена сорняков – 100 лет.

Важным звеном в переходе к онтогенетическому анабиозу является образование оболочек у спор микроорганизмов, цист многоклеточных организмов, семян высших растений и зимних яиц. Достаточно высокая механическая прочность, плохая проницаемость и устойчивость оболочек к внешним воздействиям обусловлены их структурой и составом. Оболочки цист эмбрионов *Artemia salina* составляют около 20% массы цист, а оболочки зрелых цист амебы *Acanthamoeba* sp. – около 37%. Часто оболочки бывают многослойными. Споры бактерий содержат 2-3 внешних слоя и 2-3 внутренних, оболочка цист *Acanthamoeba* – двухслойная.

Переход от анабиоза к жизнедеятельности. При переходе от анабиоза к жизнедеятельности восстановление прежних размеров и формы организма сопровождается восстановлением структуры и содержимого клеток. Твердая структура цитоплазматического геля по мере увеличения содержания воды претерпевает характерные для набухающего геля изменения: увеличивается размер промежутков в остове геля, повышается количество свободной воды, усиливается связь между отдельными частями набухающей гелевой структуры. В зоне критической влажности наблюдается скачкообразное изменение ряда физических характеристик (электропроводности, диэлектрических свойств и др.). Для семян пшеницы критическая влажность составляет 14÷15%, для дрожжей – около 10%. При возвращении к жизнедеятельности неактивные ферменты переходят в активное состояние, вероятно, освобождаясь от ингибиторов. Происходят и другие изменения. Например, в покоящихся цистах эмбрионов артемий содержится большое количество глицерина (2÷6% сухой массы) и трегалозы. При выходе из анабиотического состояния количество глицерина сначала медленно уменьшается по мере формирования личинки (науптилуса), а при высвобождении науптилуса из цисты оно резко падает до очень низкого уровня. Подобная динамика характерна и для разнообразных ингибиторов.

Продолжительность возвращения высохших организмов к жизнедеятельности определяется, вероятно, особенностями их строения, развития и обмена веществ. Тихоходки начинают первые движения через 5 ÷ 20 мин после смачивания водой и полностью восстанавливают жизнедеятельность через 22 ÷ 35 мин. Полная насыщенность влагой высохших лишайников достигается через 30 ÷ 55 мин после погружения в

воду. К этому же времени возобновляется жизнедеятельность лишайников, в частности, фотосинтез. Личинки нематод из одногодичных пшеничных галл становились подвижными через $4 \div 6$ часов после помещения в воду. Цисты *Artemia salina* возобновляли обмен веществ менее чем через час после погружения в 0,5M NaCl, но потребовалось 24 часа для того, чтобы из 50% цист вылупились личинки. Для высушенных семян продолжительность перехода к активной жизнедеятельности (прорастание) иногда составляет десятки часов. Так, протоплазма семян гороха только через $8 \div 10$ часов пребывания семян в воде приобретает жидкие свойства, но полное разжижение происходит лишь при прорастании, которое может лимитироваться малой скоростью обменных процессов и наличием ингибиторов роста.

Холодовой анабиоз. В отличие от ангидробиоза, стратегия холодового анабиоза ориентирована не на удаление воды из организма, а на ее иммобилизацию в форме, например, кристаллов льда, концентрированных растворов и, возможно, устойчивых гелей.

К понижению скорости обменных процессов при холодовом анабиозе могут приводить повышение вязкости концентрируемых вымораживанием воды растворов, ингибиторы метаболизма и, наконец, понижение температуры как таковое. К примерам холодового анабиоза можно отнести вынужденный покой растений, зимовку диапаузирующих насекомых и животных арктической литорали, зимний покой семян, спор, цист и зимних яиц. Состояние анабиоза у насекомых и арктических животных, по – видимому, временами сменяется состоянием гипобиоза, которому присуще не прекращение, а замедление метаболических реакций. Например, яйца, личинки и куколки насекомых могут продолжать дыхание и при отрицательных температурах. Полное прекращение потребления кислорода у насекомых наступает лишь при температурах около минус 16°C .

20.4.2. Гипобиоз

Зимовка. Состояние гипобиоза характерно для многих пойкилотермных и гомойотермных организмов в зимний период. Так, садовые улитки *Helix pomatia* и *H. Lucorum* в долгий подготовительный период накапливают питательные вещества, в октябре выкапывают норки и закупоривают их, зимуют при $7-8^{\circ}\text{C}$ по апрель, при недостатке питательных веществ в организме или при похолодании опускаются ниже. Потеря веса улиток за время зимовки составляет до 20%. Пробуждаются улитки при $8 \div 10^{\circ}\text{C}$ после первых дождей и начала развития растительности. Водяные улитки (прудовики) зимуют, зарываясь в ил на дне водоемов. Самцы высших ракообразных (*Malacostraca*) – речной, болотный и озерный раки - зимуют группами в глубоких ямах на дне водоемов, самки с оплодотворенными яйцами (от 50 до 500 штук) - в норах (Рис.20.4).



Рис.20.4. Речной рак *Astacus astacus*. Распространён в пресных водоёмах на всей территории Европы. Зимует под водой в ямах и норах. К зиме перебирается поглубже, где вода не замерзает. Норы раки копают сами. В спячку раки не впадают, но становятся менее активными: примерно 20 часов в сутки они малоподвижны, но в течение нескольких часов могут передвигаться по дну и охотиться.

Насекомые (класс *Insecta*) впадают в *диапаузу*, зимуют в виде яиц, личинок, куколок и имаго (взрослых форм). Убежища насекомые находят под опавшей листвой, корой деревьев. Продолжительность диапаузы зависит от запасов жира в организме. У некоторых насекомых жир составляет 18% веса. Пчелы, запасы жира которых не превышают $1,5 \div 2\%$, в продолжительную диапаузу не впадают. Обменные процессы во время диапаузы замедляются, развитие практически прекращается. Скорость потребления кислорода у диапаузирующих насекомых снижена в $10 \div 15$ раз. В период подготовки к диапаузе в тканях насекомых накапливается глицерин, что, в частности, позволяет 50% гусениц лугового мотылька переносить замораживание до минус 79°C . Выход или, по крайней мере, скорость выхода из диапаузы зависит от продолжительности светового дня.

Земноводные летом накапливают питательные вещества. При температуре днем $8 \div 12^{\circ}\text{C}$, а ночью $3 \div 5^{\circ}\text{C}$ отправляются к местам зимовки, иногда за несколько километров. Потребление кислорода у земноводных в период зимовки снижено в $2 \div 3$ раза, но они могут медленно расти и развиваться. При групповой зимовке (группы до 20 и даже 100 особей) уровень обмена может быть на 40% ниже, чем при одиночной. Места залегания – подводные впадины и пустоты. Дыхание осуществляется через кожу, пульс замедленный, сон неглубокий.

Пресмыкающиеся зимуют под старыми пнями, в щелях в скалах и т.п. На севере зимовка может продолжаться до $7 \div 8$ месяцев, а южнее даже

зимой можно встретить пресмыкающихся, греющихся на солнце. Итак, общим для зимовки пойкилотермных животных является накопление в подготовительный период питательных веществ, а иногда антифризов. Сигналами к спячке являются понижение температуры и уменьшение продолжительности светового дня. Уровень обменных процессов в этот период снижен.

Большинство птиц избегает неблагоприятных условий путем перелетов, но еще в IV веке Аристотель писал о способности птиц впадать в «зимнюю спячку», а в 1735 г. Карл Линней отмечал, что «осенью, когда наступает похолодание, ласточки, не находя достаточно насекомых для пропитания, начинают искать убежище для зимовки». Некоторые исследователи считают, что торпидное состояние у птиц лучше характеризовать как гипотермию, а не как «зимнюю спячку».

Гибернация ряда млекопитающих (суслики, ежи, летучие мыши, сурки, хомяки) связана со сложными процессами метаболической перестройки в организме. Это происходит под влиянием как внешних (температура, продолжительность светового дня, наличие пищи), так и внутренних (терморегуляция, эндокринная и нервная деятельность) факторов. Физиологическая подготовка млекопитающих к зимней спячке заключается в накоплении жира (до 25% веса тела). Летучие мыши (Рис. 20.5) накапливают гликоген, а у хомяков накопленный жир составляет до



Рис. 20.5. Летучая мышь. *Мелкие гетеротермные млекопитающие, способные к гибернации. Во время зимней спячки температура их тела падает вплоть до 4-5°C.*

40% веса тела. Главным источником энергии у гибернирующих млекопитающих (особенно важным в период пробуждения) является бурая жировая ткань. Места залегания (убежища) – норы, чердаки, пещеры и берлоги. Температура тела гибернирующих животных понижается почти до уровня окружающей среды и часто изменяется с ее колебаниями, однако при

понижении температуры среды ниже $1-2^{\circ}\text{C}$ включается механизм регулирования температуры, и при дальнейшем похолодании температура тела животного остается постоянной. Сильное похолодание, требующее больших энергетических затрат, может привести к пробуждению или гибели животного. В период спячки уровень метаболизма снижается в $10\div 20$ раз. В гибернации задействованы почти все железы внутренней секреции.

Эстивация. Гипобиоз возможен не только при пониженных, но и при повышенных температурах внешней среды. Летнюю спячку называют эстивацией (от греч. *aestas*- лето). Некоторые насекомые впадают в тепловую диапаузу при высоких температурах, сочетающихся с пониженной влажностью.

Эстивация рыб связана с их способностью использовать для дыхания атмосферный воздух. Такой способностью обладают американский чешуйчатник и африканский протоптер (двоякодышащие рыбы), а в средней полосе - вьюн. Протоптер обитает в Центральной Африке в притоках Белого Нила, Конго и Замбези. Для дыхания, кроме жаберной системы, он использует парный плавательный пузырь, играющий роль легких (стенки пузыря пронизаны множеством капилляров). В длину протоптер достигает 2 м, на месте гибких плавников у него находятся твердые отростки, напоминающие ножки. При высыхании водоема протоптер закапывается в ил на глубину $0,5\div 1$ м и, сворачиваясь в клубок, формирует капсулу (кокон), склеивая стенки капсулы слизью, напротив рта оставляет узкий проход и переходит на легочное дыхание. Протоптер живет за счет предварительно накопленного жира, может находиться в состоянии эстивации $5 \div 6$ месяцев (с августа по декабрь). Местные жители добывают протоптеров лопатой, обнаруживая их по звуку дыхания. Перевезенный в коконе в Европу протоптер прожил в аквариуме несколько лет. Пробуждение протоптера от спячки - достаточно продолжительный процесс, быстрое пробуждение для него опасно. Американский чешуйчатник, как и протоптер, перед спячкой накапливает жир, а при высыхании водоема зарывается в ил и дышит атмосферным воздухом, но, если водоем не пересыхает, в спячку не впадает. Вьюн при пересыхании водоема зарывается в ил. Атмосферный воздух в период спячки проходит через насыщенный капиллярами кишечный тракт, где и осуществляется газообмен, и выходит через анальное отверстие. При этом потребление кислорода является незначительным, накопленный ранее жир расходует медленно.

Земноводные (лягушки, тритоны, саламандры) во время засухи зарываются в ямы в почве, прячутся под корни и камни. В этот период они не питаются, обмен веществ у них замедлен. Длительность летней спячки земноводных на Яве достигает $5 \div 6$ месяцев.

У пресмыкающихся, в частности, змей, обмен веществ в период засухи замедляется, а потребление кислорода минимально. Анаконды (до 11м

длинной) и крокодилы на период засухи зарываются в ил. В состояние эстивации впадают также среднеазиатские ящерицы и черепахи.

Характерно это состояние и для гомойотермных животных – туркестанского и североамериканского сусликов, сенегальского ежа и др. Например, обитающий в пустыне Мохаве (Калифорния) суслик в лабораторных условиях периодически (от нескольких часов до нескольких суток) впадает в спячку при комнатной температуре в период с августа по март, несмотря на обилие пищи. Дыхание и пульс во время спячки у него замедлены, температура тела чуть выше комнатной, источником жизни служит накопленный жир. Исследования, проведенные с мохавеским сусликом, показали, что у гибернации и эстивации гораздо больше общего, чем различий.

Оцепенение (торпидность). Гипотермия, в отличие от гибернации, не является наследственно закрепленной адаптацией, и для многих млекопитающих она может закончиться гибелью в результате неадекватной реакции организма на охлаждение. К гипотермии можно отнести состояние оцепенения у рыб, земноводных и пресмыкающихся, которые при глубоком охлаждении практически перестают дышать, двигаться и выглядят как неживые. Кратковременное оцепенение (торпидность) присуще и некоторым птицам. Например, птенцам черного стрижа и колибри, которых на некоторое время оставляют родители. Черные стрижи могут покидать птенцов на $7 \div 12$ дней. В торпидном состоянии температура тела птенцов черного стрижа снижается с 37 до 20°C, пульс и дыхание замедлены. В результате родителям приходится их отогревать теплом своего тела. Торпидное состояние (особенно в холодные ночи) характерно и для некоторых видов взрослых колибри. Это состояние сопровождается значительным уменьшением частоты сердечных сокращений (с 1000 сокр./мин до ~ 60 сокр./мин) и понижением температуры тела до 9°C. Восстановлению нормальной физиологической активности в этом случае способствует, вероятно, повышение температуры воздуха и нагрев организма извне.

Таким образом, многие живые организмы имеют достаточный потенциал для выживания при низких температурах. Так как они отличаются по филогенезу, размерам, уровню организации, по степени развития, функциональным особенностям и метаболизму, то пути и механизмы их адаптации могут быть совершенно разными. Можно выделить две стратегии адаптации живых тел, которые могут использоваться как по отдельности, так и одновременно. Это совокупность механизмов противодействия холоду и механизмов использования холода. В первом случае организмы стараются поддерживать температуру своего тела, во втором случае живые тела подчиняются, «сознательно» перестраивают метаболизм, понижают температуру тела и впадают в гипобиоз.

Подробнее о механизмах адаптации смотри следующую главу.

Рекомендуемая литература:

1. Озернюк Н.Д. Феноменология и механизмы адаптационных процессов. – М.: Изд-во МГУ, 2003. – 215 с.
2. Угаров Г.С. Теоретические основы гипобиологии.// Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10-6. – С. 1280-1283;
3. Слоним А. Д. Эволюция терморегуляции. Спб., 2005.
4. Лозина-Лозинский Л.К. Очерки по криобиологии/ Л.:Наука.-1972.- 287с.
5. Денков В. На грани жизни /М.:Знание.-1988.-192с.
6. Голдовский А.М. Анабиоз/ Л.:Наука.-1981.-136с.
7. Хаскин В.В. Энергетика теплообразования и адаптация к холоду/ Новосибирск-Наука.-1975.-198с.
8. Держинский Ф. Я., Васильев Б. Д., Малахов В. В. Зоология позвоночных. 2-е изд. — М.: Издат. центр «Академия», 2014. — 464 с.
9. Голдовский А.М. Анабиоз и его практическое значение. – Л.: Наука. 1975. – 342 с.
10. Тимофеев Н.Н. Искусственный гипобиоз. – М.: 1983, - 192 с.
11. Ушатинская Р.С. Скрытая жизнь и анабиоз. М.: Изд-во АН СССР. – 1990. – 180с.
12. Белоус А.М., Грищенко В. И. Криобиология. – К.: Наук. Думка, 1994, - 431 с.

Глава 21. Адаптация животных к низкой температуре. Стратегии и механизмы.

21.1. Понятие и определение. 21.2. Основные способы приспособления. 21.3. Особенности температурной адаптации пойкилотермных и гомойотермных животных. 21.3.1. Активная адаптация. Противодействие снижению температуры у теплокровных животных. 21.3.2. Пассивная адаптация. Подчинение и использование снижения температуры холоднокровными животными. 21.3.3. Пассивная адаптация гетеротермных млекопитающих. 21.4. Механизмы адаптации клеток. 21.4.1. Переключение генетических программ поддержания гомеостаза. Активации или подавления экспрессии генов. 21.4.2. Синтез новых структурных, функциональных белков и ферментов. 21.4.3. Изменение кинетических и регуляторных свойств ферментов. 21.4.4. Изменение свойств белков и ферментов за счет фосфорилирования-дефосфорилирования. 21.4.5. Изменение структурно-функциональных свойств мембран. 21.4.6. Синтез защитных белков. 21.5. Приспособления животных к температурам ниже нуля и замораживанию. 21.5.1. Причины гибели при замораживании. 21.5.2. Отогрев животных. 21.5.3. Животные, устойчивые к замораживанию. 21.6. Способы адаптации к отрицательным температурам. 21.6.1. Переохлаждение. 21.6.2. Обезвоживание. 21.6.3. Образование крио- и ксеропротекторов. 21.6.4. Причины устойчивости к замораживанию. 21.6.5. Механизмы криоустойчивости насекомых. 21.6.6. Особенности приспособления лягушек.

21.1. Понятие и определение

Термин адаптация может иметь два значения, одно обозначает устойчивое явление, а второе процесс.

А) Адаптация (приспособленность) к температуре — явление природной приспособленности живых организмов к обитанию в определённых температурных условиях среды обитания (см. главу 20). Приспособленность организмов к температуре определяется особенностями их строения, функций и метаболизма, *закрепленных генетически* и передающихся по наследству из поколения в поколение. Например, млекопитающие, обитающие в Арктике, имеют густой шерстяной покров, большие запасы жира и высокий уровень обмена веществ.

Б) Адаптация (процесс приспособления) к изменениям температуры — процесс приспособления, развивающийся во времени, это комплекс процедур и механизмов поведенческого, морфологического, физиологического, биохимического и генетического характера, которые обеспечивают организмам поддержание основных параметров гомеостаза и функционирования при изменении температурных условий в определённых промежутках времени. Гомеостаз — способность клеток и организмов противостоять изменениям и поддерживать целостность структурно-функциональной организации и постоянство внутренней среды.

В данной главе рассматриваются процессы адаптации животных к изменениям температуры.

21.2. Основные способы приспособления

К *поведенческим* способам адаптации относятся перемещение в более благоприятные места, например, избегать холода путем миграции.

К *морфологическим* адаптациям относятся приспособления, препятствующие действию низких температур, например, появление густой шерсти и подшерстка у млекопитающих в зимний период.

Физиологические адаптации направлены, например, на приспособление ряда функций животных к работе в условиях холода или даже гипотермии. Например, у зимоспящих млекопитающих во время спячки при 5°C снижается температура, частота сердечных сокращений, дыхания, тормозится работа печени, почек и других органов.

Биохимические способы адаптации определяются переключением некоторых метаболических путей или изменением активности ферментов.

Генетические адаптации связаны с активацией генов, обеспечивающих синтез специальных регуляторов, белков и ферментов, необходимых для обеспечения метаболизма и функций в иных температурных условиях.

21.3. Особенности температурной адаптации пойкилотермных и гомойотермных животных

Сезонная периодичность температурных факторов относится к числу наиболее общих явлений природы, что особенно выражено в умеренных и северных широтах. Ведущее значение для сезонной периодичности имеют годовые колебания температуры, что и определяет чередование стадий покоя и активности многих организмов. Способность адаптироваться к низким температурам характерна для многих видов животных, но особенно хорошо она выражена у организмов, не способных поддерживать температуру своего тела, т. е. у всех беспозвоночных животных и низших позвоночных (рыбы, амфибии, рептилии). Эти группы животных называются пойкилотермными, в отличие от гомойотермных, которые сохраняют температуру и активность в разные сезоны года (см. главу 19).

Пойкилотермные и гомойотермные животные имеют совершенно разные стратегии адаптации к снижению температуры. В частности, они могут использовать:

- а) стратегию противодействия холоду (активная адаптация);
- б) стратегию «подчинения и использования» холода (пассивная адаптация).

В первом случае теплокровные организмы всеми силами стараются поддержать температуру своего тела, уровень метаболизма и активность. Для этого они интенсивней питаются и тратят дополнительную энергию. А во втором случае холоднокровные организмы подчиняются процессу снижения

температуры тела, «сознательно» перестраивают метаболизм и функции, снижают активность и даже могут впадать в гипобиоз. Они используют естественный холод для снижения уровня метаболизма в десятки раз и поддержания его на предельно низком уровне без особых затрат. При этом животные используют минимум энергии, достаточной только для поддержания клеток в жизнеспособном состоянии. Однако они всегда сохраняют свойство к восстановлению активности после возвращения в нормальные температурные условия.

21.3.1. Активная адаптация. Противодействие снижению температуры у теплокровных животных

Млекопитающие и птицы, за редким исключением, способны поддерживать постоянную, относительно высокую, температуру тела на протяжении всей жизни, несмотря на время года и температурные условия обитания (см. главу 15). При снижении температуры окружающей среды ими используются следующие механизмы приспособления.

1. Поведенческие способы адаптации. Избегание холода путем поведения.

Первым ответом теплокровных животных на критическое понижение окружающей температуры является поведенческая реакция. Животные пытаются избежать прямого действия холода на организм. Например, перемещаются в более тёплые места обитания, строят и прячутся в гнёзда, норы, в дупла деревьев и т.д.

2. Биохимические способы адаптации.

Повышенный термогенез.

При понижении температуры внешней среды у теплокровных животных включаются физиологические и биохимические механизмы повышенного образования тепла. При этом происходят существенные изменения на уровне нейро-эндокринной регуляции. Синтезируется больше гормонов, оказывающих влияние на внутренний термогенез и разобщение процессов тканевого дыхания и образование АТФ. В этом случае большинство образуемой химической энергии рассеивается в виде тепла. Повышенный термогенез поддерживается также за счет высокой двигательной активности и дрожи.

3. Физиологические способы адаптации.

Эндокринная регуляция. Наиболее значимую роль в повышенной теплопродукции у млекопитающих играют гормоны щитовидной железы тироксин и трийодтиронин, действующие на митохондрии и разобщающие процесс тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования. В результате этого образуется меньше АТФ и большинство энергии пищи преобразуется в тепло. В экстремальных условиях у животных секретируется повышенное количество адреналина, что также способствует их высокой активности и усиленному термогенезу.

Повышенная активность. При пониженных температурах среды обитания у животных наблюдается повышенная двигательная активность. Это связано, в первую очередь, с постоянным поиском пищевых источников энергии.

Дрожь. В короткие периоды состояния покоя температура животных поддерживается с помощью дрожи. При дрожании происходит сокращение мышц без движения, в результате чего энергия просто рассеивается в виде тепла.

4. *Морфологические способы адаптации. Термоизоляция.*

С понижением температуры среды обитания у зимующих теплокровных животных образуются дополнительные средства изоляции. У птиц появляется толстый слой пуха и дополнительное перо, а у млекопитающих формируется плотный «тёплый» подшерсток и густая длинная шерсть. Формируется также подкожная жировая прослойка. Это позволяет, например, лисам и песцам выживать и вести активный образ жизни при арктических температурах минус 30 – 50°C.

5. *Генетическая адаптация.*

При подготовке животных к зимнему сезону у них активируются гены, обеспечивающие более высокий уровень метаболизма для выработки дополнительной теплопродукции. Эти гены контролируют образование различных пептидов и белков, регуляторов активности ферментов, проницаемости мембран, разобщения тканевого дыхания и образования АТФ и тепла. Кроме этого, в зимних условиях могут активироваться гены, обеспечивающие синтез изоформ ряда ферментов, более активных в условиях приспособления. Кроме этого, образуются ферменты, способствующие синтезу и запасанию в организме животных большого количества жира и гликогена.

21.3.2. Пассивная адаптация. Подчинение и использование

снижения температуры холоднокровными животными

Холоднокровные организмы – это живые тела с переменной температурой тела, которая может меняться в зависимости от температуры внешней среды. К таким объектам относится большинство биологического мира на нашей планете: все бактерии, простейшие, грибы, растения, а также беспозвоночные и низшие позвоночные животные (рыбы, земноводные и пресмыкающиеся). Эти организмы способны успешно существовать в довольно широком диапазоне температур (примерно от 30 до 5°C) без нарушения функциональности.

Основным фактором, вызывающим естественный гипобиоз у большинства живых организмов, является так называемое «функциональное обезвоживание», которое начинается с 4°C. При этой и более низких температурах до кристаллизации, вода, находящаяся в клетках и тканях живых организмов, становится «недоступной» для полноценных метаболических и обменных процессов. Причиной тому является увеличение

плотности воды и существенное снижение кинетической энергии молекул. В результате перехода фазовой структуры воды в жидкокристаллическое состояние или состояние «жидкого льда», а также более жесткого связывания молекул воды другими соединениями, в частности, белками, сахарами, глицерином и др. замедляется диффузия, осмос и проницаемость воды, а также ее растворяющая способность. Вследствие этого происходит нарушение водообмена между отдельными органеллами клеток, а также между клетками и тканями. Эти процессы обуславливают температурную «недоступность» имеющейся в организме воды, вследствие чего в нем наступает «функциональное обезвоживание» клеток и организма, что резко понижает уровень метаболизма и способствует наступлению гипобиоза.

Однако длительное снижение температуры окружающей среды до околонулевых температур становится опасным для нормальной жизнедеятельности. Тогда ими заблаговременно включаются и используются разнообразные механизмы приспособления для переживания неблагоприятного сезона.

А) Поведенческие способы адаптации. Избегание путем поведения.

Пойкилотермные животные постоянно используют поведенческие способы приспособления в активные сезоны жизни (весна, лето, осень) для поддержания температуры тела в пределах 10 – 25°C при суточных колебаниях температуры. Днем они могут подогреться на солнце, а ночью скрываться в укрытиях. В начале зимнего сезона они окончательно перемещаются в место зимовки. Там животные как можно лучше изолируют себя от внешней среды, снижают температуру тела вплоть до 0°C и впадают в состояние оцепенения. В таком состоянии гипотермии у них сохраняются функции всех органов и тканей, работающих на минимальном метаболическом уровне. Весной, при повышении температуры окружения до положительных температур, животные активируются, появляются во внешней среде и полностью восстанавливают свою функциональную активность.

Б) Перестройка функций и метаболизма. Физиологическая и биохимическая адаптация.

Многие пойкилотермные животные в зимний период года впадают в *оцепенение*, состояние гипотермии. Это состояние резко пониженной активности и жизнедеятельности, наступающее у животных как приспособление к переживанию неблагоприятных условий внешней среды: к недостатку тепла, воды и пищи. При этом у них резко снижается температура, уровень метаболизма и функций. Например, многие лягушки зимний период в течение 3-6 месяцев проводят в состоянии оцепенения, зарывшись в ил на дне речек и озер. Наиболее крупные лягушки, зимующие в водоемах Европы, относятся к виду *R. ridibunda* (лягушка озёрная). Ареал её распространения обширный - от Рейна и до Ирана. Тело самки достигает 17 см в длину, самцы на 5 см короче. В период оцепенения температура их тел соответствует окружающей среде, от 4 до 0°C. При этом у земноводных полностью отсутствует лёгочное дыхание. Слабое потребление кислорода

происходит с помощью кожи непосредственно из окружающей воды. Сердце сокращается всего лишь 3-5 раз в минуту, что достаточно для поддержания медленного кровотока и снабжения органов и тканей кислородом и питательными веществами. Печень, почки и другие органы и ткани работают на минимальном уровне активности, однако достаточной для выживания в экстремальных условиях.

В клетках также поддерживается определённый уровень метаболизма. В частности, продолжаются процессы биологического окисления, не прекращается образование АТФ, сохраняется синтез определенных, нужных в данной ситуации белков.

Кроме этого, некоторые виды лягушек способны образовывать криопротектор глицерин и накапливать его в органах и тканях, что предотвращает замерзание организма при падении температуры ниже нуля. В роли «антифриза» могут выступать углеводы в крови и мочевины. Роль мочевины в адаптации лягушек довольно высокая. Повышение ее содержания при температурах 6-9°C может выполнять роль «пускового механизма» для изменения метаболизма и перехода организма в состояние спячки. Почти все лягушки после состояния покоя сохраняют жизнеспособность и сразу же после пробуждения активно приступают к размножению.

Многие виды рыб, обитающих в районах со сменой климата, к началу зимнего сезона накапливают значительные количества жира. Эти вещества способствуют как термоизоляции, так и выступают в качестве криопротекторов, препятствуя кристаллизации воды в органах и тканях животных.

В) Морфологическая адаптация. Накопление запасных веществ.

Перед зимним периодом многие пойкилотермные животные запасают определенные вещества, способствующие выживанию. Например, различные виды лягушек могут запастись в печени и мышцах значительное количество гликогена, который постепенно используется для образования глюкозы и питания разнообразных клеток в течение длительного времени, пока животные ничем не питаются.

Г) Генетический контроль адаптации.

Перечисленные выше способы приспособления и выживания холонокровных животных находятся под генетическим контролем определенных групп генов. Приспособление, например, лягушек – это сложный процесс перестройки метаболизма всех клеток, тканей и органов целого организма. Обычно процесс начинается с включения генов образования молекул-регуляторов, например, регуляторных пептидов или мочевины. Они с кровью распространяются по организму, проникают во многие клетки, связываются с их геномом и «включают» соответствующую программу перестройки с целью приспособления к холоду и гипометаболизму. Перестройка обычно протекает в течение нескольких недель. Генетические модификации влияют и на активность, и на поведение

животных. Они накапливают питательные вещества, постепенно отказываются от пищи, ищут места для зимовки, ныряют и закапываются в ил на дне водоёма. С наступлением тепла в организме лягушек вновь включаются генетические перестройки. Прекращается синтез «регуляторов оцепенения», «отменяются» генетические программы гипометаболизма, вновь активируются генетические программы нормотермии, а при выходе на поверхность водоёма сразу же активируются программы размножения. То есть весь комплексный процесс приспособления у животных находится под постоянным генетическим контролем. Программа сезонных адаптивных перестроек зафиксирована в генах генома и передается по наследству из поколения в поколение.

21.3.3. Пассивная адаптация гетеротермных млекопитающих

Некоторые млекопитающие в процессе длительной эволюции приобрели способность использовать холод для переживания неблагоприятных условий зимой. Например, зимоспящие млекопитающие (например, суслики, сурки) в зимний период прячутся в глубокие норы, где температура не опускается ниже 0°C. В этих условиях температура их тела медленно опускается вплоть до нуля и они впадают в состояние оцепенения, в состояние зимней спячки. Теплопродукция прекращается, метаболизм подавляется, функции замедляются. В таком состоянии естественной гипотермии, не питаясь и без воды, животные находятся в течение нескольких месяцев. Только весной они пробуждаются, разогреваются до нормы и выходят на поверхность, где температура окружающей среды уже поддерживается выше нуля.

Эти теплокровные млекопитающие имеют свои особенности адаптации, что представлено в 22 главе.

21.4. Механизмы адаптации клеток

Приспособление животных к низким температурам обеспечивается адаптивными процессами, протекающими во всех клетках их организма. Клетки разных органов и тканей имеют свою специфику структуры и функций, поэтому реагируют в разной степени и в разных направлениях. Но принцип адаптации для всех является одинаковым. Он заключается в биохимической перестройке метаболизма, в соответствии с новыми температурными и функциональными потребностями. Стратегия биохимической адаптации клеток включает в себя несколько механизмов.

21.4.1. Переключение генетических программ поддержания гомеостаза. Активации или подавления экспрессии генов

Под действием физических (например, температура) или химических (например, регуляторные пептиды гипоталамуса) факторов происходит активация или подавление экспрессии определенных генов. Причем происходит дифференциальное подавление и дифференциальная экспрессия

генов в разных клетках. В частности, клетки печени, мышц или мозга реагируют по-разному в зависимости от структурно-функциональной целесообразности. Подавляются гены малофункциональных белков, а активируются гены белков, актуальных для нового температурного гомеостатического состояния органов или тканей. Следовательно, в каждой группе клеток происходит переключение генетических программ поддержания гомеостаза и функционального состояния. Причем в разных группах клеток это происходит специфически. То есть в целом происходит глобальная перестройка и тонкая индивидуальная настройка всех миллиардов клеток целого адаптирующегося к холоду организма.

21.4.2. Синтез новых структурных, функциональных белков и ферментов

На основе новых генетических программ осуществляется синтез определенного количества (несколько процентов) новых индуцибельных (адаптивных) белков. Они появляются на фоне синтеза основной массы конститутивных (основных) белков, которые составляют структурное большинство. Но адаптивные белки оказывают большое влияние на метаболизм клеток. Например, некоторые из них могут быть ключевыми ферментами, открывающими новые пути метаболизма. Другие могут изменять структуру, проницаемость и другие свойства плазматических мембран и органелл. Третьи, белки-переносчики, добавляют динамичность метаболитам и субстратам. Кроме этого могут синтезироваться изоферменты, это варианты основных ферментов, с несколько измененной структурой, поэтому обладающие новыми или дополнительными свойствами, нужными в новой температурной ситуации.

21.4.3. Изменение кинетических и регуляторных свойств ферментов

Некоторые ферменты изменяют свою активность и кинетические свойства под действием вновь синтезированных факторов пептидной или иной природы. Эти факторы связываются с регуляторными участками ферментов и модифицируют их свойства, более подходящие для данных температурных условий. Например, ферменты становятся более чувствительными к субстратам, менее зависимыми от температуры, работают в более широком диапазоне pH.

21.4.4. Изменение свойств белков и ферментов за счет фосфорилирования-дефосфорилирования

Известно, что многие белки и ферменты обретают новые структурно-функциональные свойства после присоединения фосфатной группы. Этот процесс является едва ли не самым главным в процессах регулирования активности ферментов и других макромолекул. Имеется большая группа специальных ферментов – переносчиков фосфатных групп (протеинкиназ). Они модифицируют разнообразные белки путем присоединения фосфатных

групп к некоторым аминокислотам этих протеинов. Известны множество разновидностей этих ферментов, например, цитоплазматические протеинкиназы, рецепторы с тирозинкиназной активностью, протеинкиназа А, протеинкиназа В, Ca^{2+} /кальмодулин — зависимые протеинкиназы и многие другие.

Фосфорилирование изменяет или модифицирует активность ферментов, положение белка в клетке или взаимодействие с другими белками. Протеинкиназы регулируют также метаболические пути и пути передачи сигналов внутри клетки. Треть всех белков в клетках животных могут быть модифицированы протеинкиназами. Они оказывают значительный эффект на жизнедеятельность клетки и их активность. Протеинкиназы регулируют клеточный цикл, рост и дифференцировку клеток, апоптоз. Установлено также, что в процессах адаптации клеток к экстремальным условиям, в том числе и пониженной температуре, протеинкиназы играют значительную роль.

21.4.5. Изменение структурно-функциональных свойств мембран

Мембраны являются очень важной частью клеток. Они изолируют и защищают клетку от внешней среды. Регулируют поступление и выход из клетки воды, ионов солей, питательных веществ, субстратов и метаболитов. Они образуют органеллы и обеспечивают их функции, преобразуют энергию и способствуют синтетическим процессам. Поэтому мембраны активно участвуют в процессах приспособления клеток. Основным механизмом приспособления является изменение липидного состава мембран. Например, у холоднокровных животных в зимний период оцепенения и гипобии в мембранах их клеток увеличивается доля ненасыщенных жирных кислот, что приводит к поддержанию низкой вязкости и достаточно большой подвижности молекул в этих структурах. Оттого многие мембранозависимые процессы при низких температурах сохраняют достаточную активность и поддерживают клетки в жизнеспособном состоянии. Кроме этого, может изменяться и белковый состав мембран, например, аквапоринов, которые регулируют перенос воды через мембрану в клетки и наружу. Модифицируется также и ферментативный состав мембран, и состав переносчиков субстратов и метаболитов, в соответствии с необходимой скоростью биохимических процессов при гипотермии.

21.4.6. Синтез защитных белков

У некоторых организмов в условиях низких температур синтезируются специализированные внутриклеточные белки, содержание которых возрастает при понижении температуры окружающей среды. Их называют «белки холодового шока». Они характерны для ряда бактерий, растений и холоднокровных животных. Наиболее известны белки трех «семейств»: а) белки холодового шока — CSP (от английского Cold Shock Proteins) бактерий и земноводных, б) РНК-связывающие белки — RBP (от английского RNA-

Binding Proteins -) цианобактерий, и в) так называемые «антифризные белки» рыб и насекомых.

Молекулярная масса белков из семейств CSP и RBP небольшая, примерно 7000-8000 Д. Они препятствуют агрегации молекул матричной РНК при низких температурах, облегчая тем самым процессы трансляции и синтеза белков.

Среди антифризных белков выделяют 4 вида, различающихся по молекулярной массе (от 3000 до 33 000Д) и особенностям первичной структуры. Эти белки препятствуют образованию кристаллов льда, предотвращая, таким образом, разрушение клеточных структур при промерзании тканей.

К числу белков холодового шока относятся также ферменты - десатуразы жирных кислот, которые обеспечивают образование двойных связей в жирных кислотах клеточных мембран, увеличивая их «текучесть» при низких температурах. Синтез большинства десатураз бактерий, растений и животных индуцируется низкими температурами на уровне транскрипции.

Таким образом, вышепредставленные механизмы адаптации клеток свидетельствуют, что клетки на основе генетических программ претерпевают глубокие перестройки и переходят в другое гомеостатическое состояние, необходимое для адекватного функционирования в условиях пониженных температур.

21.5. Приспособление животных к температурам ниже нуля и замораживанию

Большинство одноклеточных организмов, а также микроорганизмов довольно хорошо переносят переохладение и замораживание как в природных, так и в искусственных условиях. Однако крупные, сложные многоклеточные организмы (моллюски, рыбы, земноводные, пресмыкающиеся, птицы и млекопитающие) в большинстве случаев не в состоянии выдержать замораживание и возвратиться в нормотермию без повреждений.

21.5.1. Причины гибели при замораживании

Основными причинами гибели или серьёзных криоповреждений многоклеточных организмов являются:

- а) образование крупных кристаллов льда в тканевых и межклеточных жидкостях (кровь, лимфа, межклеточная жидкость, спинномозговая жидкость, глазные яблоки и др.);
- б) образование льда внутри клеток и их повреждение;
- в) разрушение мембран и внутриклеточных структур;
- г) повреждение нервных волокон, кровеносных и лимфатических сосудов;
- д) необратимое повреждение органов.

Перечисленные повреждения могут случаться даже несмотря на предварительную адаптацию животных к условиям гипотермии, так как пребывание в состоянии холодового оцепенения не предполагает снижение температуры тел ниже температур кристаллизации.

21.5.2. Отогрев животных

Криповреждения усиливаются при отогреве животных. В частности:

- а) изменяющиеся кристаллы льда при перекристаллизации разрушают клетки, что приводит к их гибели;
- б) нарушается осмотическое равновесие между кровью и тканями, что приводит к нарушению водного баланса и отекам;
- в) разрушаются капилляры и мелкие сосуды, что сопровождается внутренним кровотечением, нарушением давления и осмоса;
- г) разрушаются нервные волокна, что приводит к дискоординации функций внутренних органов и тканей.

21.5.3. Животные, устойчивые к замораживанию

Подавляющее большинство животных на нашей планете не способны пережить замораживание. Однако предствителям некоторых видов холоднокровных всё-таки удастся переносить процесс замораживания-отогрева в природных условиях. В частности, это удастся:

а) *многим наземным беспозвоночным*. В первую очередь насекомым, их личинкам и куколкам. Например, волосатые гусеницы бабочки *Gynaephora groenlandica*, которые проводят большую часть года в замороженном состоянии при минус 50 °С или даже еще более низкой температуре (Рис.21.1)



Рис. 21.1. Гусеница арктической бабочки *Gynaephora groenlandica*. Данный вид бабочки распространён за полярным кругом, в Гренландии и Канаде. Жизнь бабочки очень коротка – до 1 месяца, а цикл развития ее гусеницы может длиться до 14 лет. Они проводят около 90 % своей жизни в замёрзшем виде в диапаузе и лишь около 10 % жизни — питаются в тундре скудной растительностью в июне и

июле. При снижении температуры окружающей среды в конце арктического лета гусеницы синтезируют защищающие от замораживания химические вещества, глицерин и бетаин. Во время зимовок в стадии диапаузы они могут переживать температуру минус 60–70 °С.

б) многим морским литоральным ракообразным и моллюскам. В частности, усоногие раки (Рис. 21.2) и береговые улитки замерзают при отливе, когда температура воздуха ниже нуля, и вновь оживают после прилива.



Рис. 21.2. Усоногие рачки. Распространены усоногие раки в морях и океанах. Животные ведут сидячий образ жизни. Характерной особенностью усоногих раков является наличие известковой раковины. Усоногие ракообразные могут длительное время оставаться вне воды, плотно закрывая свою раковину. В таком состоянии они могут переносить замораживание во время отлива.

г) некоторым низшим позвоночным: некоторым видам лягушек, рептилий, тритонов (сибирский углозуб). Например, древесные лягушки (Рис.21.3) сохраняют способность оживать после замораживания. В замороженном состоянии у этих животных прекращаются движение, дыхание, биение сердца и кровообращение. Лед образуется во всех



Рис. 21.3. Древесная лягушка *Rana sylvatica*. Широко распространена в Канаде и США. Ее размеры варьируются от 5 до 7 см. Она проводит каждую зиму в замороженном состоянии. В течение 2-3 месяцев температура ее тела остается на уровне минус 6°C. Функции организма лягушки при этом отсутствуют: она не дышит, а ее сердце перестает биться.

60% воды организма и клеток становится льдом, остальное заполняет концентрированный раствор глюкозы, что позволяет клеткам сохранить свою структуру. Весной лягушки оттаивают, «включают» свое сердце, отогреваются, начинают двигаться и искать партнера для продолжения рода.

внечелочных жидкостях, заполняет брюшную полость и мочевой пузырь. Кристаллы льда растут также под кожей и в мышечной ткани. Но, несмотря на это, они остаются потенциально живыми и сохраняют способность вернуться к активной жизнедеятельности. Лесная лягушка и квакша также могут сутками и даже неделями переживать состояние, когда 65% всего объема жидкостей организма превращается в лед. Сибирские углозубы могут вмерзнуть в лёд и переносить замораживание до минус 35 °С.

21.6. Способы адаптации к отрицательным температурам

Устойчивые к холоду животные используют две стратегии адаптации. Во-первых, стратегия сопротивления замораживанию и сохранение активности в *переохлажденном* состоянии. Во-вторых, стратегия безопасного *неглубокого замерзания*, впадение в анабиоз с сохранением жизненного потенциала после отогрева. Обычно многие животные используют одновременно механизмы, способствующие и переохлаждению, и обеспечивающие безопасность неглубокого замерзания.

21.6.1. Переохлаждение

Многие животные, обитающие в условиях невысоких значений отрицательных температур, приспособились выживать путем образования антифризов и антифризных белков в клетках, тканях и органах. Эти вещества существенно понижают точку замерзания и препятствуют кристаллизации воды.

Глубина переохлаждения зависит от присутствия инициаторов кристаллизации. Это различные соединения, способные дать начало росту кристаллов, так как обладают свойством упорядочивать молекулы воды в кристаллическую структуру. Лучшими инициаторами процесса кристаллизации являются сами кристаллы льда, но кроме этого эффективными являются также некоторые белки, кристаллы солей и другие микрочастицы. Поэтому для сохранения жидкого состояния животным необходимо нейтрализовать центры кристаллизации. В частности, такая стратегия используется многими полярными морскими рыбами. Они избегают замораживания тканей даже при минус 5 – 7°С, потому что у них в жидкостях тела присутствуют особые разветвленные белки — гликопептиды, которые не дают воде кристаллизироваться. У многих наземных членистоногих, например, пауков, клещей, а также разнообразных насекомых, также обнаружены белки-антифризы. Благодаря этому не происходит образования льда даже при минус 15 °С.

Животные, устойчивые к замораживанию, наряду с антифризными белками синтезируют вещества, способствующие управляемой кристаллизации. Для этого у них во внечелочные жидкости секретируются специальные агенты, которые служат центрами кристаллизации льда. Такие вещества формируют участки связывания и упорядочивают молекул воды в псевдокристаллические структуры, не нарушающие биообъектов.

Биологическими агентами, обеспечивающими центры кристаллизации, у устойчивых к замораживанию животных являются чаще всего особые белки крови, которые синтезируются в организме в течение осени. Белки, служащие центрами кристаллизации, инициируют образование льда, обычно при температуре менее чем на 2°C ниже точки замерзания жидкостей тела. Благодаря этому замораживание происходит относительно медленно и контролируемо, так что клетки успевают подготовиться к переходу в замороженное состояние.

Таким образом, у устойчивых к замораживанию животных могут присутствовать как белки, служащие центрами кристаллизации льда, так и белки-антифризы. Благодаря этому белки этих двух типов контролируют структуру льда: белки-центры кристаллизации инициируют образование внеклеточного льда, а белки-антифризы стабилизируют кристаллы льда, так что их размеры остаются на безвредном для организма уровне.

21.6.2. Обезвоживание

Одним из механизмов переживания отрицательных температур в условиях неглубокого замораживания является частичное обезвоживание организмов перед зимним периодом, что уменьшает количество и размеры кристаллов льда. Такой механизм характерен для многих бактерий, микроорганизмов, водорослей и личинок насекомых, в организме которых вместо воды накапливается большое количество жира и углеводов.

Для большинства клеток обезвоживание — это патологический процесс, в первую очередь это гиперосмотический стресс. Сначала происходит обезвоживание околоклеточного пространства с возрастанием концентрации растворенных веществ и образованием гиперосмотической окружающей среды. Она вытягивает воду из клеток и постепенно обезвоживает их. Клетки уменьшаются в объеме, изменяют форму, а их плазматические мембраны сморщиваются. Постепенно возрастает внутриклеточная концентрация электролитов, которые разрушают ионные связи и снижают стабильность многих макромолекул и их комплексов. Однако в таком обезвоженном состоянии клетки становятся более устойчивыми к более сильному воздействию — замораживанию, так как в них образуется меньше кристаллов льда.

21.6.3. Образование крио- и ксеропротекторов

Замораживание большинства биологических объектов приводит к существенным повреждениям клеток и тканей, что обычно приводит к гибели организма. Чтобы защитить структуру клетки от криоповреждений, многие организмы продуцируют криопротекторы и ксеропротекторы — низкомолекулярные органические соединения, которые тем или иным путем предотвращают повреждения, являющиеся следствием действия низких температур. *Ксеропротекторы* — вещества, защищающие клетки и ткани от гиперосмотического стресса при обезвоживании, *криопротекторы* — вещества, понижающие точку замерзания тканей и защищающие клетки от

криопровреждений (табл. 21.1). Эти вещества стабилизируют белковые молекулы и биомембраны, замещая в них молекулы воды и облегчая тем самым, переход коллоидов в аморфное состояние. Наиболее распространенным протектором является дисахарид трегалоза, которая обладает высокой температурой «стеклования» и неспособностью вступать в реакцию с молекулами белков.

Таблица 21.1. Ксеропротекторы и криопротекторы микроорганизмов

Организмы	Криопротекторы и ксеропротекторы
Цианобактерии	Сахароза, трегалоза, глюкозилглицерин, глицин-бетаин
Фототрофные бактерии	Сахароза, трегалоза, глицинбетаин, эктоин, гидроксиэктоин, N-ацетилглутаминилглутамин-амид
Микроводоросли	Сахароза, глицерин, маннитол, пролин, глицинбетаин, диметилсульфониопропионат
Актиномицеты	Эктоин, гидроксиэктоин, трегалоза, пролин, глутамат, аланин
Дрожжи	Глицерин, арабиол, сорбитол, трегалоза

Благодаря представленным выше механизмам, практически все виды микроорганизмов могут благополучно пережить даже внезапное замораживание, когда вода быстро переходит в аморфное состояние, не успев кристаллизироваться. Замораживания же многоклеточного организма значительно сложнее. Важную роль в этом случае играют криопротекторы — вещества, придающие организму устойчивость к замерзанию. Большинство криопротекторов являются одновременно и ксеропротекторами, что указывает на процесс обезвоживания как один из способов приспособления к переохлаждению и замораживанию.

Во всех случаях естественного анабиоза организмов обнаруживается однородное явление: жидкая вода обязательно меняет свое состояние. Она может испариться, кристаллизироваться или перейти в аморфное состояние. Иммобилизация воды клеток и тканей может происходить также в виде концентрированных растворов и устойчивых гелей органических веществ. Это приводит к понижению точки замерзания воды на несколько градусов при повышении концентрации солей в некоторых тканях, что также способствует переохлаждению организма и снижает температуру замерзания воды. Таким образом, образование криопротекторов и локализация их во всех тканевых жидкостях изменяет свойства воды и существенно увеличивает шанс выживания при отрицательных температурах.

Криопротекторы осмотическим путем помогают ограничить как количество образующегося льда, так и степень потери внутриклеточной воды, и сокращение объема клеток. Чем выше концентрация таких веществ в организме, тем меньше льда может образоваться и тем ниже температура,

при которой произойдет замерзание общей воды организма. Поэтому у животных, устойчивых к замораживанию, в жидкостях организма обязательно создаются высокие концентрации нетоксичных растворимых криопротекторных веществ. Многие криопротекторы, взаимодействуя с фосфолипидами мембран, расширяют бислой и стабилизируют структуру мембран при резком сокращении объема клеток. К природным соединениям, обладающим такими функциями, относятся дисахарид трегалоза и аминокислота пролин. Поэтому у животных, устойчивых к замораживанию, например, личинки пестрокрылки, в организме накапливаются значительные количества этих двух веществ.

21.6.4. Причины устойчивости к замораживанию

А) Сохранение структуры. Важным условием для выживания организмов в условиях замораживания является сохранение структуры клеток. Обычно внутриклеточное содержимое ключевых органов не замерзает. Коллоидное содержимое цитоплазмы находится в переохлажденном состоянии. Полупроницаемая клеточная мембрана, отделяющая жидкое содержимое клетки от окружающей среды, обеспечивает свободное проникновение воды и некоторых растворенных в ней веществ, но ограничивает перемещение других соединений. Поэтому когда снаружи клеток образуется лед, немедленно изменяется баланс воды и растворенных веществ между клетками и средой. Наиболее серьезному повреждению при замораживании могут подвергаться клеточные мембраны. В результате выхода воды из клетки, обусловленного внеклеточным образованием льда, ее объем уменьшается и клеточная мембрана многократно изгибается и прогибается внутрь. Если объем клетки падает ниже некоторого критического минимума, структура мембраны, представляющая двойной слой фосфолипидов, не выдерживает напряжения и разрушается. Утратив целостность, мембрана некоторых клеток теряет способность выполнять свою защитную функцию, и через неё проникают кристаллы льда, а при отогреве в образовавшиеся разрывы вытекает содержимое клетки. У большинства устойчивых к замораживанию животных минимальный критический объем клеток достигается, когда в лед превращается 65% всей воды организма.

Б) Сохранение метаболизма и функций. При низкой температуре тела, какую имеют замороженные животные, уменьшается интенсивность клеточного метаболизма, но при этом клетки должны обладать способностью выживать этот период без кислорода, без поступающих с кровью питательных веществ, в присутствии токсичных конечных продуктов метаболизма, которые в обычных условиях уносятся кровью.

У животных, устойчивых к замораживанию, производство энергии должно продолжаться в отсутствие кислорода. Например, у замороженных личинок пестрокрылки золотарниковой содержание АТФ в переохлажденных клетках не изменяется в течение недели, а у замерзших лягушек энергетика внутренних органов снижается, но остается на предельном уровне, по

крайней мере, трое суток. При оттаивании энергетический баланс клеток быстро восстанавливается как у лягушек, так и у личинок пестрокрылки. Таким образом, животные, устойчивые к замораживанию, могут сохранять жизнеспособность в отсутствии кислорода продолжительное время. Они обладают механизмами, препятствующими образованию внутриклеточного льда, и производят минимально достаточное количество АТФ в переохлажденном состоянии путем утилизации гликогена или глюкозы. Поэтому все ключевые органы этих животных прекрасно выдерживают длительные периоды пониженного уровня энергетического обмена в периоды замерзания.

Сохранение жидкостности в состоянии переохлаждения и минимального уровня метаболизма клеток главных органов при замораживании крупного организма играет важную роль в сохранении их жизнеспособности и является основным фактором адаптивной стратегии, используемой многими организмами для выживания в экстремальных условиях внешней среды.

21.6.5. Механизмы криоустойчивости насекомых

Устойчивые к замораживанию насекомые используют полигидроксиспирты, которые служат для предотвращения полного замерзания жидкостей тела. Например, личинки пестрокрылки золотарниковой синтезируют большое количество углеводов. Запасенный гликоген, составляющий 8—12% общего веса тела личинок, полностью превращается в два полигидроксиспирта: глицерин и сорбит. Эти криопротекторы сохраняются в теле насекомого в течение зимы, а с наступлением весны снова превращаются в гликоген и глюкозу, которые служат источником энергии для дальнейшего метаморфоза — превращения в куколку и затем и во взрослую особь.

Глицерин, сорбит и родственные им соединения представляют собой превосходные природные криопротекторы. Они нетоксичны для клеток даже в высоких концентрациях, легко проникают в клетку, связывают воду, создают благоприятный осмотический эффект, необходимый для регуляции объема клеток. Полигидроксиспирты не способны к вымораживанию из водных растворов при низкой температуре. Они поддерживают жидкое содержимое клеток в переохлажденном состоянии, стабилизируют структуру ряда ферментов и других белков и защищают их от денатурирующего действия низких температур и замерзания.

21.6.5. Особенности приспособления лягушек

У земноводных, устойчивых к замерзанию, стратегия выживания такая же — сохранение коллоидного содержимого клеток в жидком переохлажденном состоянии. Но они используют несколько другую криопротекторную систему, отличающуюся от той, которая имеется у насекомых. Например, у лесной лягушки во всех органах во время охлаждения накапливаются значительные количества глюкозы.

Причем лягушки не накапливают криопротектор постепенно, в течение осенних месяцев, как это делают насекомые. Вместо этого их организм ожидает момента, когда начнется образование льда на поверхности кожи. Это инициирует гормональный ответ, который быстро активирует расщепление гликогена в печени, в результате чего в кровь в большом количестве поступает глюкоза.

Глюкоза обладает специфическими эффектами, выгодными для защиты органов позвоночных при замораживании. Например, полосы желудочков лягушачьего сердца восстанавливают сократительную активность после оттаивания, если они замораживались в присутствии высоких концентраций глюкозы, а такие же концентрации глицерина оказывались неэффективными. Это может быть связано с тем, что глюкоза может использоваться в качестве субстрата для производства энергии АТФ в клетках, которые при замораживании находятся в состоянии гипоксии.

Рекомендуемая литература:

1. Мельничук С.Д., Мельничук Д.О. Гіпобіоз тварин.- К.: НАУ. 2007. – 220 с.
2. Угаров Г.С. Теоретические основы гипобиологии.// Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10-6. – С. 1280-1283;
3. Слоним А. Д. Эволюция терморегуляции. Спб., 2005.
4. Лозина-Лозинский Л.К. Очерки по криобиологии/ Л.:Наука.-1972.- 287с.
5. Денков В. На грани жизни /М.:Знание.-1988.-192с.
6. Голдовский А.М. Анабиоз/ Л.:Наука.-1981.-136с.
7. Хаскин В.В. Энергетика теплообразования и адаптация к холоду/ Новосибирск-Наука.-1975.-198с.
8. Дзержинский Ф. Я., Васильев Б. Д., Малахов В. В. Зоология позвоночных. 2-е изд. — М.: Издат. центр «Академия», 2014. — 464 с.
9. Хочачка П. Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. Москва, Мир, 1977, 398 с.
- 10.Storey K.B. Life in the frozen state. // Am. J. Physiol. – 1990/ - Vol. 258, Pt. 2. P. R559-R668.

Глава 22. Естественная и искусственная гипотермия

22.1.Естественная гипотермия млекопитающих. 22.1.1.Патофизиологические изменения при глубокой естественной гипотермии. 22.1.2.Согревание и лечение. 22.2.Искусственная гипотермия млекопитающих. 22.2.1.Методы осуществления гипобииоза. 22.2.2.Патофизиология искусственного гипобииоза. 22.3.Искусственный гипобииоз гетеротермных животных.

Одной из актуальных проблем криобиологии и криомедицины является разработка методов искусственной гипотермии и гипобииоза человека. Успешное решение этой проблемы позволило бы решить многие проблемы отсроченной терапии и хирургии. Однако до сих пор не удается охладить человека без неблагоприятных последствий более чем на 3-5°C, причем даже на не очень длительное время. Хотя в природе существуют виды гетеротермных млекопитающих, способных переносить глубокое (вплоть до 0°C) и длительное (10-20 дней) охлаждение без негативных последствий. Это свидетельствует о принципиальной возможности переносить глубокую гипотермию теплокровными млекопитающими, видимо, и человеком. Но для этого следует всесторонне изучить причины устойчивости гетеротермных млекопитающих (см. главу 21) и выяснить причины гибели гомойотермных млекопитающих при гипотермии и глубоком искусственном охлаждении.

22.1. Естественная гипотермия млекопитающих

Естественная гипотермия — это состояние, при котором под воздействием природных внешних факторов температура тела животных снижается ниже 37° С. Естественная гипотермия у гомойотермных животных может быть более частой в холодных регионах, особенно в зимний или осенний период. Сильный мороз, холодный ветер, попадание в снег или холодную воду могут стать причинами быстрого снижения температуры тела животных. Маленькие животные имеют больший риск переохлаждения, чем крупные виды. Также в группе риска находятся новорожденные, худые, больные, голодные и старые животные. Половой предрасположенности к гипотермии нет.

По степени охлаждения животных ее подразделяют на три вида:

- А) Слабая степень гипотермии — температура тела 32-36 °С.
- Б) Средняя степень гипотермии — температура тела 28-32 °С.
- В) Тяжелая степень гипотермии — температура тела ниже 28 °С.

В нормальных условиях у млекопитающих тепло образуется как побочный продукт метаболических реакций, в основном в клетках печени и мышцах. Тепло с кровотоком распространяется по всему телу и при избытке может быть рассеяно с поверхности тела и дыхательного тракта. Постоянство температуры поддерживается за счет баланса теплопродукции и теплоотдачи, регулируемого терморегуляторным центром гипоталамуса. В ответ на охлаждение тела происходит активация нервной системы и

терморегуляторного центра, что вызывает дрожание, активацию клеточного метаболизма и повышенную продукцию тепла. Это может на какое-то время компенсировать тепловые потери. Но как только температура тела опустится ниже 31°C, животное становится уже неспособным к терморегуляции.

22.1.1. Патофизиологические изменения при глубокой естественной гипотермии

Если гомойотермные животные переохлаждаются в каких-либо естественных условиях, например, зимой, то спустя определенный промежуток времени могут наблюдаться следующие патофизиологические реакции.

А) Изменения сердечно-сосудистой системы: брадикардия, артериальная гипотензия, сердечные аритмии, снижение сердечного выброса и асистолия. Первоначально наблюдается тахикардия и гипертензия. Но по мере усиления гипотермии прогрессирует артериальная вазодилатация, что приводит к гипотонии и снижению сердечного выброса. По причине сниженной перфузии органов могут развиваться острая почечная недостаточность, панкреатит и эрозии слизистой ЖКТ. Может наблюдаться как гипогликемия, так и гипергликемия, а также гипо- и гиперкалиемия. Возможно возникновение нарушения свертываемости крови, такие как гипокоагуляция или тромбозы, а также лейкопении и тромбоцитопении. Резкое охлаждение стимулирует симпатическую нервную систему. Это приводит к тахикардии, увеличению сердечного выброса, спазму артериол и повышению периферического сопротивления сосудов. При температуре тела ниже 32°C нарушается проводимость миокарда, снижается ЧСС и сердечный выброс, часто возникает мерцательная брадиаритмия, а при температуре тела ниже 28°C - фибрилляция желудочков.

Б) Нарушение дыхания: вначале наблюдается учащение дыхания, затем снижение частоты и глубины дыхания, происходит травматизация легочных альвеол и, как следствие, гипоксия всех тканей организма. Снижается моторика реснитчатого эпителия, что создает благоприятные условия для развития отека легких, бронхопневмоний и острого респираторного синдрома. Охлаждение может вызвать бронхорею и бронхоспазм. По мере прогрессирования гипотермии тахипноэ сменяется гиповентиляцией. Утрата кашлевого и рвотного рефлексов при угнетении сознания может привести к аспирации и отеку легких. При низких температурах снабжение кислородом охлажденных тканей нарушено, но из-за снижения метаболизма потребности в кислороде несколько уменьшены. Угнетение дыхания при тяжелой гипотермии приводит к респираторному ацидозу.

В) Замедление метаболизма: изменяется активность ферментов, нарушаются метаболические пути, нарушаются процессы образования энергии АТФ и процессы синтеза макромолекул, что приводит к нарушению функций большинства тканей и органов. Нарушается процесс насыщения гемоглобина кислородом, развивается лактатный ацидоз. Кислотно-щелочные нарушения и электролитные нарушения зависят от длительности

охлаждения. Hochachka P.W. (1986) предложил гипотезу, согласно которой основой индуцируемого гипотермией патогенеза являются нарушения метаболизма в результате прямого действия температурного фактора. Главным звеном таких нарушений был назван активный транспорт ионов Ca^{2+} . Основным смысл выдвинутой концепции заключается в следующем. При понижении температуры обмен ионов между клеткой и окружающей средой замедляется (как и при аноксии), происходит накопление ионов Ca^{2+} в цитозоле. Следствием повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} является активация фосфолипаз (C, A1 и A2), нарушение мембранных структур. То есть гипотермия и аноксия убивают клетки гомойотермных организмов за счет первичного нарушения кальциевого обмена и активации ферментов, разрушающих клеточные структуры.

Г) Неврологические нарушения: при гипотермии уменьшается мозговой кровоток, снижается эффективность работы нейронов, замедляется проведение нервных импульсов. Неврологические нарушения при гипотермии включают дизартрию, атаксию, амнезию, галлюцинации и замедление зрачковых и сухожильных рефлексов. При тяжелой степени гипотермии на ЭЭГ иногда отсутствует электрическая активность, но это состояние еще не означает смерть мозга и может быть обратимым. Также наблюдается кислородное голодание клеток мозга, гиповолемия, вазоконстрикция периферических сосудов мозга. Следствием этих процессов может быть нарушения в работе нервной системы, вплоть до комы.

Эндокринная система: при охлаждении животных увеличивается секреция кортиколиберина и тиреолиберина. Это приводит к увеличению секреции АКТГ и ТТГ. Увеличивается уровень кортизола и катехоламинов в сыворотке. Перемещение крови в центральные сосуды уменьшает выброс антидиуретического гормона вазопрессина, при этом увеличивается диурез. Концентрация тиреоидных гормонов в сыворотке возрастает незначительно; в отсутствии заболеваний щитовидной железы концентрация свободного Т4 остается нормальной. Умеренная и тяжелая гипотермия вызывает инсулинорезистентность и гипергликемию. При тяжелой гипотермии со временем снижается секреция и эффективность действия АКТГ и стероидных гормонов.

Таким образом, при неконтролируемой гипотермии, развивающейся по естественным причинам, происходит целый комплекс изменений и нарушений, связанных как с прямым действием холода, так и с компенсаторными реакциями со стороны нейроэндокринной системы и всего организма. При неглубоком и недлительном охлаждении организм компенсирует незначительные нарушения и восстанавливает температурный гомеостаз. При длительном действии низких температур развивается более значительная гипотермия, после которой возможны патологические последствия или даже смерть. В таких случаях применяют специальные методы восстановления температуры и последующего лечения.

22.1.2. Согревание и лечение

Согревание переохлажденных животных может быть активным или пассивным, внутренним или внешним. Самый простой и безопасный метод для лечения большинства животных с легкой гипотермией: *пассивное внешнее согревание* (теплые одеяла и теплое помещение). При этом гипотермия устраняется за счет собственных механизмов теплопродукции. Температура тела может повышаться на 0,5-2,0°C в час. Очень важно держать накрытой голову животного, поскольку через нее происходит до 30% теплоотдачи.

Активное внешнее согревание животных состоит в применении внешних источников тепла (одеяла с электроподогревом, рефлекторы, теплые ванны). Согревать следует только грудную клетку, в противном случае возможны осложнения, так как расширение сосудов при воздействии тепла на кожу устраняет важный механизм поддержания АД при гиповолемии и может вызвать шок. Кроме этого, при расширении периферических сосудов холодная кровь поступает из них в центральный кровоток и еще больше снижает температуру ядра.

Внутреннее согревание животных можно осуществлять несколькими методами. Самый простой - это вдыхание увлажненного кислорода, нагретого до 42°C, через маску или эндотрахеальную трубку. При этом температура повышается на 1-2°C в час. Самый эффективный метод - это экстракорпоральное согревание крови при гемодиализе или искусственном кровообращении. Температура тела при этом повышается на 1-2°C каждые 3-5 мин. Его применяют только в самых тяжелых случаях гипотермии (например, при остановке кровообращения. При гиповолемии вводят теплые изотонические растворы, например, физиологический раствор или 0,45% NaCl с 5% глюкозы. Лекарственные средства следует применять с осторожностью, так как при низких температурах изменяется их действие и замедляется выведение.

При согревании животных снижается уровень глюкозы в крови. Инсулин теряет активность при температуре ниже 32°C, и его избыток при согревании может вызвать гипогликемию. Кроме того, при длительной дрожи истощаются запасы гликогена в мышцах, что также способствует гипогликемии. Следовательно, инсулин можно применять только если гипергликемия сохраняется после согревания.

Во время согревания млекопитающих необходимо постоянно следить за уровнем калия. Гипокалиемия обычно устраняется сама по мере выхода калия из клеток, а гиперкалиемия может свидетельствовать о массивном некрозе тканей, иногда - с почечной недостаточностью.

При согревании часто возникают предсердные и желудочковые аритмии, которые обычно проходят после нормализации температуры. Антиаритмические и вазопрессорные препараты можно применять только после нормализации температуры тела.

22.2. Искусственная гипотермия млекопитающих. Искусственный гипобиоз

Состояние искусственного контролируемого гипобиоза может препятствовать развитию патологий, что имеет большое значение для лечения многих болезней. Однако достигнуть глубокой долгосрочной гипотермии человека и животных пока не удастся. Поэтому для того чтобы разработать методы искусственной глубокой гипотермии и гипобиоза гомойотермных животных и человека, а также понять причины гибели при переохлаждении, проводят эксперименты с различными лабораторными животными: крысами, сусликами, кроликами и собаками. На рис. 22.1. представлена блок-схема установки для искусственного программного охлаждения лабораторных животных. *Искусственный гипобиоз* — это глубокое и длительное принудительное охлаждение, при котором происходит снижение интенсивности процессов жизнедеятельности у животных. В состоянии гипобиоза резко снижается потребление кислорода, существенно тормозится метаболизм, ограничивается функция многих органов, снижается обмен веществ. В таком состоянии животные могут длительное время обходиться без движения, питания и потребления воды.

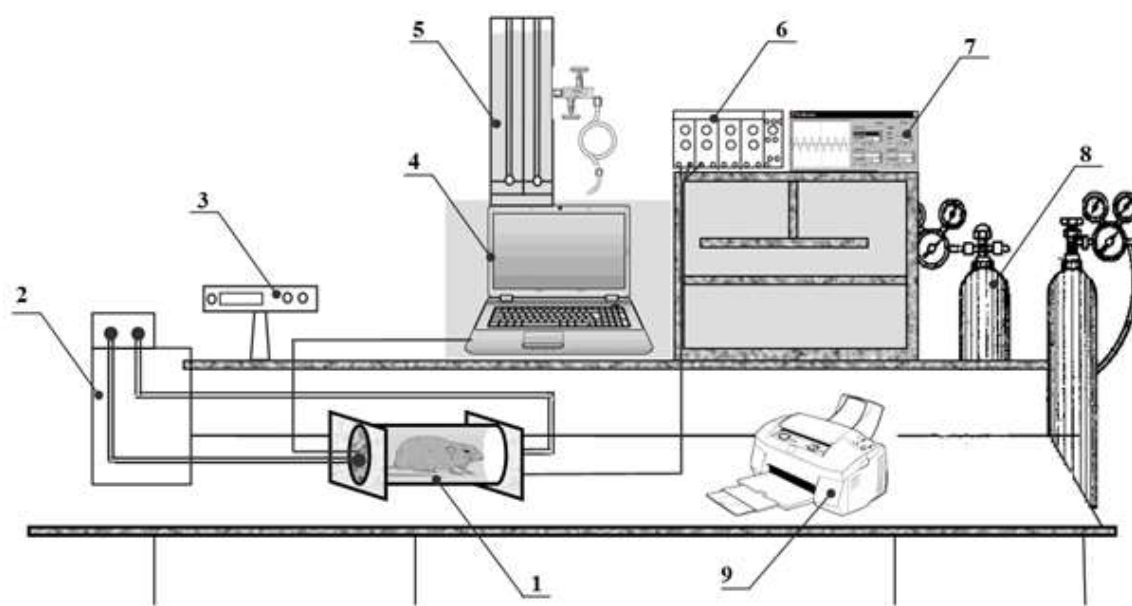


Рис. 22.1. Схема компьютеризированной установки для программного охлаждения и разогрева лабораторных животных. 1 – холодная камера с водяной рубашкой для животных, 2 – охлаждающий термостат, 3 – дисплей температуры, 4 – компьютер, 5 – система контроля газового потока, 6 – блок управления, 7 – осциллограф, 8 – баллоны с дыхательной смесью, 9 – принтер.

Особенность терморегуляции у разных гомойотермных животных связана с температурным порогом охлаждения гипоталамуса. При снижении температуры мозга ниже этого порога автоматически усиливается обмен веществ, и температура тела повышается. Только зимоспящим

гетеротермным животным удастся погрузиться в глубокий гипобиоз, так как они способны понижать температурный порог гипоталамуса, и лишь затем у них снижается температура тела вплоть до 0°C. Таким образом, одной из труднопреодолимых причин сложности достижения искусственного гипобиоза при глубоком охлаждении гомойотермных животных является их свойство активно сопротивляться понижению температуры тела. В охлаждаемом организме моментально включаются стрессорные механизмы нейроэндокринной системы, которые пытаются поддержать температурный гомеостаз. Понизить температуру в таких условиях удастся только на несколько градусов, после чего истощенные животные впадают в кому, а затем погибают. Поэтому принудительную глубокую гипотермию млекопитающих обычно проводят после подавления терморегуляции путем введения специальных препаратов. В этих условиях возможно понижение температур тела гомойотермных животных (например, лабораторных крыс) вплоть до 19°C.

Осуществление гипобиоза связано с обязательной блокадой химической терморегуляции, которая складывается из механизмов сократительного и несократительного термогенеза (см. главу 33). Пусковым звеном в реализации сократительного термогенеза (дрожь) являются гипоталамические центры терморегуляции. Аксоны этих центров образуют на уровне симпатических ганглиев преганглионарные холинергические синапсы, а сами нейроны ганглиев через симпатические нервы реализуют свое влияние через медиатор – норадреналин. Норадреналин изменяет проницаемость концевой пластинки двигательного нерва, содержащего ацетилхолин, выброс которого и обеспечивает реакцию дрожи во всей мышечной системе организма, а также поддерживает состояние теплорегуляции. При опустошении депо норадреналина сократительный термогенез прекращается.

Процессы несократительного термогенеза связывают с разобщением окисления и фосфорилирования под действием гормонов (тироксина, катехоламинов) и повышенной продукцией тепла.

22.2.1. Методы осуществления гипобиоза

В настоящее время разработано несколько методов получения искусственного гипобиоза, основанных на перестройке нейро-гормонально-медиаторной активности регуляторных систем организма, принудительного охлаждения и поддержании температурного гомеостаза на максимально сниженном уровне при умеренном угнетении ЦНС. Принудительное охлаждение осуществляют путем помещения животных в специальные охлаждаемые камеры.

Оксикапнический метод. Осуществление гипобиоза с помощью гипоксических и гиперкапнических (повышенное содержание CO₂) газовых сред. Механизм действия основан на снижении уровня оксигенации крови (до 50%) и повышении в ней содержания углекислоты, что приводит к уменьшению потребления O₂, стабилизации теплообменного гомеостаза,

снижению уровня метаболизма и более экономному потреблению энергии. В результате в газовой среде с 3-5% CO₂ у некоторых животных (кроликов, крыс) температура тела может снижаться до 20 -25⁰С, а у кошек и собак температура может понижаться до 25-26⁰С. У животных с недостаточно совершенной терморегуляцией, например, крыс, в условиях гипоксической среды довольно быстро достигается блокада гипоталамического центра терморегуляции, снижение термогенеза и погружение в гипобиоз. Для других животных, например, кроликов, гипобиоз осуществлять сложнее, желательно в гипокси-гиперкапнической среде.

Применение анестетиков. Наркоз – это состояние временного торможения ЦНС, вызываемое фармакологическими средствами. Для наркоза используются газовые смеси на основе галотана или закиси азота, эфир для наркоза, а также производные барбитуровой кислоты, натрия оксибутират (ГОМК), кетамин и др. Их применение обеспечивает следующие эффекты: отключение сознания, медикаментозный сон, обезболивание, отключение центра терморегуляции, миорелаксацию. Но при этом сохраняется адекватное дыхание, сердцебиение, кровообращение и функционирование других органов. Наркоз подавляет физиологические механизмы защиты от переохлаждения, и в условиях пониженных температур внешней среды животные постепенно впадают в гипобиоз.

Моноаминовый метод. Осуществляется в результате замедления выхода катехоламинов из депонированного состояния с помощью лекарственных средств, понижающих основной обмен: веществ фенотиазинового ряда, радиопротекторов, ганглиоблокаторов. Для создания искусственного гипобиоза предложены способы выключения химического термогенеза путем инактивации адренергических влияний на нейрональном уровне. Для этого блокируют синтез норадреналина с помощью α-метилпаратирозина, препятствуют высвобождению норадреналина путем введения орнида, опустошают депо норадреналина с помощью резерпина, а также используют комбинации этих средств. Введение серотонина оказывает дополнительное влияние указанных веществ на блокаду термогенеза и существенно тормозит метаболизм на 30-50%. Для снижения обмена веществ используют также адреноблокаторы (тропафен), нейролептики (дроперидол) и разные комбинации синергетиков: антигистаминных, анальгетиков, транквилизаторов и др. В состоянии сниженного обмена у гомойотермных животных возникает состояние неспецифической резистентности организма к воздействиям различной природы. Эта модель гипобиоза позволяет получить пониженный температурный гомеостаз у некоторых видов гомойотермных животных без существенного нарушения работы ЦНС и физиологических функций в течение нескольких суток.

Достаточно перспективными для достижения гипобиоза являются комбинированные методы, которые заключаются в сочетании нескольких методических подходов с помощью комбинированного воздействия фармакологических средств, газовых сред с повышенным

содержанием CO_2 , голода и снижения температуры тела. Но в общем следует отметить, что у многих видов животных гипобиоз достигается с трудом и на ограниченное время. В состоянии искусственного гипобиоза животные не могут находиться длительное время, так как при этом нарушаются многие функциональные и гомеостатические показатели организма.

22.2.2. Патопфизиология искусственного гипобиоза

При искусственном гипобиозе патологические изменения организма соответствуют всем нарушениям, как и при естественной глубокой гипотермии, но в большей степени. Состояние искусственного гипобиоза отличается от любой разновидности гипотермии, в первую очередь, более существенным снижением уровня потребления кислорода и оксигенации тканей: при гипобиозе потребление кислорода в два раза ниже, чем при равной по глубине гипотермии, а потребление кислорода в состоянии глубокого гипобиоза составляет лишь 10-15% от нормы.

Динамическое равновесие биохимических реакций нарушается вследствие того, что степень снижения активности различных ферментов при понижении температуры не одинакова. При понижении температуры клеток происходит внезапное нарушение функций, метаболизма и обмена веществ, получившее название температурного шока. Нарушается или останавливается выработка энергии, транспорт веществ и синтез необходимых макромолекул.

Искусственный гипобиоз характеризуется также более значительными функциональными изменениями: снижением активности сердца, подавлением нервной системы, уменьшением давления и понижением показателей дыхания.

Стабилизированное состояние искусственного гипобиоза (по сравнению с состоянием гипотермии) характеризуется снижением количества гормонов в крови, изменением содержания глюкозы, значительно более низким метаболизмом и обменом веществ.

Лимитирующими факторами длительности и глубины гипобиоза являются: а) ухудшение перфузии органов и тканей; б) снижение оксигенации и трофики клеток; в) нарушение оксидативного энергетического метаболизма; г) повышение уровня лактата и CO_2 в тканях и крови, метаболический ацидоз; д) лактат не утилизируется холодными печенью, мышцами и сердцем; е) снижается скорость утилизации гликогена и глюкозы; ж) запасы жира не утилизируются; з) в клетках и тканях накапливаются метаболиты, препятствующие нормальному функционированию; и) клетки, ткани и органы находятся в состоянии дефицита энергии; к) энергетический дефицит приводит ко всякого рода нарушениям; л) нарушается функционирование мембран, ферментов, рибосом, рецепторов и транспортеров.

22.3. Искусственный гипобиоз гетеротермных животных

Зимоспящие млекопитающие, например, суслики, сурки, ежи способны самостоятельно понижать температуру тела во время спячки вплоть до 0°C (см. главу 19). В таком состоянии естественного гипобиоза они могут находиться в течение довольно длительного времени, после чего самостоятельно разогреваются и возвращаются в нормотермическое состояние без всяких патологий. Этот факт свидетельствует всё же о принципиальной возможности млекопитающих выдерживать глубокое охлаждение и гипобиоз.

Действительно, «зимних» сусликов довольно легко погрузить в искусственную гипотермию и гипобиоз в лабораторных условиях. Достаточно провести анестезию и поместить животное в холодовую камеру с температурой 4°C. Спустя примерно час, температура тела сусликов понижается до 4-5°C. В таком состоянии они могут находиться в течение нескольких суток, после чего их возможно разогреть и вернуть в нормальное состояние.

Причем гетеротермные животные обладают высокой устойчивостью к глубокому охлаждению не только зимой. Например, сусликов без затруднений можно ввести в искусственный гипобиоз и в весенне-летний период, когда животные ведут активный образ жизни: постоянно двигаются, размножаются, выращивают потомство, роют норы и активно питаются. Устойчивость к глубокому искусственному охлаждению проявляют и молодые, и старые, и большие, и маленькие животные, независимо от их пола. Это свидетельствует, что гетеротермные зимоспящие животные имеют некую генетически обусловленную природную способность к быстрой автоматической перестройке метаболизма и функций. Они, как и пойкилотермные животные, могут поддерживать свои основные жизненные функции в широком диапазоне температур. Природа такой устойчивости гетеротермных животных пока еще не известна.

Рекомендуемая литература:

1. Тимофеев Н.Н. Искусственный гипобиоз. – М.: 1983, - 192 с.
2. Угаров Г.С. Теоретические основы гипобиологии.// Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10-6. – С. 1280-1283;
3. Слоним А. Д. Эволюция терморегуляции. Спб., 2005.
4. Лозина-Лозинский Л.К. Очерки по криобиологии/ Л.:Наука.-1972.-287с.
5. Мельничук С.Д., Мельничук Д.О. Гипобиоз тварин.- К.: НАУ. 2007. – 220 с.
6. Денков В. На грани жизни /М.:Знание.-1988.-192с.
7. Голдовский А.М. Анабиоз/ Л.:Наука.-1981.-136с.
8. Хаскин В.В. Энергетика теплообразования и адаптация к холоду/ Новосибирск-Наука.-1975.-198с.

9. Держинский Ф. Я., Васильев Б. Д., Малахов В. В. Зоология позвоночных. 2-е изд. — М.: Издат. центр «Академия», 2014. — 464 с.
10. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. Москва, Мир, 1977, 398 с.
11. Storey K.B. Life in the frozen state. // Am. J. Physiol. – 1990/ - Vol. 258, Pt. 2. P. R559-R668.
12. Лютинский С.И. Патологическая физиология животных / Изд. 2-е., испр. и доп. - М.: Колос, 2005. - 496с

Глава 23. Гипометаболические состояния и скрытая жизнь

23.1. Биоз. 23.2. Гипобиоз. 23.3. Анабиоз. 23.4. Скрытая жизнь

В соответствии с эволюцией Солнечной системы менялись геофизические параметры Земли, и в разных местах нашей планеты сложились очень разные условия внешней среды. В первую очередь, они значительно различаются по температуре и наличию воды.

Жизнь возникла в воде в процессе длительной эволюции органических молекул, их объединения и взаимодействия в *жидкой среде*. Практически все живые организмы содержат в среднем 70 процентов воды. Температурные условия среды должны поддерживать воду жидкой для оптимальных скоростей движения и взаимодействия молекул. Поэтому температурный диапазон активной жизни составляет, от 0 до 90⁰ С. Более высокие температуры необратимо разрушают молекулы жизни - ДНК и белки.

Согласно представлениям физики, с понижением температуры скорость движения и взаимодействия молекул уменьшается. Соответственно, в живых системах при этом снижается интенсивность метаболизма, что проявляется в торможении всех функций вплоть до полной остановки жизненных процессов. Существенное торможение метаболизма и остановка жизни может также наблюдаться и в условиях обезвоживания организмов, так как при отсутствии воды невозможно достаточно активное движение молекул и протекание биохимических процессов. Таким образом, в зависимости от температуры и обводненности жизненные процессы могут протекать с различными скоростями, сильно тормозиться и даже обратимо останавливаться.

В результате миллиардов лет эволюции, в соответствующих условиях внешней среды, жизнь на Земле, в зависимости от степени проявления, может находиться в нескольких разных состояниях.

1.1. Биоз

Биоз – активная жизнедеятельность, проявляющая все свойства и характеристики живого: питание, дыхание, выделение, движение, размножение и др. Это состояние жизни характерно для большинства организмов, живущих в нормальных экологических условиях при температуре тела 5 – 40⁰С. Генетические программы, записанные в молекулах ДНК, активно реализуются, обеспечивая все процессы. Полноценно осуществляется метаболизм, исполняются все функции. Это характерно как для гомойотермных, так и для пойкилотермных организмов. Подавляющая часть живых организмов на планете постоянно находится в этом состоянии. Только при неблагоприятных обстоятельствах организмы могут временно переходить в состояние пониженной активности.

1.2. Гипобиоз

Гипобиоз – подавленная жизнедеятельность. Нижняя граница температуры организмов (0°C) ограничивается жидкой водной внутренней средой, обеспечивающей реакции метаболизма и потоки метаболитов. При приближении к этой границе организмы могут переходить в состояние гипобиоза, которое характеризуется резким угнетением движения, питания, дыхания, выделения и других признаков жизни. Примерами гипобиоза являются: холодовое оцепенение многих земноводных и рептилий, зимняя спячка (гибернация) у грызунов, насекомых, рукокрылых и некоторых других млекопитающих. В этом состоянии температура тела может понижаться вплоть до 0°C на довольно длительное время. При этом у подобных животных включаются другие программы реализации генетической информации, работают другие системы генов того же генома. Они переводят метаболизм животных на другой уровень и обеспечивают процессы их приспособления и существования в других условиях. После восстановления нормального температурного режима животные активизируются и вновь возвращаются к стандартным генетическим программам жизнеобеспечения - возвращаются в состояние *биоза*.

Разновидностью гипобиоза является *криптобиоз*. Это состояние глубокого физиологического покоя, в основе которого лежат приспособления, способствующие переживанию неблагоприятных факторов среды. В состоянии криптобиоза практически не проявляются никакие признаки жизни, однако сохраняется невысокий уровень метаболических процессов. Активная жизнь многих организмов чередуется с состоянием покоя. К криптобиозу относятся такие формы жизни, как споры и цисты микроорганизмов, водорослей, грибов, семена и выводковые почки растений, гаметы животных, диапауза членистоногих и др. В этом состоянии *генетический материал как бы законсервирован* - с молекул ДНК практически не считывается никакая информация. Но в таком состоянии молекулы ДНК и многие белки могут сохраняться очень длительное время. Благодаря этому явлению жизнь на Земле сохраняется, развивается и даже распространяется, несмотря на наличие неблагоприятных факторов среды. Состоянию покоя обычно предшествует подготовка - запасание питательных веществ, дегидратация клеток и тканей, снижение уровня метаболизма, что обеспечивается специальными генетическими программами. Состояние зимнего покоя у растений является также разновидностью гипобиоза.

Еще одной разновидностью гипобиоза является *ангидробиоз* – способность выдерживать глубокое и длительное обезвоживание с сохранением способности неоднократно восстанавливать активную жизнедеятельность при обводнении. Это явление характерно для некоторых микроорганизмов, растений, беспозвоночных. В отличие от криптобиоза, ангидробиоз наступает без предварительной подготовки при быстром обезвоживании, и столь же быстро восстанавливается жизнедеятельность после гидратации. Содержание воды у ангидробионтов может падать до 1-3

процентов, что недостаточно для протекания биохимических процессов. В этих условиях генетические программы также не реализуются. Жизненные процессы у таких организмов полностью останавливаются на длительное время, но могут быстро восстановиться при обводнении. В соляных отложениях древних морей и озер, возраст которых может быть до 260 млн. лет, обнаружены виды бактерий, обезвоженные представители которых могут оживать в благоприятных условиях. Условием восстановления жизненных процессов является сохранение неповрежденной структуры белков и молекул ДНК.

1.3. Анабиоз

Анабиоз – временная обратимая остановка жизни такими факторами среды, как глубокое замораживание, глубокое обезвоживание или их сочетание. Это явление характерно для некоторых микроорганизмов, растений и простых животных (например, у коловраток, усоногих ракообразных, тихоходок). Известны также некоторые виды амфибий и пресмыкающихся, представители которых могут переносить глубокое замораживание в зимнее время года в течение нескольких месяцев («умирать», а затем снова оживать). Из льдов Антарктиды, с глубины несколько тысяч метров извлечены и оживлены в лаборатории бактерии, существовавшие в состоянии анабиоза десятки тысяч лет.

В лабораторных условиях ученые могут замораживать в жидком азоте (минус 196⁰ С) семена и споры растений, различные микроорганизмы и бактерии, сперматозоиды, эмбрионы различных животных на ранних стадиях развития, эритроциты, клетки костного мозга и др. В замороженном состоянии эти объекты *не проявляют никаких признаков жизни* и могут находиться так годами. Молекулы ДНК и белки находятся в криоконсервированном состоянии. Метаболизм и реализация генетической информации абсолютно отсутствуют. Но после размораживания у них могут полностью восстанавливаться все процессы жизнедеятельности. Некоторые микроорганизмы можно высушивать в замороженном состоянии и затем хранить при комнатной температуре в течение длительного времени. При обводнении эти организмы вновь возвращаются к жизни. Основой анабиоза является возможность сохранения структуры и функций белков и нуклеиновых кислот даже при температурах жидкого азота и полного обезвоживания. То есть во всех случаях обратимая остановка жизни возможна только при условии сохранения структурных основ организмов. Или, как *минимум, при сохранении структуры ДНК и белков, структуры геномов.*

1.4. Скрытая жизнь

Можно ли считать замороженные до минус 196⁰С, не проявляющих никаких признаков жизни спермии или коловратки мертвыми? Видимо, нет,

так как они сохраняют возможность вернуться к полноценной жизни после оттаивания. То есть замораживание таких живых тел можно расценивать как *временную остановку жизни*. Вернее, временную остановку проявлений жизни, тогда как структура и потенциалы тел и геномов сохраняется. Это означает, что жизнь тела - это лишь *проявление потенциальных свойств* высокоорганизованной материи. Эти свойства, в принципе, могут и не проявиться в отсутствии необходимых условий, хотя высокоорганизованная материя благополучно будет существовать даже в замороженном состоянии. То есть материальное начало жизни, хотя и сохраняется, но проявлений жизни как таковой может и не быть. Таким образом, на данном примере видно, что жизнь обусловлена специфическим потенциалом высокоорганизованной материи, ядром которой является геном. В условиях, не совместимых с проявлениями жизни, например, при замораживании в жидком азоте, живые тела не проявляют своих биологических свойств, сохраняя, однако, свою высокую организацию (низкую энтропию), а также структурно-функциональный и генетический потенциал к возрождению.

Явление временного отсутствия проявлений жизни свидетельствует о возможности существования *скрытой жизни*, устойчивыми субстратами которой являются покоящиеся комплексы НК и белков. Эти молекулы, главные организаторы жизни, при благоприятных условиях могут тут же проявиться в различных процессах и признаках. На основании вышеизложенного можно прийти к парадоксальному заключению - для того чтобы существовать, не обязательно жить постоянно. Возможность прерывистого проявления жизни - также одно из ее основных свойств. То есть, определенные физико-химические условия необходимы только для осуществления жизненных процессов и фенотипических проявлений жизни, что совсем не нужно для «безмолвного» существования ее тел и субстратов.

С этой точки зрения, жизнь как бы может быть в двух состояниях:

а) существовать и проявляться и б) существовать и не проявляться.

Если «*жизнь проявляется*», то это означает *наличие живых тел*, которые двигаются, дышат, питаются, размножаются, внутри клеток происходят химические и физические процессы, поддерживающие целостность и упорядоченность.

Если «*жизнь не проявляется*», - это значит, что имеющиеся тела не двигаются, не дышат, не питаются, у них отсутствуют процессы метаболизма. Однако это может быть связано не только со смертью, но и с временной остановкой жизненных процессов. Следовательно, даже если отсутствуют проявления жизни, это не значит, что ее нет.

Итак, с одной стороны, мы можем наблюдать живые функционирующие тела при физиологических температурах, с другой стороны, можно наблюдать длительное время абсолютное отсутствие жизненных проявлений у этих же тел в замороженном состоянии. Но после отогрева эти тела вновь становятся живыми. Таким образом, анабиоз прекрасно демонстрирует *возможность полной, но обратимой остановки жизни*. То есть, если, например, на Марсе отсутствуют проявления жизни, то

это не значит, что её там нет.

Рекомендуемая литература:

1. Лозина-Лозинский Л.К. Очерки по криобиологии/ Л.:Наука.-1972.- 287с.
2. Денков В. На грани жизни /М.:Знание.-1988.-192с.
3. Голдовский А.М. Анабиоз/ Л.:Наука.-1981.-136с.
4. С.Д. Мельничук, Д.О. Мельничук Гипобиоз тварин.- К.: НАУ. 2007. – 220 с.
5. Жегунов Г.Ф. Природа жизни и бессмертия. – М.: ЛЕНАРД, 2015. – 384 с.
6. Голдовский А.М. Анабиоз и его практическое значение. – Л.: Наука. 1975. – 342 с.
7. Тимофеев Н.Н. Искусственный гипобиоз. – М.: 1983, - 192 с.
8. Ушатинская Р.С. Скрытая жизнь и анабиоз. М.: Изд-во АН СССР. – 1990. – 180с.
9. Белоус А.М., Грищенко В. И. Криобиология. – К.: Наук. Думка, 1994, - 431 с.

Часть 5. Действие низких температур на организм человека

Глава 31. Гипотермия

31.1. Температура тела человека

31.2 Гипотермия

31.2.1 Естественная гипотермия

31.2.2 Искусственная гипотермия

31.3 Терапевтическая гипотермия

31.4 Экстремальная криотерапия

31.1. Температура тела человека

Температура тела человека поддерживается в довольно узком диапазоне температур. При этом разные части тела имеют температурные отличия. Особенно отличаются температуры внутреннего «ядра» и внешней «оболочки».

Ядро – это часть тела (внутренние органы), которая имеет относительно постоянную температуру. Температура ядра в разных участках несколько отличается. В печени она составляет 37,9–38,2°C, в мозге – 37,5–38,2°C, температура в анусе, влагалище или ухе – 37,5 °C; температура во рту – 37,0 °C; температура в подмышечной впадине – 36,6 °C. В среднем же температура ядра тела человека составляет 37,0°C, что поддерживается на постоянном уровне процессами терморегуляции. Отмечены небольшие суточные колебания температуры. Температура тела минимальна в предутренние часы и максимальна в дневное время.

Внешняя оболочка – это ткани поверхностного слоя тела. Через оболочку идёт теплообмен между ядром и окружающей средой. Теплообмен регулируется за счёт изменения кровоснабжения тканей оболочки. Температура кожи человека на различных участках колеблется от 24°C до 36,6°C. Периферические участки конечностей имеют температуру около 24–28°C. Самая высокая температура поверхности тела – в подмышечной впадине – 36,6°C.

Температура оболочки и конечностей при неблагоприятных температурных условиях кратковременно может колебаться в значительных пределах, и понижаться вплоть до 0°C без всяких последствий, тогда как нарушение температурного гомеостаза ядра тела даже на несколько градусов может приводить к нарушениям метаболизма и функций.

Температура человека строго поддерживается на определенном уровне с использованием физических, метаболических и физиологических механизмов. Способы и механизмы терморегуляции у млекопитающих описаны в главе 19.

31.2 Гипотермия.

Температура тела человека может понижаться вследствие длительного пребывания в недостаточно тёплой одежде на холоде, особенно в сырую и ветреную погоду. При попадании под дождь, при длительном нахождении в холодной открытой воде или в бассейне. При долгом лежании на холодной поверхности земли или помещения. Во всех случаях может развиваться общее переохлаждение организма или гипотермия.

Гипотермия — это болезненное состояние, при котором под воздействием внешних факторов температура (ядра ?) тела человека снижается ниже 37° С.

Искусственная гипотермия вызывается принудительно с определенными целями с использованием специальных средств.

Естественная гипотермия может возникать в холодных регионах, особенно в зимний или осенний период. Сильный мороз, холодный ветер, попадание в снег или холодную воду могут стать причинами быстрого снижения температуры тела.

31.2.1 Естественная гипотермия.

Факторы, способствующие развитию естественной гипотермии:

- высокая скорость ветра;
- высокая влажность воздуха;
- длительность пребывания на холоде;
- несоответствующая сезону или сырая одежда;
- голод, физическая усталость;
- заболевания, ослабляющие организм;
- старческий возраст.

Стадии гипотермии в зависимости от температуры и степени патогенности

I стадия (легкое переохлаждение или защитная фаза)

- температура тела 35 - 32°С;
- человек в сознании;
- беспокойство, повышение расхода энергии;
- озноб, мышечная дрожь;
- боли в руках и ногах;
- частый пульс;
- теплопродукция, сердечный выброс и артериальное давление повышаются.

Легкая степень гипотермии характеризуется активацией механизмов теплопродукции, сжатием периферических кровеносных сосудов, стремлением избежать действия холода. Если температура снаружи продолжает снижаться, то и наружные кровеносные сосуды продолжают сужаться. Следующая реакция тела на холод — это неконтролируемые частые судорожные сокращения мышц от 10 до 20 раз в секунду, более известные как дрожь, могут повысить обмен веществ почти в пять раз.

Энергия, требуемая на дрожание, берется из жиров и простых сахаров, очень быстро расходуется и требует пополнения, например в виде пищи.

II стадия (среднее переохлаждение или фаза истощения)

- температура тела 32 - 28°C;
- нарушение сознания;
- прекращение мышечной дрожи;
- кожа холодная, с мраморным оттенком;
- отморожения конечностей;
- поверхностное, нерегулярное, редкое дыхание;
- пульс слабый, плохо прощупывается;
- падение артериального давления;
- нарастающая сонливость.
- теплопродукция и сердечный выброс снижаются.

При падении температуры ниже 32°C общее возбуждение переходит в стадию торможения, при которой прогрессивно замедляются все функции организма. Угнетение метаболизма приводит к уменьшению утилизации кислорода и выработки CO₂. Теплопродукция, сердечный выброс и артериальное давление повышаются. Нарушается координация движений. Ухудшается концентрационная функция почек, возникает холодовой диурез, приводящий к значительной потере жидкости организмом.

Средняя степень гипотермии характеризуется истощением защитных механизмов. Человеку уже трудно самостоятельно ориентироваться в пространстве и найти выход из создавшегося положения. Ему требуется медицинская помощь.

III стадия (тяжелое переохлаждение или коматозная фаза)

- температура тела 28 - 24°C;
- потеря сознания, летаргия, кома;
- замедление сердечного ритма до 30-50 уд. в мин;
- дыхание очень редкое (4 в 1 мин), поверхностное;
- возможны судороги, рвота;
- выраженное окоченение конечностей и челюстей;

Тяжелая стадия гипотермии характеризуется, в первую очередь, резким нарушением работы сердца, редким, неглубоким дыханием. Происходит поражение центральной нервной системы с прогрессивным угнетением сознания. Для выхода из этого состояния требуется серьезная, длительная терапия.

IV стадия (крайне тяжелая, необратимая)

- температура тела ниже 24°C;
- сознание отсутствует;
- пульс <30 в 1 мин, лишь на сонной артерии;
- артериальное давление не определяется;
- нарастающее мышечное окоченение;
- отморожения и оледенение конечностей.

Крайне тяжелая стадия гипотермии может характеризоваться как клиническая смерть, так как витальные признаки практически отсутствуют. Из-за длительного отсутствия нормального кровоснабжения повреждаются практически все внутренние органы и ткани. Возвращение к жизни крайне проблематично.

Первая помощь при поражении холодом.

Общие мероприятия.

- Следует перенести человека в теплое помещение или изолировать от действия холода.

- Сменить одежду на сухую и теплую.
- Уложить горизонтально и запретить двигаться.
- Не массировать и не растирать.
- Контролировать температуру и частоту пульса.
- Вызвать врача.

Помощь при легкой гипотермии (32-35°C)

- Активное внешнее согревание.
- Горячее, сладкое питье.

Помощь при средней гипотермии (32-28°C)

- Активное внешнее согревание только туловища.
- Теплоизолирующие повязки на конечности.
- Горячее, сладкое питье (при сохранном сознании и возможности глотать жидкость).

- Алкоголь противопоказан.
- Вызов врача или транспортировка в больницу.

Помощь при тяжелой гипотермии (28-24°C)

- Бережные манипуляции.
- Контроль частоты пульса и дыхания.
- Вызов врача или транспортировка в больницу.

Потерпевшего с переохлаждением, у которого отсутствуют признаки биологической смерти (трупные пятна) или нет несовместимых с жизнью повреждений, не следует считать умершим. Целесообразно попытаться согреть его до температуры 35°C. Только после достижения этой температуры следует применять лекарственные препараты и выполнять кардиоверсию при необходимости.

31.2.2 Искусственная гипотермия

Состояние гипобиоза

Важной задачей криомедицины является разработка методов искусственной гипотермии и гипобиоза человека. Решение этой задачи позволило бы решить многие проблемы отсроченной терапии и хирургии, а также использовать гипотермию в лечебных целях.

Искусственная гипотермия — это глубокое и длительное принудительное охлаждение человека, при котором происходит снижение интенсивности процессов жизнедеятельности. Организм переходит в

состояние *гипобиоза*. В состоянии гипобиоза резко снижается потребление кислорода, существенно тормозится метаболизм, ограничиваются функции многих органов, снижается обмен веществ. В таком состоянии люди могут длительное время обходиться без движения, питания и потребления воды.

Однако пока не удастся охладить человека более чем на 3-5°C на длительное время без неблагоприятных последствий, так как понижение температуры существенно влияет на многие процессы метаболизма, на функции клеток, тканей и органов. Гипотермия может вызывать изменения в структуре ряда внутренних органов, активность ферментных систем, степень которых зависит от глубины гипотермии.

Согревание также связано с риском развития патологии, так как приводит к значительному повышению интенсивности метаболизма в тканях на фоне недостаточной доставки к ним кислорода в связи с особенностями реологических свойств охлажденной вязкой крови. Наблюдается вторичная циркуляторная гипоксия, что может неблагоприятно отразиться на пациенте. Но, тем не менее, гипотермия довольно широко используется в медицинской практике.

Искусственную гипотермию, в зависимости от способа охлаждения, подразделяют на *общую* (охлаждается весь организм), *краниocereбральную* (охлаждается только голова) и *локальную* (охлаждаются отдельные части тела). Эти способы охлаждения широко применяются в терапевтических целях.

Общая и краниocereбральная гипотермия

Общая и краниocereбральная гипотермия предназначены для снижения температуры всего организма. Общая гипотермия достигается с использованием пониженной температуры окружающей среды, ванн с холодной водой, пакетов со снегом и льдом, охлаждаемых с помощью специальных криогенных устройств, камер, костюмов и одеял; температура крови (а, следовательно, и всего организма) может быть снижена с использованием систем искусственного кровообращения.

При краниocereбральной гипотермии охлаждение организма достигается путем охлаждения головы пациента с помощью специальных аппаратов – гипотермов, в состав которых может, например, входить: емкость с охлаждаемой жидкостью (хладагентом), система программируемой подачи хладагента и **на**одеваемый на голову шлем, через который циркулирует хладагент. При общей и краниocereбральной гипотермии необходимым является использование наркоза, подавляющего терморегуляторную реакцию организма на охлаждение.

Глубина гипотермии. Глубина наркоза ограничена опасностью длительного угнетения регуляции жизненно важных систем организма, следствием которого могут стать нарушения функций сердца, печени, почек и др. органов. Основная цель гипотермии: повышение устойчивости тканей организма (в первую очередь, мозга и сердца) к гипоксии путем снижения

скоростей биохимических реакций и потребления кислорода. Снижение температуры мозга при краниocereбральной гипотермии до $28 \div 26^{\circ}\text{C}$ (температуры тела до $32 \div 30^{\circ}\text{C}$) снижает потребность организма в кислороде примерно на 30%. Риск осложнений при такой гипотермии незначителен.

С понижением температуры организма потребность его тканей в кислороде все более понижается. Так, при 9°C время обратимой остановки кровообращения у крысы может составлять до 2 часов. Однако в клинической практике столь глубокое охлаждение считается недопустимым из-за риска осложнений и летальных исходов. Исследования на экспериментальных животных показали, что глубокая гипотермия сама по себе может привести к развитию гипоксии.

В кардиохирургии, например, кардиоплегию (искусственную остановку сердца) проводят на фоне умеренной ($\sim 29^{\circ}\text{C}$) гипотермии. Ежегодно в мире с применением гипотермии оперируют около 100 тысяч больных с пороками сердца. Гипотермия позволяет пролонгировать время остановки сердца до 15 минут. В акушерской практике общая умеренная гипотермия ($\sim 30^{\circ}\text{C}$) позволила в несколько раз снизить смертность новорожденных от асфиксии.

Устойчивость к гипотермии падает с возрастом: детеныши животных легче переносят гипотермию благодаря менее развитой системе терморегуляции.

Скорость охлаждения при введении в состояние гипотермии должна быть умеренной: слишком быстрое охлаждение приводит к остановке сердца, спазму мелких сосудов, нарушению газообмена и развитию гипоксии. Наркоз не полностью подавляет систему терморегуляции.

Преимущества краниocereбральной гипотермии по сравнению с общей гипотермией:

- холод влияет на меньшую площадь рецепторных полей, что ограничивает амплитуду сигналов, вызывающих терморегуляторную реакцию;
- расширяются возможности управления процессом охлаждения;
- более низкая температура мозга (на $3 \div 5^{\circ}\text{C}$), чем температура внутренних органов более эффективно предотвращает гибель клеток мозга от гипоксии и способствует развитию более выраженных криотерапевтических эффектов в мозгу;

воздействие пониженной температуры на внутренние органы при этом минимизировано.

Области применения гипотермии:

- в процессах традиционных терапевтических и хирургических методов лечения для повышения устойчивости организма к гипоксии;
- при гипоксии, отеках и травмах мозга;
- при нарушениях циркуляции спинномозговой жидкости и крови;
- при остановке сердца, клинической смерти.

Неблагоприятные эффекты искусственной гипотермии.

Гипотермия вошла в клинику в 60-70х годах прошлого века без предварительных глубоких экспериментальных исследований. Она применялась в кардиохирургии, нейрохирургии и в комплексе мероприятий по спасению больных при печеночной коме. Причины возникающих иногда осложнений (фибрилляция сердца, острая печеночная недостаточность и т.п.) некоторое время не находили объяснений.

В дальнейшем было установлено, что гипотермия наряду с антигипоксическим эффектом может вызывать изменения в структуре ряда внутренних органов и активности ферментных систем, выраженность которых зависит от глубины гипотермии. Изменения обнаруживались в сердечно-сосудистой, иммунной, эндокринной, выделительной и кроветворной системах. В частности, глубокая гипотермия оказалась индуктором очаговых дистрофических изменений в лимфоидных клетках тимуса, селезенки, лимфатических узлов и костного мозга. Эти изменения фиксировались на фоне нарушенной микроциркуляции в тканях. Максимум изменений наблюдался на 2-3 день после охлаждения. После однократного охлаждения до 24-20°C изменения в организме экспериментальных животных прослеживались на протяжении 3-4 недель. Постгипотермические изменения по своему характеру были аналогичны изменениям, наблюдаемым при гипоксии.

В объяснении разнонаправленных эффектов гипотермии основные акценты были сделаны на изменениях в микроциркуляции и в метаболизме. Охлаждение повышает толерантность организма к гипоксии, снижая скорость обменных процессов и потребность тканей в кислороде, но изменения в гемодинамике в этот период вызывают умеренные нарушения структуры и функции клеток. При понижении температуры тела вязкость крови возрастает. Согревание, в свою очередь, приводит к значительному повышению интенсивности метаболизма в тканях на фоне недостаточной доставки к ним кислорода в связи с особенностями реологических свойств вязкой охлажденной крови - имеет место вторичная циркуляторная гипоксия. Таким образом, постгипотермические изменения можно объяснить как результат суммарного действия температурного фактора и вторичной циркуляторной гипоксии.

Локальная гипотермия

Локальная (региональная) гипотермия предусматривает разные варианты охлаждения участков тела – от прямого контакта с твердым, жидким или газообразным хладоносителем до применения систем с программируемой циркуляцией хладоносителя (использования гипотермов). Действие локальной криотерапии ограничено сравнительно небольшим слоем поверхностных тканей, в которых располагаются внешние рецепторы и микрососуды.

Кожа теплокровных организмов обладает эффективным защитным тепловым барьером. Температурный градиент в коже достаточно высок, и снижение температуры тканей до деструктивных значений (ниже 5°C)

возникает на глубине не более $0,5 \div 4,5$ мм (в зависимости от толщины кожи). При длительном и интенсивном охлаждении организм включает механизм каскадной ритмической вазоконстрикции – вазодилатации. Эшелонированная тепловая защита организма направлена на предотвращение охлаждения тканей, а если это невозможно – на ограничение охлаждения поверхностных слоёв. Максимальный криотерапевтический эффект достигается в момент *спазма* поверхностных капилляров и не зависит от времени экспозиции. Существенными для региональной криотерапии являются способ и скорость отвода тепла.

Клинические эффекты локальной гипотермии:

- улучшение оттока лимфы из тканей, что способствует ликвидации отеков;
- улучшение микроциркуляции крови в тканях, увеличение артериального кровотока и венозного оттока, уменьшение накопления жидкости в полостях, а, следовательно, уменьшение отеков;
- миорелаксация – ликвидация мышечных *контрактур* и снижение базального мышечного тонуса;
- улучшение *трофики* костной и хрящевой ткани;
- снижение болевой чувствительности;
- улучшение трофики мышечной, соединительной и др. тканей, стимуляция регенераторных механизмов.

Таким образом, действие локальной гипотермии на сосуды обеспечивает противоотечный (противовоспалительный) эффект, а прямое (или опосредованное) действие локальной гипотермии на очаг патологии приводит к ускорению репаративных процессов. К связанному с вазоконстрикцией эффекту криотерапии следует отнести изменение (снижение) уровня тканевого метаболизма.

В механизме снижения болевой чувствительности следует, по-видимому, выделять два этапа: первый связан с блокадой проведения болевых сигналов холодом, второй – с миорелаксацией, уменьшением отечности и другими последствиями криотерапии. Обезболивающий эффект криотерапии сохраняется до 3 часов.

В основе обезболивания и снижения мышечного тонуса лежит уменьшение скорости проведения нервных импульсов (полная блокада проведения импульсов по нерву наступает при 5°C).

Области применения региональной криотерапии:

- лечение воспалительных заболеваний суставов,
- лечение дегенеративных заболеваний суставов с вторичным воспалительным компонентом,
- лечение заболеваний позвоночника,
- лечение воспаления мягких тканей,
- лечение коллагенозов,
- лечение аутоиммунных заболеваний,

- лечение ожогов,
- лечение трофических язв и др.

Во время оказания первой помощи при ожогах охлаждение позволяет быстро прекратить действие гипертермии и, следовательно, уменьшить зону некроза. Охлаждение ожоговых ран холодной газовой струей способствует уменьшению болей, улучшению микроциркуляции, снижению плазмопотери и отека тканей. Объектом обработки в поздние сроки становятся раны с вялой грануляцией в процессе их подготовки к пластическому закрытию. Криообработка способствует уменьшению отека грануляций, их уплотнению, подсушиванию и, как итог, хорошему приживлению кожных лоскутов. При лечении трофических язв проявляется анальгезирующее, противовоспалительное и регенерирующее действие регионарной криотерапии.

31.3 Терапевтическая гипотермия.

Терапевтическая гипотермия — воздействие на пациента с целью снижению его температуры для уменьшения риска ишемического повреждения тканей при недостаточном кровоснабжении. Состояния недостаточного кровоснабжения могут возникать в результате сердечной недостаточности, остановки сердца или закупорки артерий при эмболиях.

Терапевтическую (лечебную) гипотермию можно осуществлять путем введения охлажденной крови или физиологического раствора через катетер в бедренную вену (инвазивный метод), или методами, в которых обычно используют охлаждаемое водой одеяло или жилет на торс и аппликаторы на ноги (неинвазивные методы).

Терапевтическую гипотермию наиболее часто используют при лечении энцефалопатии новорожденных, при лечении остановки сердца, ишемического инсульта, лечения травматических поражений головного и спинного мозга.

Лечение с использованием гипотермии следует начинать как можно скорее, поскольку со временем развития патологии эффективность гипотермии как защитного средства снижается. Чем раньше проводится гипотермия, тем лучше исход для пациента. За больными, вводимыми в состояние гипотермии, необходимо пристально следить, так как следует помнить о связанных с гипотермией побочных эффектах, таких как аритмия, снижение порога коагуляции, повышение риска инфекции и увеличение риска нарушения баланса электролитов. Следует избегать уменьшения температуры ниже целевого значения, поскольку тяжесть побочных эффектов гипотермии увеличивается при излишнем снижении температуры. Температура ядра тела пациента не должна падать ниже порога в 32 °C.

Перед началом использования гипотермии больному вводят фармакологические средства для контроля дрожи, так как если температура тела падает ниже 36 °C, пациент начинает дрожать.

При согревании больных следует придерживаться определенных правил. Необходимо медленно и непрерывно согревать пациента, чтобы избежать скачков внутричерепного давления. Согревание пациента должно происходить со скоростью не более 0,2 град в час, так как большинство летальных случаев, вызванных лечением гипотермией, происходит на стадии согревания, но их можно исключить с помощью аккуратного согревания и строго медицинского контроля функциональных показателей.

31.4 Экстремальная криотерапия.

Экстремальная криотерапия включает в себя как легкодоступные процедуры: обтирание снегом, купание в ледяной воде или обливание ею, так и использование сложных технических решений – криокамер с температурой воздуха ниже минус 100°C и максимально удаленной влагой.

Сто лет назад немецкий ученый-медик Себастьян Кнайт разработал систему закаливания и термолечения, продемонстрировав на собственном опыте, что самые тяжелые заболевания (воспаление легких, сопровождаемое лихорадкой) можно победить стимуляцией собственных сил организма. В 1979г. на ревматологическом конгрессе японский врач Т.Ямаучи сообщил об успешном лечении полиартрита с применением «криовоздушной камеры с ультранизкой температурой», в которой пациенты находились и пребывали в движении в течение 0.5 ÷ 3мин. Температура на поверхности кожи пациентов за время процедуры понижалась до 2°C. Немаловажным, по-видимому, было и движение больных, ведь известно, что сокращение – расслабление скелетных мышц способствует току крови и лимфы. Обезболивающий эффект охлаждения устранял, в свою очередь, скованность движений. В настоящее время эта стресс-провоцирующая технология нашла применение во многих клиниках мира.

Предложенный метод лечения получил название *экстремальная аэрокриотерапия*. Организм при таком воздействии реагирует не только системой терморегуляции. Сигналы с большой площади рецепторных полей (включая рецепторы дыхательных путей), эмоциональное возбуждение и, возможно, последующая блокада поверхностных рецепторов обуславливают включение в стресс- лимитирующую реакцию организма практически всех его систем: нервной, эндокринной, сердечно-сосудистой, иммунной и др.

Использование при экстремальной аэрокриотерапии температур порядка минус 100°C обеспечивает возможность при минимальной экспозиции обеспечить максимальную амплитуду стресс-лимитирующих процессов, усилить и расширить диапазон тканевых криоэффектов без применения лекарств и других методов лечения. Реакция организма на стресс зависит от амплитуды, времени действия внешнего фактора и от функциональных свойств стресс-лимитирующих систем организма.

Общая схема реакции:

- острая фаза адаптации (подготовка к борьбе или бегству)
- фаза резистентности (борьба)

- фаза фрустрации (поражение).

Кратковременное воздействие экстремально низких температур, не нарушая энергетические и функциональные механизмы, является своеобразным тренингом для всех звеньев физиологической фазы стресса и приводит в наивысшую готовность все физиологические резервы организма.

Универсальные качества экстремальной криотерапии позволяют рекомендовать ее использование во многих областях медицины: в общей терапии, ревматологии, артрологии, дерматологии и косметологии, гинекологии и андрологии, невропатологии, ортопедии, стоматологии и, возможно, в онкологии и психиатрии. У всех пациентов после экстремальной аэротерапии отмечен мощный реабилитационный след на протяжении от 0,5 до 2 лет, проявляющийся в снижении частоты и тяжести простудных заболеваний, ОРИ, заболеваний гриппом и др.

Рекомендованная литература:

1. 1. Mayer S., Sessler D. Therapeutic hypothermia. — New York: Marcel Dekker, 2005 — 629 p.
2. Buggy D.J., Crossley A.W. Thermoregulation, mild perioperative hypothermia and postanesthetic shivering // Br. J. Anaesth. — 2000. — Vol. 84(5). — P. 615-628.
3. Сесслер Д. Температурный контроль во время операции // Актуальные проблемы анестезиологии и реаниматологии. Освежающий курс лекций. — Архангельск: Тромсе, 1997. — С. 76-82.
4. Бабийчук Г.А., Шифман М.И. Нейрохимические процессы в центральной нервной системе при гипотермии // Киев: Наукова Думка, 1989. — 152 с.
5. Буренина И.А. Современные методики криотерапии в клинической практике. // Вестник современной клинической медицины. — 2014. — Т. 7. — С. 57–61.
6. Кудокоцева О.В., Ломакин И.И. Общая экстремальная аэрокриотерапия // Провизор. — 2006. — № 3. — С.14–16.
7. Основы физиологии функциональных систем / под ред. К.В. Судакова.— Москва: Медицина, 1983. — 272 с.
8. Бутров А.В., Шевелев О.А., Петрова М.В. и др. Методические рекомендации по применению медицинского изделия «АТГ-01 (Аппарат терапевтической гипотермии 01)» у больных в критических состояниях. Учебное пособие. — Москва, 2014. — 45 с.

Глава 32. Острое охлаждение человека

32.1. Переохлаждение. Акцидентная гипотермия. 32.1.1. Периоды течения острого переохлаждения. 32.2. Патогенез гипотермии при остром охлаждении. 32.2.1. Основные патологические процессы при развитии гипотермии. 32.2.2. Стадии развития акцидентной гипотермии как периода острого переохлаждения. 32.3. Клиническая картина и диагностика острого переохлаждения. 32.3.1. Проявления акцидентной гипотермии. 32.3.2. Степени тяжести острого переохлаждения. 32.4. Первая помощь и лечение пострадавших с гипотермией. 32.4.1. Первая помощь при охлаждении разной степени тяжести. 32.4.2. Лечение пострадавших с акцидентной гипотермией. 32.5. Осложнения, возникающие после акцидентной гипотермии, прогноз. 32.6. Острое охлаждение человека в воде. 32.6.1. Эффекты и значение глубокого охлаждения. 32.6.2. Внезапное острое переохлаждение. 32.6.3. Холодовой шок. 32.6.4. Устойчивость человека к острому переохлаждению.

32.1. Переохлаждение. Акцидентная гипотермия

Температура тела является важной физиологической константой, и поддержание ее в определенном диапазоне является необходимым условием правильного функционирования всех органов и систем. Процессы образования и потери тепла в организме сбалансированы и происходят непрерывно (глава 31). Динамическое равновесие между продукцией и отдачей тепла для обеспечения постоянства внутренней температуры тела достигается как путем регулировки всех видов термогенеза, так и поддержанием определенного температурного градиента между «гомойотермным ядром» и «пойкилотермной оболочкой» тела. Тепловой баланс может быть нарушен за счет увеличения потерь тепла, снижения его продукции или сочетания того и другого.

Когда температура окружающей среды ниже температуры тела человека, то, в силу законов физики, происходит непрерывное его *охлаждение* (то есть процесс потери тепла). По скорости развития процесса охлаждения выделяют:

- *острое* (потеря большого количества тепла за короткий период времени);
- *хроническое* (длительная по времени потеря тепла);
- *подострое* (охлаждение происходит быстрее, чем хроническое, но не так быстро как острое).

Процесс острого охлаждения является наиболее опасным для здоровья и жизни человека.

Переохлаждение – это состояние организма, вызванное чрезмерным охлаждением, которое субъективно воспринимается как ощущение глубокого холода и сопровождается снижением температуры тела.

Комплекс патофизиологических и патоморфологических изменений органов и тканей, возникающих вследствие местного или общего переохлаждения организма, называют *холодовой травмой*.

Если потери тепла в течение определенного времени превышают возможности термогенеза, то развивается *гипотермия* – состояние *пониженной температуры* «гомойотермного ядра» тела человека. Гипотермию, которая возникает в результате внезапного действия низкой природной температуры, называют *случайной, аварийной* или *акцидентной* (accidental hypothermia).

Чем больше снижается температура тела, тем сильнее выраженность патологических процессов в организме и тем опаснее это состояние для здоровья и жизни пострадавшего. В конце концов, температура может снизиться ниже критического уровня, после которого организм неспособен генерировать достаточное количество тепла для обеспечения своей жизнедеятельности. Срыв эволюционно выработанных механизмов поддержания постоянства температуры «ядра тела», приводит к развитию синдрома *умножающейся полиорганной недостаточности* и гибели пострадавшего.

В прошлом веке активно использовался термин «замерзание», которым обозначали смерть человека от действия холода, то есть в результате развития гипотермии. В настоящее время этот термин не используется, поскольку собственно процесс замерзания происходит уже после смерти.

Если учитывать соотношение температуры воздуха и температуры тела человека, то следует заключить, что окружающая нас среда потенциально опасна в отношении возможности гипотермии практически круглый год. К факторам риска гипотермии можно отнести все условия, в которых потери тепла повышены, а теплопродукция снижена. Акцидентная гипотермия развивается обычно при нахождении человека в неблагоприятных условиях внешней среды или при нахождении в обычных условиях, но в состоянии беспомощности, в условиях, ограничивающих перемещение. В малонаселенных местах гипотермия чаще встречается у людей, недостаточно подготовленных к пребыванию вне дома или потерявших способность передвигаться (например, в результате травмы). В городах гипотермия, как правило, наблюдается у лиц, не имеющих адекватного укрытия из-за болезни или других обстоятельств. Примечательно, что смерть, вызванная гипотермией, встречается во всех географических широтах, включая тропики, часто в сырую погоду при высокой скорости ветра и температуре выше нуля. В нашей стране случаи смерти от холода наблюдаются на протяжении всего года, причем наибольшее их количество отмечается, как правило, в осенние и весенние месяцы.

32.1.1. Периоды течения острого переохлаждения

Для развития острого переохлаждения необходимы условия, обеспечивающие быструю потерю организмом значительного количества тепла. Например, это может произойти при кораблекрушении.

В течение острого переохлаждения и последующего восстановления можно выделить *четыре периода*.

1. *Период охлаждения*, продолжается от начала воздействия холодового фактора до момента уменьшения температуры «гомойотермного ядра». В этот период происходит максимальная активация компенсаторных процессов, направленных на снижение потерь тепла и увеличение термогенеза.

2. *Период развития гипотермии*, включает весь отрезок времени, когда температура «ядра» остается ниже физиологической нормы. В это время происходит истощение возможностей компенсаторных реакций организма и наблюдается максимальная выраженность патологических изменений, затрагивающих практически все органы и системы.

3. *Период нормализации температуры тела*, наступает после прекращения охлаждения и восстановления нормальной температуры «ядра» и характеризуется симптомокомплексом, отражающим все многообразие патологических изменений, вызванных гипотермией у каждого конкретного пациента.

4. *Период восстановления нарушенных функций и отдаленных последствий* является самым продолжительным периодом острого переохлаждения. Он имеет нечеткие границы и наступает после купирования основных нарушений, возникших в период нормализации температуры тела. Окончанием указанного периода следует считать полное исчезновение последствий гипотермии.

32.2. Патогенез гипотермии при остром охлаждении

32.2.1. Основные патологические процессы при развитии гипотермии

На различных этапах развития гипотермии, в ее патогенезе задействованы практически все органы и системы организма. Наиболее значимое патологическое влияние общего охлаждения связано с изменениями со стороны мочевыделительной, сердечно-сосудистой и центральной нервной систем.

Мочевыделительная система. Возникновение и усиление вазоконстрикции по мере охлаждения «оболочки» приводит к «централизации» кровотока, что приводит к увеличению потока крови в почки и, соответственно, сопровождается увеличением образования мочи. Это явление называют холодным диурезом, который сам по себе является полезной приспособительной реакцией, однако в сочетании с нарастающей периферической вазоконстрикцией он приводит к значительному уменьшению внутрисосудистого объема. В конце концов, происходит снижение сердечного выброса, повышение тонуса резистивных сосудов, что, в свою очередь, приводит к уменьшению почечного кровотока и закономерно снижает скорость клубочковой фильтрации вплоть до возникновения острой

почечной недостаточности. Известно, что при температуре между 27°C и 30°C почечный кровоток снижается на 50%. Нарушение фильтрационной функции почек может приводить к электролитным нарушениям.

Сердечно-сосудистая система. В начальный период холодового воздействия частота сердечных сокращений, артериальное давление и сердечный выброс увеличиваются, что вызвано активацией симпатoadреналовой системы. В дальнейшем значения этих показателей стабилизируются (выходят на плато). После чего наступает прогрессирующее и зачастую быстрое их снижение. Механизм развития брадикардии связан со снижением спонтанной деполяризации клеток водителя ритма и проводящей системы сердца. Уменьшение частоты возникновения импульсов в «иерархически главном» сино-атриальном водителе ритма и снижение проводимости способствует возникновению аритмий. По мере усугубления тяжести гипотермии может возникнуть фибрилляция предсердий и желудочков сердца, а затем асистолия (при температурах ниже 25°C).

Центральная нервная система. В ответной реакции ЦНС на действие холода сменяются две последовательные фазы: активации, направленной на поддержание нормальной температуры тела, и угнетения, сопровождающейся торможением активности коры и подкорковых центров головного мозга. Причем угнетение функций мозга носит нисходящий характер – от верхних (эволюционно более молодых) к нижним (эволюционно более древним) этажам центральной нервной системы. В зависимости от уровня, на котором происходит угнетение мозговых функций, появляется та или иная «мозговая» симптоматика. Вначале происходит нарушение тонких движений, что выглядит как неуклюжесть, нарушение координации. Появляются нарушения когнитивных функций, вялость, заторможенность, утрачивается способность адекватно оценивать окружающую обстановку. В конечном итоге возникают дизартрия, атаксия и утрата моторных навыков.

Примечательно, что уменьшение кровоснабжения головного и спинного мозга при гипотермии сопровождается не такими выраженными ишемическими нарушениями, как в условиях нормальной температуры. Это связано с протекторным действием снижения температуры ЦНС, которое реализуется за счет снижения уровня метаболических процессов в клетках головного и спинного мозга.

32.2.2. Стадии развития акцидентной гипотермии, как периода острого переохлаждения

В период развития акцидентной гипотермии в процессе острого переохлаждения по мере снижения температуры тела можно выделить последовательные стадии.

Стадия устойчивой компенсации. На этой стадии происходит мобилизация резервов организма для сохранения нормальной температуры

тела. Происходит выраженная активация системных нейро-гуморальных влияний, что сопровождается выбросом катехоламинов и глюкокортикоидов из надпочечников, спазмом микрососудов кожи и слизистых оболочек, подъемом артериального давления, увеличением частоты сердечных сокращений, гипервентиляцией легких, контрактильным термогенезом, повышением обмена веществ, потребления кислорода (метаболический термогенез).

Стадия неполной компенсации. В эту фазу усугубляется централизация кровотока, развивается синдром расстройств регионарного кровообращения вплоть до «физиологической ампутации» конечностей. Имеет место усиление основного обмена, остаются повышенными артериальное давление и частота сердечных сокращений. Усугубляются нарушения микроциркуляции в виде спазма артериол капилляростаза, слайдж-синдрома. Возможно возникновение гиперкоагуляционного синдрома, раннего холодового гемолиза. Развивается гипоксия тканей, возникают перичеселлюлярные и перивазальные отеки. Отмечаются парестезии, угнетаются функции основных систем, развивается синдром умножающейся недостаточности внутренних органов.

Стадия декомпенсации. Указанная стадия характеризуется резкой централизацией кровообращения с выраженными нарушениями кровоснабжения внутренних органов, снижением АД, брадикардией, урежением дыхания. Происходит торможение регуляторной функции ЦНС, истощение энергетических резервов организма, что приводит к снижению обмена веществ, понижению потребления кислорода, угнетению тканевого метаболизма. Развивается синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания с микро- и макротромбозом. Усугубляется полиорганная недостаточность. Продолжается развитие межуточных, интерстициальных и мионевральных отеков. Развивается холодовая денервация и микрокапиллярная блокада тканей. Возникают парезы скелетных мышц и мышц кишечника. Как результат многофакторного общего воздействия охлаждения на органы и ткани может развиваться поздний холодовой гемолиз. Ионы калия, кальция железа и др., которые выходят в кровь при разрушении эритроцитов, оказывающих негативное воздействие на сократимость миокарда, способствуют возникновению нарушений сердечного ритма и дисбалансу свертывающей и противосвертывающей систем крови.

Стадия парализации (терминальная). Эта фаза характеризуется очаговыми и сегментарными структурными изменениями (в том числе необратимыми) внутренних органов, которые сопровождаются парализацией функций. Проявляется «наркотическое» действие холода на ЦНС. Возникает паралитическое расширение периферических сосудов, что резко повышает приток крови в сосуды «пойкилотермной оболочки», в результате чего значительно повышается потеря тепла и резко снижается температура «гомойотермного ядра». Падает уровень метаболических процессов в тканях. На фоне прогрессирующего тромбоза и ишемии развиваются очаговые и

диссеминированные некрозы во внутренних органах. Усугубляется отек внутренних органов. Нарастают необратимые изменения в тканях, синдром умножающейся недостаточности внутренних органов. Процесс заканчивается разрушением интегративной целостности организма, которое проявляется острой сердечно-сосудистой, дыхательной и мозговой недостаточностью, анурией, печеночным блоком, отеком легких и мозга.

32.3. Клиническая картина и диагностика острого переохлаждения

32.3.1. Проявления акцидентной гипотермии

Проявления гипотермии можно встретить при самых разнообразных обстоятельствах. Казалось бы, диагностика акцидентной гипотермии не должна вызывать затруднений. Однако на практике это не так. Когда о продолжительном охлаждении рассказывает сам пострадавший или сопровождающие его лица, нетрудно сделать вывод о возможной гипотермии и целенаправленно провести дифференциальную диагностику. Задача может оказаться куда более сложной, когда таких свидетельств нет, а клиническая картина маскируется признаками другого патологического состояния. Гипотермия может наступить без явных свидетельств переохлаждения, например, в относительно теплое время года у людей с психическими нарушениями, отравлением или травмой. Классический случай, это гипотермия у пострадавших с тяжелым алкогольным опьянением.

Проявления гипотермии сами по себе неспецифичны, они в значительной мере зависят от скорости потери тепла и индивидуальных особенностей человека. Например, пациент может жаловаться на тошноту, головокружение, слабость, чувство голода. Возможна спутанность сознания, невнятная речь. Таким образом, симптомы гипотермии могут быть своевременно замечены и правильно истолкованы лишь при достаточной степени настороженности и знакомстве с клиникой и патофизиологией этого состояния.

32.3.2. Степени тяжести острого переохлаждения

В зависимости от характера и выраженности отдельных клинических проявлений и синдромов, выделяют три *степени тяжести* острого переохлаждения.

Легкая степень переохлаждения соответствует патогенетической стадии устойчивой компенсации. Ректальная температура снижается до 35° С, аксиллярная – до 34–32°С. Наблюдается возбуждение, переходящее в усталость и апатию. Речь скандированная. Часто развивается атаксия. Двигательная активность снижена. Кожа и слизистые оболочки бледные, имеет место так называемая «гусиная кожа». Конечности холодные. Характерны мышечная дрожь, озноб. Могут появляться парестезии в конечностях. Типично развитие гипервентиляционного синдрома покоя (увеличение глубины и частоты дыхания до 24–28 в минуту), сменяющегося

уменьшением глубины и частоты дыхания до 10–14 в минуту. Характерны тахикардия покоя до 110–130 уд/мин, умеренное повышение артериального давления (на 10–20 единиц). Диурез увеличен.

Средняя степень – отвечает патогенетической стадии неполной компенсации. Ректальная температура уменьшается до 33°C, аксиллярная – до 32–29°C. Сознание угнетено. Могут встречаться галлюцинации и ретроградная амнезия. Пострадавшие не в состоянии самостоятельно передвигаться. Мышечная дрожь сменяется мышечной ригидностью (повышение тонуса скелетных мышц), озноб прекращается. Может появляться мраморность кожи, акроцианоз. Часто встречаются парестезии. Наблюдается уменьшение глубины и частоты дыхания до 8–10 в минуту. Тахикардия сменяется брадикардией (до 40 уд/мин), пульс поверхностный, слабого наполнения. Характерно стойкое повышение артериального давления на 20 и более единиц. Диурез остается увеличенным.

Тяжелая степень – соответствует патогенетическим стадиям декомпенсации и парализации. Ректальная температура уменьшается до 30°C и ниже, аксиллярная – ниже 29°C. Сознание угнетено до глубокого сопора и комы. Отмечаются выраженная адинамия, вынужденное положение тела. Часто пострадавший находится в позе эмбриона. Кожные покровы и слизистые оболочки синюшные. У части пострадавших возникают судороги. Могут развиваться гемипарезы, холодовая полинейропатия. Частота дыхания резко уменьшена вплоть до 2–6 в минуту. Нарастает брадикардия, пульс едва различим, на периферических артериях может не определяться. Возникают фибрилляции предсердий и желудочков, асистолия. Резко падает артериальное давление. Диурез отсутствует (из-за развития острой почечной недостаточности и пареза мочевого пузыря).

32.4. Первая помощь и лечение пострадавших с гипотермией

32.4.1. Первая помощь при охлаждении разной степени тяжести

Гипотермия является неотложным состоянием с высоким уровнем смертности, поэтому крайне важно своевременно ее выявить и безотлагательно приступить к оказанию помощи пострадавшим. В основе всех действий по борьбе с гипотермией (любой степени тяжести) лежит комплекс мероприятий по восстановлению физиологической температуры «гомойотермного ядра» и «пойкилотермной оболочки» тела. *На этапе первой помощи* необходимо принять все доступные меры по уменьшению потерь тепла и согреванию пострадавшего. Практические рекомендации по диагностике и оказанию первой помощи, пострадавшим с переохлаждением представлены в таблице 32.1.

Суть и последовательность действий зависят от конкретной ситуации. По возможности, пострадавшего необходимо защитить от воздействия ветра, дождя, снега. Для этого его нужно быстро обеспечить каким-либо укрытием,

можно соорудить укрытие вокруг пострадавшего (палатка, тент, экран от ветра и пр.). Пострадавшего необходимо переодеть в сухую, желательно

Таблица 32.1. Практические рекомендации по диагностике и оказанию первой помощи пострадавшим с переохлаждением

Степень переохлаждения	Диагностические признаки	Первая помощь
Лёгкая	Ощущение холода и мурашек на коже. «Гусиная кожа», лёгкая дрожь. Пострадавший не может выполнять сложные действия. По мере охлаждения дрожь усиливается, снижается чувствительность конечностей (в первую очередь рук) вплоть до онемения.	Уменьшение потерь тепла. Укрытие от атмосферных влияний. Сухая одежда. Дополнительные слои одежды. Легкий массаж конечностей. Физическая активность. Согревание «изнутри» Горячее калорийное питье. Алкоголь противопоказан! Согревание «извне» Любые внешние источники тепла.
Средняя	Сильная дрожь (пострадавшего буквально трясет, он стучит зубами), повышение тонуса мышц. Пострадавший производит впечатление пьяного, часто спотыкается. Движения замедленны и затруднены, вплоть до невозможности произвольных движений руками, резко выражены нарушения координации движений (например, пострадавший не может пройти по прямой линии). Мыслительные процессы заторможены, речь затруднена, человек не может объяснить, что с ним произошло, могут возникнуть признаки угнетения сознания.	Уменьшение потерь тепла. Укрытие от атмосферных влияний. Сухая одежда. Дополнительная теплоизоляция (поместить пострадавшего на многослойную подстилку, укрыть сверху). Покой, физическая активность, пассивные движения, массаж противопоказаны! Обеспечить пострадавшему возможность регулярного мочеиспускания. Согревание «изнутри» Горячее калорийное питье (если позволяет состояние пострадавшего). Алкоголь противопоказан! Согревание «извне».
Тяжёлая	Дрожь отсутствует, открытые участки кожи выглядят синюшными, координация движений практически отсутствует, как правило, пострадавший не способен передвигаться самостоятельно. Выражена ригидность мышц. Сознание спутанное, поведение иррациональное. Пульс и дыхание редкие, поверхностные, их частота непостоянна. По мере усугубления гипотермии нарастает угнетение сознания, развивается кома.	Проводить с осторожностью, во избежание феномена «afterdrop». Источники дополнительного тепла нужно размещать над крупными сосудами на шее (сонная артерия), в области подмышек (подключичная артерия), в паху (бедренная артерия).

теплую одежду и/или поместить в теплый, сухой, изолирующий материал, например, в спальник. Для повышения теплоизоляции пострадавшего от окружающей среды очень важно уложить его на изолирующую подстилку (желательно многослойную), это гораздо важнее, чем укрыть пациента сверху. Физическая активность показана только при переохлаждении легкой степени, то же касается пассивных движений конечностями и их массажа. Пренебрежение этими рекомендациями создает опасность расширения периферических сосудов и поступления значительного объема холодной крови от «оболочки», что приведет к еще большему снижению температуры «ядра» (феномен «afterdrop»). В связи с этим пострадавший должен как можно дольше находиться в покое.

Если состояние пострадавшего позволяет, согревание тела желательно проводить «изнутри», давать калорийное теплое питье, например, вода со сгущенным молоком, слабый чай с сахаром. Избытка кофеина следует избегать, в связи с его мочегонным действием. Применение алкоголя противопоказано! При гипотермии человек испытывает частую потребность в мочеиспускании, очень важно обеспечить ему такую возможность. При непроизвольном мочеиспускании необходимо обеспечить пострадавшего подгузником или хотя бы полиэтиленовым пакетом.

Согревание «извне» нужно проводить с осторожностью, во избежание вторичного снижения температуры тела пострадавшего после начала согревания (феномена «afterdrop»). Источники дополнительного тепла следует размещать над крупными сосудами на шее (сонная артерия), в области подмышек (подключичная артерия), в паху (бедренная артерия). В качестве таких источников можно использовать промышленно изготовленные грелки или любые подходящие для этого подручные средства: емкости с теплой водой, нагретые в костре камни и прочее. Важно не допустить ожогов, поэтому источники тепла не должны быть очень горячими, а перед использованием их необходимо завернуть в несколько слоев ткани.

Пострадавшие с общим переохлаждением должны быть максимально быстро доставлены в ближайшее лечебное учреждение, а далее, по показаниям – в специализированное лечебное учреждение. В условиях чрезвычайных ситуаций эвакуация пострадавших с переохлаждением средней и тяжелой степени производится лежа санитарным транспортом в первую очередь, при переохлаждении легкой степени – сидя или лежа во вторую очередь. Пострадавших с тяжелой гипотермией нужно перемещать чрезвычайно осторожно в связи с высокой готовностью миокарда к фибрилляции желудочков.

32.4.2. Лечение пострадавших с акцидентной гипотермией

В первую очередь проводят неотложные мероприятия по восстановлению и поддержанию витальных функций. Если у пострадавшего в состоянии гипотермии не определяются пульс на магистральных артериях,

отсутствуют признаки самостоятельного дыхания, смерть может быть констатирована только после согревания до 32–34°C и отсутствия эффекта от всего комплекса реанимационных мероприятий.

Восстановления физиологического уровня температуры «ядра» тела добиваются, используя постепенное согревание «изнутри», промыванием желудка и толстой кишки подогретыми солевыми изотоническими растворами, внутривенным введением подогретых растворов. Согревание должно проводиться в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии при адекватном восполнении объема циркулирующей крови из-за риска «коллапса согревания» и асистолии. Еще одним методом согревания «изнутри» является экстракорпоральное согревание крови. Этот метод используют у пациентов с тяжелой степенью переохлаждения, при недостаточной эффективности других методов лечения. Главное достоинство экстракорпорального согревания крови – это высокая скорость повышения температуры «ядра» тела. Дополнительные преимущества связаны с возможностью подачи в циркуляцию оксигенированной крови в условиях отсутствия механической активности сердца.

С учетом клинических, лабораторных и инструментальных данных, пострадавшим проводится лечение и профилактика острых гемодинамических нарушений, расстройств дыхания, коррекция нарушений свертывающей системы крови, кислотно-основного и электролитного баланса, полиорганной дисфункции; осуществляют профилактику и лечение инфекционных осложнений. Важную роль с первых дней лечения пострадавших играет организация полноценного энтерального и парентерального питания, витаминотерапия, применение методов физиотерапии.

32.5. Осложнения, возникающие после акцидентной гипотермии, прогноз

Легкая степень переохлаждения у молодого, исходно здорового человека, как правило, протекает благоприятно; для выздоровления обычно достаточно простого согревания. Однако даже у таких пациентов могут развиваться осложнения, опасные для жизни. В условиях быстрого охлаждения, например, при нахождении в мокрой одежде на сильном ветру возможны нарушения ритма сердца, и даже прекращение сердечной деятельности с остановкой дыхания и кровообращения. У людей пожилого возраста, страдающих хроническими заболеваниями (в первую очередь сердечно-сосудистой и дыхательной систем) даже легкая степень переохлаждения может иметь фатальные последствия. Прогноз в таких случаях определяется характером и тяжестью сопутствующей патологии, а также индивидуальными особенностями пострадавших, определяющими наличие в организме соответствующих «резервов» и возможность их своевременного использования для борьбы с гипотермией.

При переохлаждении средней и тяжелой степеней в период гипотермии возникают такие грозные осложнения как острый сосудистый коллапс, острые нарушения ритма сердца, рефлекторная остановка сердца, острая дистрофия миокарда, острый коронарный синдром, тромбоэмболия легочной артерии, острая остановка дыхания, ознобление легких, выраженный бронхоспазм и острая эмфизема легких, острые реактивные состояния, выраженные нарушения интеллекта, судорожный синдром, острая почечная недостаточность. В периоде восстановления температуры тела характерны лихорадка, гемолитическая желтуха, проявления полиорганной недостаточности (холодовая нефропатия, острая почечная недостаточность, гепатопатия), грубые нарушения реологических свойств крови и развитие синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, трофические нарушения. Типично развитие инфекционных осложнений, связанных с понижением уровня общей резистентности организма и дисфункцией местных защитных механизмов. Происходит обострение хронических заболеваний. Следует отметить, что последствия перенесенной гипотермии в виде астенизации, вегетососудистых нарушений, дисфункций внутренних органов, неврологической симптоматики, снижения иммунологической резистентности и пр. могут сохраняться на протяжении длительного времени, а сенсibilизация к действию холода – на всю жизнь.

32.6. Острое охлаждение человека в воде

32.6.1. Эффекты и значение глубокого охлаждения

Особый интерес для криобиологии и криомедицины представляет глубокое охлаждение человека. Известно, например, что через 5÷6 мин после остановки сердца клетки мозга гибнут от гипоксии. В то же время в опытах на лабораторных животных показано, что охлаждение до 30°C может отсрочить гибель клеток мозга на 15 мин. Гипотермия снижает потребность организма в кислороде, снижая скорость обменных процессов. В опытах на лабораторных животных показано, что охлаждение до 28°C снижает потребность в кислороде на 50%, охлаждение до 24°C - на 70%, а охлаждение до 20°C - на 85%. Гипотермия снижает чувствительность организма и к действию различных физических факторов.

Первый опыт глубокого быстрого охлаждения людей в лечебных целях был проведен в середине 20 века. После блокирующего центры терморегуляции в гипоталамусе наркоза (вводили барбитураты) больного охлаждали в ванне с температурой 4°C до 28 ÷ 29°C или заворачивали в одеяло и обкладывали резиновыми подушками со льдом. В результате резко падал пульс больного, замедлялось дыхание, перестали функционировать почки, сильно снизился обмен веществ. В таком состоянии больные находились до двух недель и более с интервалами. Применялось искусственное питание. Отогрев сопровождался продолжительным массажем, больным давали теплый кофе. После такой процедуры

наблюдались нарушения памяти и некоторых других функций человека, что постепенно восстанавливалось спустя несколько суток.

В последующем (в 1950-1960гг.) гипотермия стала применяться при операциях на остановленном сердце. Кровообращение отключали на 7-8 минут. Затем стали применять более безопасную методику: охлаждение не всего тела, а только головы - кранио-церебральную гипотермию, которая обеспечивает безопасный перерыв в кровообращении до 30 мин. Рекордом искусственного быстрого глубокого охлаждения человека под наркозом является охлаждение больного за 1 час до 9°C.

32.6.2 Внезапное острое переохлаждение

Параллельно с поиском способов безопасного охлаждения при искусственной гипотермии внимание исследователей было направлено и на изучение возможности спасения людей после *акцидентного переохлаждения*. Холодная вода в данном случае выступает как среда с очень большой теплоемкостью (в 4,2 раза больше теплоемкости воздуха) и теплопроводностью (в 28,7 раза больше теплопроводности воздуха). Пределы способностей человеческого организма по поддержанию температурного гомеостаза ограничены. За счет сужения поверхностных сосудов тепловые потери могут быть снижены в 2-3 раза. Мышечная дрожь может увеличивать теплопродукцию в 2-5 раз, а интенсивная мышечная работа – в 10-15 раз. Но увеличение теплопродукции сопряжено как с увеличением теплопотерь, так и с энергетическим истощением организма. В воде с температурой 12°C человек теряет за 4 мин 116 Вт тепловой энергии, на воздухе такая потеря тепла осуществляется за 1 час. В воде с температурой 12°C и ниже происходят периодические (каждые 15÷30 мин) расширения спазмированных сосудов кожи. Это существенно снижает эффективность вазомоторной реакции, направленной на уменьшение потерь тепла организмом.

Пребывание в воде с температурой 33-35°C для человека безопасно. Время его безопасного пребывания в воде с температурой 24°C ограничено 7-9 часами, при понижении температуры воды до 5-15°C это время снижается вдвое, а при 2-3°C составляет 10-15 мин. Гибель же неподвижного человека на воздухе с температурой 0-4°C может наступить через 8-12 часов при снижении температуры тела на 9-13°C.

Испытания, проведенные в 1984г. на 20 добровольцах, показали, что пребывание в ледяной воде (с температурой ниже 10°C) в течение 30-40 мин приводит к нарушению температурного гомеостаза со снижением ректальной температуры до 35°C. Общее переохлаждение может развиваться при охлаждении не только всего организма, но и погруженных в воду конечностей. Например, при действии холода и влаги на конечности в течение 12 часов ректальная температура снижается на 2°C.

Переохлаждение является одной из наиболее распространенных причин гибели людей при кораблекрушениях. Так, по данным военной статистики, 2/3 морских потерь (около 30000 человек) во время Второй

Мировой войны были связаны с переохлаждением. Современный уровень знаний позволяет лишь приблизительно определить причины гибели людей в результате острого переохлаждения в воде. Ни эксперименты на животных, ни опыты с привлечением добровольцев, ни патоморфологические исследования трупов погибших при кораблекрушениях не могут дать исчерпывающую информацию о механизмах структурно-функциональных нарушений в организме при акцидентном переохлаждении: в последнем случае переохлаждение человека наступает в условиях, исключающих получение объективной информации о динамике вызываемых холодом нарушений.

Время выживания людей в ледяной воде (Табл. 32.2) зависит от их индивидуальной чувствительности к холоду, психоэмоционального состояния, физической подготовки, характера движения на воде и т.п. Имеются данные, что при температуре воды 15⁰С во время катастроф около 50% людей гибнет в среднем за 3 часа 15 минут, около 50% - через 1 час 20 минут – 2 часа, и лишь некоторые сохраняют сознание и борются до 5 часов. В морской воде с температурой 1,1⁰С человек может прожить менее часа, а нахождение в течение часа в воде с температурой 4,4⁰С приводит к гибели 50% людей. Проведенные на добровольцах исследования показали, что никто из испытуемых не смог плавать в воде с температурой 4,7⁰С более 15 минут, а один из испытуемых уже через 1,5 минуты не смог самостоятельно добраться до края бассейна, находившегося от него на расстоянии 1 м. Таким образом, попадающий в ледяную воду человек может утонуть просто из-за отказа мышц.

Таблица 32.2. Время выживания и время спасения потерпевших бедствие людей в зависимости от температуры воды

Температура воды, °С	Время выживания или безопасно допустимое время до потери сознания, ч	Время спасения или максимально допустимое время до наступления смерти, ч
25 – 26	18 – 24	50 – 80 (72)
20 – 21	3 – 7	30 (до 60)
15 – 15,5	2 – 4	6 – 9 (до 7)
10	0,5 – 1	1 – 2 (3)
5	0,5 – 1	1 – 2 (1)
2,5	0,5 – 1	1 – 2 (0,5)
0	0,25	0,25 – 0,5 (0,25)

Примечание. В скобках – нормативы, принятые в 1975 году на Лондонском симпозиуме по вопросам спасения людей, потерпевших бедствие на море.

Итак, понижение температуры тела ниже физиологического минимума приводит к нарушению функций головного мозга, скелетных мышц, сердца. Признаки переохлаждения организма человека появляются в определенной последовательности, в зависимости от понижения температуры внутренней среды организма.

Мышечная дрожь появляется при снижении температуры уже до 36°C. Дрожь – асинхронное сокращение мышечных волокон – представляет собой экстренный способ в поддержании температуры организма. Она быстро нарастает до максимума и продолжается в течение 20–30 минут, а затем постепенно угасает. При этом любые движения начинают сопровождаться болью в мышцах. Когда ректальная температура достигнет примерно 35°C, возникают нарушения функций мозга. Появляются сонливость, безразличие, ложное ощущение комфорта. Когда температура тела понижается до 32–31°C, сознание постепенно угасает. При падении ее до 29–28°C прекращаются дыхание и сердцебиение.

Примерные сроки выживания и спасения людей указаны в таблице 32.2. Опасного для жизни охлаждения не происходит в воде с температурой 33°C, поэтому пребывание в ней практически не ограничено.

Интенсивное переохлаждение организма человека резко стимулирует обменные процессы. Организм человека при этом быстрее, чем в обычных условиях воздушной среды, расходует легкоусвояемые энергетические субстраты – углеводы и свободные жирные кислоты. Гипергликемия (повышение количества сахара в крови), развивающаяся в результате стресса, в фазе компенсации по мере истощения энергетических ресурсов сменяется нарастающей гипогликемией (снижение концентрации глюкозы в крови). Энергетические ресурсы практически не успевают израсходоваться лишь в случаях гибели от холодового шока. При остром охлаждении в воде наблюдаются быстрое развитие брадикардии (уменьшение частоты сердечных сокращений), а также нарушение ритма и глубины дыхания.

На фоне большого кислородного запроса организма, связанного с активизацией терморегуляторного метаболизма, эти изменения со стороны дыхательной и сердечно-сосудистой систем существенно снижают уровень оксигенации крови (насыщение кислородом артериальной крови) и тем самым ускоряют развитие гипоксии (снижение содержания кислорода в крови) в организме. В результате сильного раздражения холодовых рецепторов кожи, внезапное действие холодной воды может вызвать расстройство дыхания (вплоть до удушья) и сердечного ритма (вплоть до остановки).

Вызывая быстрое снижение температуры кожи, особенно конечностей, холодная вода обуславливает потерю тактильной (кожной) и болевой чувствительности, а также резкое снижение мышечной силы. Человек уже через 1–2 минуты нахождения в холодной воде (ниже 10°C) не способен самостоятельно забраться на спасательную шлюпку.

При попадании в холодную воду нарушаются функции нервной системы, сердца, а также сосудодвигательных центров спинного мозга и самих кровеносных сосудов. В итоге это ведет к быстрому истощению функциональных возможностей ЦНС и сердечно-сосудистой системы. Поэтому гибель людей, находящихся в очень холодной воде, наступает чаще всего не от остановки дыхания, а от острой сердечной недостаточности, нередко возникающей на фоне гипогликемической комы и потери сознания. Все перечисленное в значительной степени осложняет спасение человека.

32.6.3 Холодовой шок

Смерть может настигнуть человека, оказавшегося в холодной воде, гораздо раньше, чем возникнет общее переохлаждение организма. Причиной смерти в таком случае будет быстрое развитие *холодового шока*. Очень холодная вода выступает как сильный термический раздражитель, вызывающий сосудистый коллапс, резкое ослабление кровообращения, а также может наблюдаться внезапная остановка сердца и дыхания. При этом человек, попав в холодную воду, сразу теряет сознание и тонет, не предпринимая никаких действий к своему спасению.

При кораблекрушениях время выживания в воде может быть существенно ограничено *холодовым шоком*. Причиной преждевременной гибели людей может быть потеря сознания в воде. Потеря сознания может иметь место и при контакте даже с не очень холодной водой после перегрева на солнце. Вода, выступая как сильно воздействующий фактор, может вызывать сосудистый дисбаланс, приводя к т.н. холодовому торможению в ЦНС, нарушению дыхания и сердечной деятельности.

Таким образом, острое внезапное охлаждение может заканчиваться гибелью человека в основном по трем основным причинам:

- 1) отказ мышц («физиологическая ампутация»);
- 2) «холодовой шок», приводящий к потере сознания, остановке сердца и дыхания;
- 3) острая глубокая гипотермия и быстрое нарушение функций ЦНС, сердечно-сосудистой системы, дыхательной системы и мышечной системы.

Степень переохлаждения организма и тяжесть клинического состояния зависит от длительности действия холодового фактора, среды охлаждения и ее температуры (см. разделы 34.2, 34.3). Переохлаждение организма является следствием нарушения температурного гомеостаза и вызывает изменение структуры и функции практически всех жизненно важных органов. Этим изменениям способствуют и сосудистые реакции. Лимитирующими переохлаждение факторами являются: состояние энергопродуцирующего обмена в организме, теплоизолирующие свойства подкожного жира, физическое состояние и активность человека, его психическое состояние и др.

32.6.4 Устойчивость человека к острому переохлаждению

Устойчивость к охлаждающему действию воды очень индивидуальна и зависит от ряда причин: а) температуры воды, б) физического состояния человека; в) наличия одежды, г) времени пребывания в воде, д) физической активности.

Известны случаи поразительной индивидуальной устойчивости человека к нахождению в ледяной воде. Описан случай, когда моряк продержался несколько часов в воде Берингова моря с температурой, близкой к точке замерзания, при 10-балльном шторме и морозе минус 21 градус. Он был спасен и выжил, что является уникальным случаем в истории катастроф на море. В 1986 году ирландскому рыбаку удалось проплыть 5 км до спасительного берега за 5 часов при температуре моря 5°C. 23-летний рыбак был ростом 195 см, весил 125 кг и одет только в рубашку и джинсы. Поражают сообщения и о некоторых случаях во время Второй мировой войны. Матрос, находясь в воде с температурой 8°C, за несколько часов преодолел расстояние 5 км, а другой моряк в воде с температурой 7°C за 9 часов преодолел расстояние 10 км.

При морских катастрофах человек с температурой тела 28-30°C выживает редко и погибает в ходе реанимации. Охлаждение тела до температур 22-28°C, как правило, несовместимо с жизнью, хотя и имеются данные о способности человеческого организма к самостоятельному восстановлению физиологических функций после снижения ректальной температуры даже до 18°C.

Установлено, что устойчивость к гипотермии выше у молодых, физически развитых людей с выраженным подкожно-жировым слоем, а также у спортсменов, тренированных к плаванию в холодной воде. В 1987 году 30-летняя американская спортсменка Л. Кокс переплыла самый холодный Берингов пролив. Она преодолела 7 км, затратив на это 2 часа 50 минут в воде, имеющей температуру всего 7°C! В 1988 году она вновь поставила рекорд. За 4 часа 18 минут она проплыла по озеру Байкал почти 16 км при температуре воды 9-10°C.

Представленные факты свидетельствуют о наличии у человека потенциальных возможностей к преодолению экстремального действия холода и о возможности развития таких способностей. Вместе с тем, этот феномен все еще требует всестороннего изучения.

Рекомендуемая литература:

1. Акимов, Г.А., Алишев Н.В., Бернштейн В.А., Буков В.А. Общее охлаждение организма. – М. Медицина, 1977. – 184 с.
2. Прохоров Г.Г., Беляев А.М., Прохоров Д.Г. Основы клинической криомедицины. – СПб.: Питер, 2017, 608 с.
3. Сизоненко В.А. Холодовая травма. – Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 324 с.

4. Майстрах Е.В. Физиология острого охлаждения организмов. В кн. Физиология терморегуляции. Л.: Наука. 1984. 181-202с.

Глава 33. Отморожение

33.1. Поражение холодом, локальная холодовая травма (отморожение). Факторы, способствующие развитию отморожений. 33.2. Классификация и проявления отморожений. 33.3. Патогенез отморожений. Теория непосредственного воздействия низких температур на ткани. Нервно-рефлекторная теория. Теория местного нарушения кровообращения. Нейрогуморальная теория. 33.4. Репарация тканей при локальной холодовой травме. 33.4.1. Фазы раневого процесса при отморожениях. Фаза воспаления. Фаза развития некроза и его отграничения. Фаза рубцевания и эпителизации ран. 33.4.2. Особенности процессов деструкции и репарации при контактных отморожениях. 33.5. Первая помощь и лечение при отморожениях. 33.5.1. Первая помощь пострадавшим с отморожениями. 33.5.2. Лечение отморожений. 33.6. Профилактика локальной холодовой травмы.

33.1. Поражение холодом, локальная холодовая травма (отморожение)

Воздействие холода на организм встречается часто и может быть связано как с погодными условиями или несчастными случаями (инцидентное), так и с медицинскими воздействиями.

В структуре острого поражения холодом можно выделить:

- *общее охлаждение («замерзание»);*
- *отморожение;*
- *сочетанную холодовую травму (сочетание общего охлаждения и отморожения).*

Патологические эффекты *общего охлаждения* реализуются за счет потери тепла и снижения температуры гомойотермного ядра организма, включающего в свой состав головной мозг, внутренние органы грудной и брюшной полостей. В конечном итоге, продолжающееся снижение температуры «ядра» (гипотермия) приводит к развитию полиорганной недостаточности и смерти.

Отморожение представляет собой локальную холодовую травму, возникает при местном воздействии холода, приводящему к длительному понижению температуры частей тела с повреждением анатомических структур, вплоть до омертвления клеток и тканей.

Как правило, отморожение возникает на открытых участках тела: пальцы конечностей, нос, щеки и уши. При этом чаще всего локальной холодовой травме подвергаются пальцы. Это связано с тем, что конечности служат эффекторами физической терморегуляции в силу большого приспособительного диапазона изменения в них кровообращения. Периферические отделы конечностей в сравнении с другими областями более подвержены действию холода, в них быстрее развиваются гемодинамические нарушения. Тяжесть развивающихся клинических проявлений зависит от интенсивности и продолжительности охлаждения, а также от степени теплозащиты организма.

Факторы, способствующие развитию отморожений.

1. Факторы, способствующие повышению теплоотдачи организмом (например, повышенная влажность, сильный ветер, низкая температура).
2. Факторы, препятствующие притоку тепла за счет нарушения кровообращения в тканях (например, наложение жгута для остановки кровотечения, сосудистая патология, невозможность активных движений, тесная обувь).
3. Факторы, понижающие общую сопротивляемость организма и нарушающие естественную терморегуляцию (например, ранения, кровопотеря, острые инфекционные заболевания, стрессовые состояния, истощение).
4. Факторы, снижающие местную сопротивляемость тканей (например, ранее перенесенные отморожения, трофические расстройства).

33.2. Классификация и проявления отморожений

Существующие подходы к классификации локальной холодовой травмы построены на различных принципах. Можно выделить классификации, основанные на интенсивности, продолжительности, кратности холодового воздействия и условиях, в которых происходит охлаждение, а также классификации, построенные на клинических проявлениях, возникающих после патологического влияния холода. Выбор основания для классификации зависит от того, какой аспект данной проблемы рассматривается в каждой конкретной ситуации.

В медицинской практике общепринятой является *международная классификация болезней (МКБ)*. В соответствии с действующей в настоящее время МКБ-10 (классификация 10-го пересмотра) выделяют:

- воздействие чрезмерно низкой природной температуры;
- поверхностное обморожение;
- обморожение с некрозом тканей;
- обморожение, захватывающее несколько областей тела, и неуточненное обморожение.

По силе и форме охлаждения локальную холодовую травму можно классифицировать на три группы.

1. Отморожения, возникающие в результате влияния умеренно низкой температуры, или температуры около 0°C.
2. Отморожения, возникающие в результате действия температуры ниже минус 30°C.
3. Контактные отморожения.

В силу климатических условий, первая группа отморожений встречается наиболее часто. Обморожения второй группы достаточно редки, поскольку контакт человека со столь низкими температурами распространен не так широко как с температурами первой группы. Кроме того, к температурами ниже минус 30°C люди относятся более серьезно, реже

пренебрегают правилами техники безопасности. Помимо несчастных случаев, отморожения этой группы возникают после использования низких температур в медицинской практике, например, в результате распыления жидкого азота на кожу при лечении дерматологических заболеваний.

Контактные отморожения возникают при соприкосновении с сильно охлажденными предметами, как правило, металлическими, и встречаются редко. К указанной группе отморожений относится локальная холодовая травма, возникающая при выполнении криодеструкции патологических образований в хирургической практике.

В клинико-морфологической картине отморожений выделяют следующие периоды.

Дореактивный период – от момента получения травмы до полного согревания (восстановления тканевой температуры). В этот период симптоматика скудная. Пострадавшие жалуются на чувство холода, онемение или полную потерю чувствительности пострадавшей области.

Ранний реактивный период начинается от момента согревания до конца вторых суток после холодовой травмы. Начало реактивного периода характеризуется появлением клинических признаков отморожения. Клинико-морфологические проявления в течение этого периода связаны с восстановлением кровоснабжения тканей после прекращения действия холодового фактора и характеризуются развитием отека, болевой реакции, клиники токсемии (проявлений интоксикации организма продуктами распада пораженных и некротизированных тканей). Выраженность указанных проявлений зависит от тяжести холодовой травмы, то есть от глубины и распространенности поражения тканей. Нарушения чувствительности варьируют от парестезии (ощущения онемения, покалывания, «ползания мурашек») до анестезии (уменьшения чувствительности, вплоть до полной ее потери). Кожные покровы становятся цианотичными, иногда гиперемизированными. Для более тяжелых повреждений характерно появление пузырей с белесоватым или геморрагическим содержимым.

Поздний реактивный период (3-10 суток) начинается с момента появления первых признаков некроза до полного его отграничения от здоровых тканей, то есть формирования демаркационного вала. Клинические проявления в этот период зависят от тяжести повреждения тканей и особенностей протекания раннего реактивного периода.

Восстановительный период характеризуется активными процессами репарации (от лат. reparatio – восстановление) в зоне отморожения, включает в себя стадию развития грануляций и эпителизации кожного дефекта (с 15-х суток до полного восстановления кожного покрова). Клинически этот период характеризуется остаточной симптоматикой, которая зависит от выраженности восстановительных процессов.

Период отдаленных последствий. Клиническая картина этого периода определяется завершенностью репаративных процессов, что в свою очередь

зависит от тяжести холодового повреждения и эффективности проведенного лечения.

По глубине поражения тканей отморожения классифицируют на 4 степени.

I степень – морфологические изменения в поверхностных слоях кожи обратимы. После согревания кожа отмороженной области синюшная, нередко с багровым оттенком, возможен небольшой отёк, мраморность окраски. Отморожения I степени проходят через 5-7 дней консервативного лечения, при этом отёк уходит полностью, кожа приобретает нормальную окраску. Ненадолго остаётся зуд, цианоз, повышенная чувствительность к холоду.

II степень – граница омертвения проходит на уровне верхней части сосочкового слоя, ростковый слой кожи не повреждён. Сопровождается образованием пузырей, наполненных прозрачной серозной жидкостью (иногда через несколько дней после согревания). Дном пузыря служит сосочковый слой кожи, представленный поверхностью розового или бледно-красного цвета, чувствительной к механическому раздражению. В течение 1-2 недель консервативного лечения наступает полная эпителизация раневых поверхностей. Остаточные проявления такие же, как и при отморожениях I степени.

III степень – некроз захватывает всю толщу кожи. Кожа мертвенно-бледная или сине-багровая, выражен отёк тканей. Пузыри наполнены геморрагической жидкостью, дно пузырей нечувствительно к механическому раздражению (например, уколу иглой), представлено нежизнеспособным сосочковым слоем кожи. Заживление происходит путём развития грануляций и рубцевания. Потерянные ногти нередко отрастают деформированными. Обширные раневые дефекты нуждаются в пластическом закрытии аутодермотрансплантатами.

IV степень – граница некроза включает кожу, подлежащие ткани, кости, суставы. Возникает при наиболее длительном периоде локальной гипотермии. Через 8-10 дней после холодовой травмы развивается сухая гангрена пальцев рук или ног и влажная гангрена проксимально расположенных участков.

Демаркационная линия появляется к концу 2-й – началу 3-й недели. Процесс самопроизвольного отторжения некротизированных тканей занимает несколько месяцев.

При отморожениях *III–IV степени* различают четыре зоны патологических изменений:

- тотального некроза;
- необратимых дегенеративных изменений (где впоследствии могут возникать трофические язвы и изъязвляющиеся рубцы);
- обратимых дегенеративных процессов;
- восходящих патологических процессов.

В последних двух зонах возможно развитие стойких сосудистых и нервно-трофических расстройств.

33.3. Патогенез отморожений

Патогенез локальной холодовой травмы сложен и до конца не выяснен. На сегодняшний день можно выделить 4 основные теории. Каждая из них подтверждена экспериментальными данными и клиническими наблюдениями, тем не менее, все они имеют свои сильные и слабые стороны. Другими словами, единой теории, объясняющей все многообразие проявлений локальной холодовой травмы при разной силе и форме охлаждения, не существует.

Теория непосредственного воздействия низких температур на ткани. В соответствии с указанной теорией, некроз тканей наступает в процессе их охлаждения (замораживания) и отогрева (оттаивания). Гибель тканей, главным образом, связана с механическим повреждением клеток внутри- и внеклеточными кристаллами льда и развитием осмотического шока, вызванного электролитными нарушениями («эффектами раствора»). Кроме того, при охлаждении и отогреве изменяется состояние фосфолипидов: из жидкокристаллического оно переходит в кристаллическое, что в значительной степени нарушает целостность и функцию биологических мембран. Преобладание того или иного механизма зависит от скорости и конечной температуры охлаждения.

Теория непосредственного воздействия низких температур на ткани имеет ограниченное использование, поскольку применима к ситуациям с развитием оледенения тканей. Образование льда в тканях редко встречается при инцидентных отморожениях и, как правило, связано с локальной холодовой травмой при выполнении криохирургических вмешательств.

Нервно-рефлекторная теория. В рамках этой теории возрастание тонуса сосудов и гемодинамические сдвиги при холодовой травме объясняют выраженной активацией симпатoadреналовой системы, в результате чего происходит повышенный выброс в общий кровоток прессорных веществ. Острое охлаждение вызывает резкое раздражение рецепторов, расположенных в соответствующей зоне. Афферентная (восходящая) импульсация, доходя до таламуса, вызывают ответную реакцию в виде выброса катехоламинов и ацетилхолина. Повышение уровня катехоламинов в крови ведёт к спазму сосудов, что значительно нарушает циркуляцию крови, повышает потребность клеток в кислороде и увеличивает их чувствительность к гипоксии. На уровне корковых центров афферентная импульсация вызывает такие сознательные ощущения как боль и страх, которые, в свою очередь, оказывают существенное влияние, как на вегетативные реакции, так и на поведение пострадавшего. Подтверждением важности роли описанных механизмов при остром локальном охлаждении является зависимость течения отморожений от функционального состояния

центральной нервной системы и лабильности вегетативных реакций пострадавшего.

Теория местного нарушения кровообращения. В рамках указанной теории, ведущую роль в патологическом влиянии холода при местной холодовой травме отводят сосудистым нарушениям в зоне поражения, в результате чего и происходит некроз тканей.

Острое охлаждение покровных тканей вызывает рефлекторный спазм сосудов, который сменяется кратковременным их расширением, а затем вновь спазмом, вследствие чего нарушается приток крови к периферическим тканям. При действии температуры ниже минус 30°C первичный спазм оставался на всё время действия холода. Биологический смысл такой сосудистой реакции обусловлен необходимостью отграничения «холодных» участков «оболочки» от общей системы гемодинамики с целью предотвращения снижения температуры «ядра» и развития гипотермии. Кратковременное охлаждение вызывает спазм только поверхностных сосудов. Увеличение времени охлаждения может привести к длительному спазму всех артериальных сосудов «оболочки» в зоне охлаждения, вплоть до нарушения проходимости магистральных сосудов при отморожениях конечностей.

Спазм сосудов сопровождается расстройствами системы микроциркуляции, которая включает в себя артериолы, прекапилляры, капилляры, посткапилляры, венулы и артериоло-венулярные шунты (которые в норме закрыты). При холодовой травме происходит сокращение артериол, прекапилляров и соответствующих мелких вен одновременно с сокращением прекапиллярного сфинктера. Таким образом, создаются условия для открытия артериоло-венулярных шунтов и сброса крови минуя капилляры, что приводит к развитию тканевой ишемии (Рис. 31.1).



Рис. 33.1. Схема нарушения кровотока в результате открытия артериоло-венулярных шунтов.

Другим важным механизмом нарушения кровообращения в тканях при локальной холодовой травме является тромбоз сосудов. Пусковым механизмом нарушения баланса свертывающей и противосвертывающей систем крови является появление в сосудистом русле большого количества

тканевых факторов свертывания крови, непосредственное повреждение эндотелиальной выстилки и развитие эндотелиальной дисфункции.

Факторы, способствующие тромбообразованию:

- замедление скорости кровотока, вызванное нарушением регуляции сосудистого тонуса;
- повышение вязкости крови за счет выхода из сосудистого русла ее жидкой части при развитии отека тканей, возникающего вследствие повышения сосудистой проницаемости;
- сладж-синдром (феномен, характеризующийся адгезией, агрегацией и агглютинацией форменных элементов крови);
- холодовой гемолиз эритроцитов.

Нейрогуморальная теория. Патологическое влияние на ткани локального охлаждения эта теория объясняет с точки зрения взаимосвязанных процессов нервной и гуморальной регуляции на системном и местном уровнях. Нейрогуморальная теория появилась позже других и, по сути, объединяет различные звенья патогенеза локальной холодовой травмы, описанные в рамках других теорий. При этом отморожение рассматривается как следствие влияния комплекса факторов, действующих одновременно и последовательно и обладающих различной патогенетической значимостью. Такими факторами являются сосудистый спазм, боль, токсемия, повышение содержания в крови адреналина, нарушение интракапиллярного кровообращения и другие патофизиологические механизмы.

Комплекс нейрогуморальных влияний, реализуемый через центральные и местные механизмы регуляции, в конечном итоге, приводит к возникновению в тканях патоморфологических проявлений локальной холодовой травмы. Пусковым механизмом в формировании нарушений системы гемостаза (функция которой заключается в сохранении жидкого состояния крови, остановке кровотечений при повреждениях стенок сосудов и растворении тромбов), развитии воспалительной реакции является повреждение клеток эндотелия сосудов и изменение их функциональной активности. В результате действия гипоксии в тканях накапливаются гистамин, серотонин, кинины и другие биологически активные вещества. Гистамин повышает проницаемость капилляров, вызывает резкое набухание их стенок, сужение просвета, дилатацию артериол. Серотонин обладает способностью повреждать эндотелий особенно, в венах, способствуя образованию тромбов. Всё это приводит к значительному нарушению местной микроциркуляции и развитию тканевой гипоксии. Недостаточное поступление кислорода в клетки приводит к накоплению пировиноградной и молочной кислот, что вызывает ацидоз в тканях, который, в свою очередь, способствует развитию метаболических нарушений.

Таким образом, в развитии отморожения замыкается патологический круг, где каждое звено патогенеза усиливается с дальнейшим течением патологического процесса. Вазоконстрикция, агрегация форменных элементов крови и изменение ее реологических свойств (биофизических

особенностей крови как вязкой жидкости, определяющих ее текучесть), тромбообразование, нарушения микроциркуляции, прогрессирующая гипоксия тканей, развитие воспаления эндотелия артерий (эндартериита) приводит к сублетальному (обратимому) и летальному (необратимому) повреждению клеток (Рис. 33.2).



Рис. 33.2. Патологический круг в развитии отморожения.

Повреждение и гибель клеток, в свою очередь, сопровождаются высвобождением медиаторов воспаления, способствующих дальнейшему повреждению клеток и увеличению зоны некроза тканей.

33.4. Репарация тканей при локальной холодовой травме

33.4.1. Фазы раневого процесса при отморожениях

Местное поражение холодом кожи и глубже лежащих тканей сопровождается нарушением целостности кожного покрова, то есть приводит к возникновению раны. Учитывая тот факт, что на коже всегда присутствует микрофлора, холодовые раны, полученные в результате несчастных случаев (инцидентные), следует считать первично инфицированными.

В зоне отморожения вне зависимости от тяжести холодовой травмы можно выделить три фазы течения, которые, по сути, являются фазами раневого процесса: *фаза воспаления, фаза развития некроза и его отграничения, фаза рубцевания и эпителизации ран*. При этом временные интервалы указанных фаз нежесткие и перекрываются.

Фаза воспаления. Для этой фазы характерны классические признаки воспаления: боль, отек, покраснение и местное повышение температуры, нарушение функции пораженной конечности. Отличительной чертой фазы воспаления при локальной холодовой травме является то, что ее проявления

развиваются не сразу же после прекращения охлаждения, а только после согревания тканей. Боль – это первое проявление отморожения. Выраженность болевого синдрома может быть значительной. При глубоких и обширных отморожениях сильная боль уже сама по себе является важным патофизиологическим фактором возникновения шока. Отек тканей в зоне локальной холодовой травмы возникает в результате нарушений в микроциркуляторном русле. Выраженность отека играет существенную роль в развитии отморожения, поскольку приводит к сдавлению кровеносных и лимфатических сосудов, в результате чего усугубляются трофические нарушения в тканях вплоть до развития некроза. Кроме того, отек способствует накоплению в тканях пострадавшей зоны токсических продуктов с последующим их поступлением в системный кровоток и развитием токсемии. Токсемия появляется сразу же после восстановления кровотока в зоне отморожения и прекращается только после формирования демаркационного вала между погибшими и жизнеспособными тканями. Покраснение и местное повышение температуры кожи возникают как проявления воспаления. Причем воспалительный процесс может быть как асептическим, так и связанным с развитием инфекции. Нарушение функции пораженных пальцев или кисти в наибольшей степени проявляется спустя несколько дней после локальной холодовой травмы, что связано с их анатомическими особенностями.

Фаза развития некроза и его отграничения. Это наиболее продолжительная фаза. Ее длительность зависит не только от силы и интенсивности воздействия холодового агента, но и от выраженности нарушений регионарного кровообращения. Процесс омертвления тканей после отморожений более длительный чем, например, при ожогах. Ткани, имеющие летальные повреждения, погибают сразу. В зоне сублетального повреждения ткани могут сохранить жизнеспособность или погибнуть в различные сроки после согревания. Нарушение целостности кожных покровов и наличие поврежденных тканей создают условия для развития инфекции. Инфекционный процесс, в свою очередь, сопровождается гибелью тканей и может привести к потере частей конечностей, развитию системной воспалительной реакции.

Фаза рубцевания и эпителизации ран. Эта фаза является результирующей двух предыдущих фаз локальной холодовой травмы и определяют косметический, а иногда и функциональный исход отморожения. Эпителизации кожного дефекта предшествует развитие грануляционной ткани. Грануляции представляют собой молодую соединительную ткань, которая замещает дефект тканей после очищения раны от некротических масс.

33.4.2. Особенности процессов деструкции и репарации при контактных отморожениях.

Процессы репарации при контактных отморожениях привлекают особое внимание в связи с возможностью контролируемой криодеструкции тканей. Криодеструкция патологических образований кожи имеет давнюю историю и, на сегодняшний день, является общепризнанным методом хирургического лечения, как в медицинской, так и в ветеринарной практике. Замораживание осуществляется при помощи специального инструментария, обеспечивающего быстрое охлаждение тканей до низких температур, лежащих за границами криоустойчивости клеток. Поскольку между зоной охлаждения и окружающими тканями происходит непрерывный теплообмен, для криодеструкции обычно применяют инструменты, конструкция которых обеспечивает поддержание стабильно низкой температуры криоаппликатора (часть криоинструмента, которая контактирует с кожей) в процессе работы. Очевидно, что в процессе замораживания невозможно обеспечить повреждение только патологической ткани. Например, криодеструкция злокачественной опухоли неминуемо сопровождается гибелью и здоровых клеток окружающих тканей. Таким образом, понимание процессов криоповреждения и последующей репарации важно как с точки зрения обеспечения гарантированной гибели патологической ткани, так и предотвращения избыточной травматизации нормальных клеток.

При контактных отморожениях гибель тканей происходит как в результате непосредственного действия патогенного фактора (низких температур), так и за счет повреждения структурных компонентов тканей в силу ишемических нарушений. Интенсивность повреждения клеток в процессе криовоздействия зависит от скорости, длительности и конечной температуры охлаждения тканей. Наиболее выраженная деструкция тканей наблюдается в тканях, непосредственно контактировавших с криоаппликатором. Чем дальше ткани расположены от аппликатора, тем медленнее они охлаждаются, выше их конечная температура и, соответственно, менее выражено первичное повреждение тканей.

В первую очередь, деструктивное влияние замораживания реализуется за счет механического повреждения тканей (пучение, смещение, образование трещин), по мере продвижения ледяного фронта. Кроме того, в процессе кристаллизации и рекристаллизации происходит травмирование клеток и клеточных органелл острыми краями кристаллов льда, возникают «эффекты растворов», связанные с повышением концентрации растворенных веществ, пропорциональным количеству образованного льда. Ишемическое повреждение тканей обусловлено циркуляторными нарушениями преимущественно в веноулярном отделе гемоциркуляторного русла, которые характеризуются полным разрушением мелких сосудов, спазмом и последующим парезом сосудов среднего диаметра с развитием реологических нарушений в виде замедления и прекращения тока крови (стаза), агрегации форменных элементов крови и тромбообразования.

Блокада микрогемодинамики обуславливает нарастание дисметаболических процессов и развитие вторичных деструктивных изменений в тканях. Таким образом, преимущественный механизм криоповреждения кожи и нижележащих тканей, непосредственно под криоаппликатором и на различном расстоянии от него, различается.

В пограничных с зоной некроза тканях (зона сублетального повреждения клеток) дисциркуляторные нарушения обуславливают дистрофические изменения тканей с развитием очаговых стромальных некрозов дермы, мышечных и нервных волокон. В очагах поверхностных дефектов кожи происходит постепенное заполнение их грануляционной тканью с локальной компенсаторной гиперплазией эпидермиса. Эпидермизация раневого дефекта осуществляется за счет усиления пролиферативной и синтетической активности клеток базального слоя и ускорения их миграции вдоль базальной мембраны. Дистрофические процессы (гиперкератоз, паракератоз, вакуольная дистрофия, спонгиоз) связаны с нарушением трофики новообразованного эпидермиса вследствие дисциркуляторных изменений в подлежащих тканях и несостоятельностью его базальной мембраны.

Таким образом, в зоне проведения криодеструкции формируется крионекроз, который постепенно рассасывается, замещаясь грануляционной тканью, а на поверхности в большей мере отторгается. В первые часы, а иногда и минуты после криовоздействия возникает довольно выраженная отечность. Отек играет важную роль в обеспечении гемостатического эффекта криодеструкции. Окружающие ткани сдавливаются отеком, за счет этого кровообращение в разрушаемом участке быстро и существенно ограничивается. Промороженный участок становится темно-бурым, а порой более светлым. Темно-бурая окраска – это визуальное проявление стаза и образования тромбов в кровеносных сосудах. Заживление криохирургических ран происходит безболезненно, а если обеспечено отсутствие механического травмирования, то и бескровно. При соблюдении правил элементарного ухода за раной нагноений не бывает.

Одной из особенностей репарации после криодеструкции является длительность процесса заживления ран. Обычно через несколько дней крионекроз превращается в сухую корочку и отторгается в среднем через 2-3 недели, в зависимости от размеров разрушенного участка. Все это время крионекроз выполняет роль естественной повязки, прикрывает собой рану. Эпителий постепенно подрастает под некротическую корочку. Важно, что восстановление целостности тканей, как правило, происходит за счёт функционально полноценных клеток, специфичных для данной анатомической зоны. Отторжение крионекроза происходит по мере наползания эпителия с краев раневого дефекта. Окончательное заживление раны после криодеструкции злокачественной опухоли может затягиваться на несколько месяцев. Такая ситуация связана с тем, что ткани, погибшие в результате криовоздействия, не удаляются, а остаются «на месте». Очищение

раны от некротических тканей происходит естественным путем, то есть силами организма.

Тем не менее, существенные сроки репарации вполне окупаются качеством заживления. В первые 1-2 месяца после отторжения крионекроза на коже еще бывает заметным участок бывшей локализации опухоли, так как это нежная, тонкая, молодая, незагорелая кожа. В зависимости от особенностей пигментного обмена, регенерировавший эпидермис может остаться менее пигментированным. После криохирургического лечения небольших новообразований 1-2 мм в диаметре, как правило, никаких следов нет уже через 1-1,5 месяца. Еще одним важным преимуществом криохирургического лечения является пластичность заживления ран. Таким термином обозначают то, что, после отторжения крионекроза дефект, углубление на его месте, оказывается незначительным либо отсутствует, несмотря на то, что в процессе криовоздействия на патологическое образование происходит охлаждение тканей на существенную глубину. Подвергнутый криодеструкции объем тканей не оказывается просто механически изъят из организма с образованием кратера, как при традиционном хирургическом лечении, а за счет длительности заживления восполняется такими же, специфичными для каждого конкретного участка тканями. Это очень важное преимущество криохирургического метода лечения с точки зрения косметичности и сохранения функциональной полноценности.

33.5. Первая помощь и лечение при отморожениях

33.5.1. Первая помощь пострадавшим с отморожениями.

Задачами оказания первой помощи пострадавшим с локальной холодовой травмой является прекращение воздействия холодового фактора и создание условий для согревания поражённых частей тела. Скорейшее и правильное оказание первой помощи пострадавшим имеет важнейшее значение, поскольку напрямую влияет на тяжесть и распространенность повреждения тканей. Грамотное проведение мероприятий по восстановлению кровообращения в пораженных участках, на этапе доврачебной помощи, может снизить уровень ампутации или даже предотвратить ампутацию и спасти конечность.

В первую очередь, нужно принять меры для прекращения местного и общего охлаждения и создать условия для восстановления кровоснабжения в зоне отморожения. Практические рекомендации по диагностике и оказанию первой помощи, пострадавшим с локальной холодовой травмой представлены в табл. 33.1.

При первых признаках отморожения необходимо доставить пострадавшего в ближайшее тёплое помещение, снять промёрзшую обувь, носки, перчатки, переодеть в свободную сухую одежду и обувь. Постепенно согревать сухим теплом (любые теплоизлучатели). При этом необходимо

исключить преждевременное согревание извне, когда пострадавший уже находится в помещении: тепло должно идти «изнутри», за счёт кровообращения. В таких условиях граница потепления тканей постепенно сдвигается к периферии, где циркуляция крови восстанавливается раньше, чем обмен веществ, что предохраняет ткани от ишемии. Очень важно, что снижение температуры в тканях в процессе охлаждения само по себе обладает протекторным действием, снижая активность метаболических процессов в клетках. Быстрое согревание тканей «извне» приводит к повышению активности метаболизма в клетках на фоне резко уменьшенного кровоснабжения. Таким образом, наступает резкое несоответствие между потребностью тканей в кислороде и других необходимых веществах и возможностями их поступления с кровотоком.

Таблица 33.1. Практические рекомендации по диагностике и оказанию первой помощи, пострадавшим с локальной холодовой травмой.

Обморожение	Проявления	Первая помощь
I степень	Чувство жжения, покалывания, зуд в местах поражения, кожные покровы бледные, после согревания покрасневшие, развивается отек конечности.	Доставить пострадавшего в теплое помещение, медленно и постепенно согревать легким массажем, теплыми руками, дыханием, наложить ватно-марлевую повязку. Дать горячее питье, накормить горячей пищей.
II степень	Онемение, похолодание конечности, при согревании зуд, жжение, боль, утрата чувствительности, появление пузырей с прозрачной жидкостью.	Доставить пострадавшего в теплое помещение, наложить теплоизолирующую повязку, зафиксировать пораженную конечность. Дать горячее питье, накормить горячей пищей. Вызвать скорую медицинскую помощь.
III степень	Утрата чувствительности в поражённых участках, боль, пузыри, наполненные кровянистой жидкостью.	
IV степень	Поврежденные участки конечностей резко синюшные с мраморной окраской, отек развивается резко (после согревания). Впоследствии – образование мумифицированных участков.	

Для согревания поражённой области как можно быстрее накладывают теплоизолирующую повязку. Вначале пораженный участок бинтуют, затем чередуют 5-6 слоев марли и ваты (ватин, шерсть, поролон, синтепон) с двух- или трёхкратным прокладыванием между ними компрессной бумаги (полиэтилен, металлическая фольга). Толщина подобной повязки составляет 5-6 см. До наложения повязки никаких манипуляций с отмороженными участками не производят. Повязку на поражённой области оставляют до восстановления чувствительности (на 6-12 ч). После наложения повязки

пораженной конечности нужно придать возвышенное положение для улучшения оттока и уменьшения застойных явлений.

При отморожениях ушных раковин, щёк, носа можно слегка растереть отмороженные участки чистой рукой или мягкой тканью до появления розовой окраски кожи. Широко распространенное заблуждение об эффективности растирания отмороженных участков снегом не соответствует действительности. Такое растирание не только не способствует согреванию, а наоборот, еще больше охлаждает пораженные ткани, температура которых всегда выше температуры снега. Кроме того, при растирании снегом обмороженные участки травмируются мелкими кристаллами льда. Эти микротравмы в последующем могут явиться причиной инфекционных осложнений, в том числе и рожистого воспаления.

Пострадавшего нужно напоить горячим кофе или чаем, накормить горячей пищей, дать 50-100 мл крепкого алкоголя (водка, коньяк). Алкоголь можно принимать только в условиях теплого помещения.

Если нет возможности доставить пострадавшего в тёплое помещение, необходимо принять меры для уменьшения потерь тепла и согревания в имеющихся условиях с использованием подручных средств. Например, перенести пострадавшего в палатку или хотя бы за преграду, защищающую от ветра, дать горячее питье (не алкоголь!), переодеть в сухую, лучше теплую (снятую другим человеком) одежду. Если нет запасной одежды, то нужно укрыть пострадавшего подручными средствами. Пораженную кисть можно согревать теплом тела, поместив под одежду в подмышечную область, на живот, между бедрами пострадавшего или другого человека. Уменьшить потерю тепла пострадавшим можно, прижавшись к нему.

33.5.2. Лечение отморожений

Основные принципы лечения при холодовой травме сводятся к следующему.

1. Мероприятия, направленные на поддержание температуры тела на уровне, свойственном организму (что особенно важно при сочетании локальной холодовой травмы и общего охлаждения).
2. Нормализация функций жизненно важных систем организма и профилактика их нарушений.
3. Восстановление кровообращения в пораженных холодом областях.
4. Профилактика и лечение местных и общих инфекционных и сосудистых осложнений.
5. Обеспечение оптимальных условий для заживления ран.

После доставки пострадавшего в лечебное учреждение продолжают мероприятия, направленные на постепенное согревание тканей «изнутри-наружу». Этого достигают инфузионным системным и регионарным лечением. Применение ультрафиолетового облучения, УВЧ-терапии, инфракрасного облучения и просто тёплого воздуха от вентилятора в первой

фазе раневого процесса при отморожениях III-IV степени способствует переводу влажного некроза в сухой.

В дореактивном или раннем реактивном периодах холодовой травмы целесообразно проведение новокаиновых блокад (вагосимпатических, перинеуральных, проводниковых, футлярных). Блокады способствуют уменьшению болевого синдрома, устранению вазоспазма и уменьшению отёка, создавая тем самым благоприятные условия для нормализации температуры в поражённых тканях, ускорения процессов отторжения некротических масс и регенерации.

Для улучшения кровообращения в поражённых конечностях в течение первой недели после травмы внутривенно вводят препараты, способствующие устранению спазма сосудов, восстановлению микроциркуляции, предупреждению тромбообразования в сосудах малого и крупного диаметра. Терапию продолжают, даже если в течение 2-3 суток не удалось нормализовать температуру и трофику тканей. В данном случае она необходима для сокращения зоны некроза тканей. Большое значение имеет введение препаратов непосредственно в регионарный кровоток отмороженной конечности. Это достигают путём пункции соответствующей магистральной артерии (лучевой, локтевой, плечевой, бедренной).

Пострадавшим, поступившим в лечебное учреждение с уже выраженными признаками гибели тканей, все равно проводят весь комплекс описанных выше лечебно-профилактических мероприятий с целью возможного ограничения степени и масштабов поражения тканей.

У пациентов с отморожениями *I-II степени* проводят туалет ран и накладывают повязки с водорастворимыми антибактериальными кремами. Небольшие пузыри, возникшие при отморожении II степени, можно не трогать, большие пузыри можно опорожнить, надрезав у основания. Перевязки проводят раз в 2-3 дня. При неосложненном течении эпителизация наступает в течение 7-10 суток без каких-либо косметических или функциональных дефектов.

У пациентов с отморожениями *III-IV степени* консервативное лечение позволяет подготовить поражённые участки к операции. Характер применяемых лекарственных средств зависит от фазы раневого процесса. В первой фазе раневого процесса применяют растворы антисептиков, антибактериальные мази на водорастворимой основе, а также препараты с некролитическим действием. Перевязки проводят каждый день. Во второй фазе используют мази на жировой основе. Перевязки проводят через 2-3 дня. В третьей фазе показано применение биогенных стимуляторов.

Тактика хирургического лечения глубоких отморожений направлена на скорейшее удаление нежизнеспособных тканей, предотвращение развития тяжёлых осложнений и максимальное сохранение объёма жизнеспособных тканей. С этой целью применяют некротомию, некрэктомию, ампутацию и пересадки кожных лоскутов.

Осложнения локальной холодовой травмы. Клиническое течение всех степеней и видов отморожений сопровождается развитием местных и общих осложнений.

Большая часть осложнений связана с развитием инфекции, чему способствует наличие омертвевших тканей. К местным воспалительным осложнениям относятся лимфангиты, лимфадениты, тромбофлебиты, флегмоны, абсцессы, рожистое воспаление, артриты, остеомиелиты. Из общих инфекционных осложнений может развиваться интоксикация, пневмония, сепсис. Возможно развитие столбняка, анаэробной инфекции. Осложнения неинфекционной природы возникают вследствие нарушенной трофики тканей, расстройств кровообращения. Из общих осложнений может развиваться миокардио-, нефро- и энцефалопатия. Из местных осложнений могут возникать невриты, эндартерииты, трофические язвы, рубцовые деформации и контрактуры, стойкое повышение холодовой чувствительности.

33.6. Профилактика локальной холодовой травмы

Профилактику отморожений можно определить как комплекс мер, направленных на предотвращение локального охлаждения тканей, достаточного по длительности и интенсивности для их гибели.

Основной причиной локальной холодовой травмы является низкая температура, особенно в ветреную погоду и при высокой влажности. Изменить неблагоприятные метеорологические условия невозможно, однако уменьшить потери тепла в зонах наиболее подверженных отморожению, вполне по силам любому человеку. Подготовленный и правильно экипированный человек может достаточно длительное время не просто находиться в условиях холода, но и успешно выполнять свои профессиональные обязанности без вреда для здоровья. Основное количество случаев обморожений связано с «легкомысленным» отношением к холоду и пренебрежением элементарными правилами поведения на морозе. Подавляющее большинство пострадавших, поступивших в лечебные учреждения, получили отморожения в состоянии алкогольного опьянения. Таким образом, широкое распространение знаний о мерах по предупреждению отморожений, обучение правильному оказанию само- и взаимопомощи пострадавшим – реальный путь сокращения количества случаев холодовой травмы и уменьшения ее тяжести.

Меры, направленные на профилактику локальной холодовой травмы, могут быть *индивидуальными* и *коллективными*.

К индивидуальным мерам профилактики в первую очередь относятся адекватный подбор одежды и обуви, соблюдение правил поведения в неблагоприятных погодных условиях. Для профилактики локальной холодовой травмы рекомендуется:

- предусмотреть возможность сокращения времени пребывания на открытом воздухе.
- перед выходом на мороз принять пищу (желательно горячую);
- исключить употребление спиртного: алкогольное опьянение увеличивает потерю тепла, при этом вызывая субъективное ощущение благополучия;
- не курить на морозе: курение вызывает периферический вазоспазм и способствует нарушению микроциркуляции;
- избегать контакта голой кожи с металлом (кольца, серьги, браслеты и другие украшения);
- носить свободную одежду, отдавая предпочтение нательному белью из натуральных тканей (способных впитывать влагу), верхняя одежда должна быть непромокаемой с капюшоном, носить шарф, шапку, перчатки (при большом морозе варежки мехом внутрь);
- носить просторную обувь (на невысоком удобном каблуке) с меховой стелькой, надевать шерстяные носки;
- в ветреную холодную погоду перед выходом на улицу открытые участки тела смазать жирным защитным кремом, щеки и подбородок следует защитить тканью (например, шарфом);
- избегать длительного неподвижного положения.

Коллективные меры профилактики в основном касаются профессиональной деятельности и регламентируются нормативными документами в соответствии с действующим законодательством. Контроль за соблюдением требований таких нормативных документов возложен на администрацию учреждений и предприятий вне зависимости от формы собственности. Целью коллективных мер профилактики является обеспечение безопасных условий труда. Труд должен быть организован таким образом, чтобы минимизировать неблагоприятное воздействие погодных условий на организм человека. Например, при работе в условиях холода работники должны быть обеспечены приспособлениями для защиты от атмосферных влияний (экраны и навесы для защиты от ветра и дождя), должны иметь возможность обогреться, просушить спецодежду.

Таким образом, отморожение представляет собой локальную термическую травму и возникает при местном воздействии холода. Действие факторов, способствующих развитию отморожений, связано с повышением теплоотдачи, уменьшением притока тепла за счет нарушения кровообращения, понижением общей сопротивляемости организма и местной сопротивляемости тканей, нарушением естественной терморегуляции.

Локальная холодовая травма может быть классифицирована по различным основаниям. В медицинской практике общепринятой является МКБ-10, в соответствии с которой выделяют: воздействие чрезмерно низкой природной температуры; поверхностное отморожение; отморожение с некрозом тканей; отморожение, захватывающее несколько областей тела, и неуточненное отморожение. В клинико-морфологической картине

отморожений выделяют дореактивный, ранний и поздний реактивный периоды, восстановительный период, период отдаленных последствий. По глубине поражения тканей отморожения классифицируют на 4 степени.

Единой теории, объясняющей все многообразие проявлений локальной холодовой травмы при разной силе и форме охлаждения, не существует. Основными теориями являются: теория непосредственного воздействия низких температур на ткани, нервно-рефлекторная, нейрогуморальная теории, теория местного нарушения кровообращения.

В протекании отморожения можно выделить три фазы, которые, по сути, являются фазами раневого процесса: фаза воспаления, фаза развития некроза и его отграничения, фаза рубцевания и эпителизации ран. При этом временные интервалы указанных фаз не жесткие и могут перекрываться. При контактных отморожениях гибель тканей происходит как в результате непосредственного действия низких температур, так и за счет ишемических нарушений. Подвергнутый криодеструкции объем тканей не оказывается механически изъят из организма, а за счет длительности заживления замещается специфичными для конкретного участка тканями.

Скорейшее и правильное оказание первой помощи пострадавшим напрямую влияет на тяжесть и распространенность повреждения тканей. Задачами оказания первой помощи является прекращение воздействия холода и создание условий для согревания поражённых частей тела. Необходимо исключить преждевременное согревание извне: тепло должно идти «изнутри» за счёт кровообращения. Основные принципы лечения при холодовой травме направлены на: поддержание температуры тела на уровне, свойственном организму; нормализацию функций жизненно важных систем организма и профилактику их нарушений; восстановление кровообращения; профилактику и лечение местных и общих инфекционных и сосудистых осложнений; обеспечение оптимальных условий для заживления ран.

Профилактика отморожений – это комплекс мер, направленных на предотвращение локального охлаждения тканей, достаточного для их гибели. К индивидуальным мерам профилактики в первую очередь относятся адекватный подбор одежды и обуви, соблюдение правил поведения в неблагоприятных погодных условиях. Коллективные меры профилактики в основном касаются профессиональной деятельности и регламентируются соответствующими нормативными документами.

Рекомендуемая литература:

1. Грищенко В.И., Сандомирский Б.П. Практическая криомедицина. – К.: Здоров'я, 1987. – 246 с.
2. Котельников В.П. Отморожения. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.
3. Прохоров Г.Г., Беляев А.М., Прохоров Д.Г. Основы клинической криомедицины. – СПб.: Питер, 2017, 608 с.
4. Сизоненко В.А. Холодовая травма. – Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 324 с.

Глава 34. Криохирurgia

34.1. Криохирurgia. Общие сведения. 34.1.1. Определение. 34.1.2. Задачи криохирurgerгии. 34.2. Исторические этапы развития криохирurgerгии. 34.2.1. Эмпирический период. 34.2.2. 1961–1962 гг. Становление криохирurgerгии. 34.2.3. Криохирurgia второй половины XX века. 34.2.4. Криохирurgerгические системы XXI века. 34.3. Криодеструкция. Механизмы повреждения тканей. Преимущества и недостатки криохирurgerгического метода. 34.3.1. Механизмы повреждения тканей при криодеструкции. 34.3.2. Криоиммунология. 34.3.3. Преимущества и недостатки криохирurgerгического метода. 34.3.4. Показания и противопоказания к криохирurgerгическим операциям. 34.4. Криохирurgerгическая аппаратура. 34.4.1. Классификация криогенной аппаратуры. 34.4.2. Требования к современным криохирurgerгическим установкам. 34.4.3. Эндоскопические криохирurgerгические системы. 34.5. Криохирurgia в практической медицине. 34.5.1. Криохирurgerгический метод в нейрохирurgerгии. 34.5.2. Криохирurgia в эндокринологии. 34.5.3. Криохирurgia в офтальмологии. 34.5.4. Криохирurgia в отоларингологии. 34.5.5. Криохирurgia грудной полости. 34.5.6. Криохирurgia в гастроэнтерологии. 34.5.7. Криохирurgia в проктологии. 34.5.8. Криохирurgia в урологии. 34.5.9. Криохирurgia в гинекологии. 34.5.10. Криохирurgia в дерматологии. 34.5.11. Криохирurgia костей и суставов. 34.6. Итоги и перспективы.

34.1. Криохирurgia. Общие сведения

34.1.1. Определение

Криохирurgia (греч. kryos (холод) + хирurgia) – метод хирургического лечения, заключающийся в локальном разрушении патологически измененных участков биологической ткани с помощью низкотемпературных аппаратов.

Цель криохирurgerгии на современном этапе: создание научно-экспериментально-практической базы для внедрения криохирurgerгических методов в полном объеме в практическую медицину с формулированием практических рекомендаций (протоколов лечения) для практических врачей.

Для достижения этой цели необходимо выполнение трех основных задач.

34.1.2. Задачи криохирurgerгии

1. Анализ накопленного опыта работы практических и экспериментальных криохирurgerгов и создание теоретических основ криохирurgerгии.

2. Работа над совершенствованием и изготовлением новых криохирurgerгических аппаратов, способных обеспечивать управляемое криохирurgerгическое воздействие на биологические ткани. Разработка малоинвазивных криохирurgerгических технологий для использования их в эндоскопических системах. Разработка и использование современных температурных датчиков и программного обеспечения в целях

мониторирования теплофизических свойств различных тканей во время оперативных вмешательств.

3. Проведение экспериментальных работ по исследованию влияния низких температур на биологические ткани и организм в целом при различных патологических состояниях. Поиск методов управляемых процессов криодеструкции (прогноз, сведение к минимуму разрушения окружающих тканей).

34.2. Исторические этапы развития криохирургии

Лечебное применение холода известно на протяжении всей истории человечества. Анализируя становление и развитие криохирургии, можно отметить несколько этапов:

1. Эмпирический период.
2. 1961–1962 гг. Становление криохирургии.
3. Криохирургия второй половины XX века.
4. Криохирургические системы XXI века.

34.2.1. Эмпирический период

Древние медики были хорошо осведомлены о способности холода снимать боль и воспаление, снижать температуру тела, повышать сопротивляемость организма к неблагоприятным воздействиям. Холод применялся при лечении ран еще за 3500 лет до новой эры, при лечении инфицированных ран. Древние египтяне, а позже Гиппократ, Гален, и Цельс, и Авиценна знали о болеутоляющих и противовоспалительных свойствах холода, который использовали для лечения инфицированных повреждений, переломов черепа и различных ран, полученных в бою.

Барон Жак-Доминик Ларрей (G.D. deLarrey) (рис. 34.1.), главный хирург армий Наполеона в период войны 1812 г., заметил, что если раненые солдаты долго лежали в снегу, то им можно было безболезненно производить ампутацию поврежденных конечностей.

Широко использовал охлаждение для лечения ран Н.И. Пирогов. «Холод, безусловно, назначается там, где к опухшей горячей и раздраженной ране присоединяется паренхиматозное (капиллярное) кровотечение», — писал выдающийся хирург.

В 1851 г. Джеймс Арнотт (J.Arnett), английский врач, описал применение солевых растворов со льдом (температура около минус 20°C) для криодеструкции прогрессирующих раковых опухолей в доступных местах, что приводило к уменьшению размера новообразований, снижению интенсивности болей и местных кровоизлияний. Практическое использование криохирургии настолько опережало и опережает теоретическое обоснование, что даже на сегодняшний день нет ответов на многие вопросы, связанные с криохирургией и криоиммунологией.



Жан Доминик Ларрей
(1766-1842)



Н.И. Пирогов
(1810-1881)



Джеймс Арнотт
(1797-1883)

Рис. 34.1. Основатели криохирургии 18 -19 столетия.

Первые попытки экспериментального исследования влияния низких температур на функциональное состояние клеток центральной нервной системы можно найти в работах А.Д. Сперанского в 1935 году, в которых он изучал эффекты замораживания ткани коры головного мозга для лечения эпилепсии, что положило начало второму – научному этапу развития криохирургии.

34.2.2. 1961 –1962 гг. Становление криохирургии

Начиная с 1961 года криохирургия, как наука, начала стремительно укреплять свои рубежи в различных отраслях медицины. Развитие научно-технического прогресса (использование жидкого азота в качестве хладагента для криохирургической аппаратуры) способствовало этому толчку и дало возможность использовать низкие температуры в лечебных целях. Впервые в мире в 1961 г. I.S. Cooper (рис. 34.2.) и A.St. Lee разработали технику прецизионной (высокоточной) криохирургии для стереотаксических операций на головном мозге. С помощью современного криохирургического инструмента I.S. Соорег лечил болезнь Паркинсона и другие двигательные нарушения, замораживая таламус, а также считавшиеся неоперабельными опухоли мозга.

Почти одновременно с американскими учеными советский клиницист, профессор Э.И. Кандель заинтересовался возможностями использования сверхнизких температур в нейрохирургии. По его инициативе в начале шестидесятых годов ряд ученых под руководством и при непосредственном участии крупнейшего физика, академика АН СССР А.И. Шальникова создана целая серия криохирургических устройств и аппаратов для практического применения (рис. 34.2.). Эксперименты на животных показали, что криохирургическое воздействие перспективно применять в ряде областей медицины: для разрушения отдельных участков мозга, для деструкции



I.S. Cooper
(1922-1985)



Э.И. Кандель
(1923-1990)



А.И. Шальников
(1905-1986)

Рис. 34.2. Основатели криохирургии 20 столетия.

опухолей, а также патологических (воспалительных) очагов в различных органах человеческого организма.

34.2.3. Криохирургия второй половины XX века

Криохирургия XX века тесно связана с достижениями в сфере физики низких температур, промышленного получения хладагентов, техники и приборостроения.

Развитие физики низких температур на Украине началось после организации в Харькове в 1928 году Украинского физико-технического института (УФТИ). Институт был организован по инициативе академика АН СССР А.Ф. Иоффе. На базе УФТИ в 1930 году начала работу первая в СССР и на Украине, тогда четвертая в мире, криогенная лаборатория, которую возглавил академик Л.В. Шубников. Научная тематика лаборатории формировалась ее руководителем в тесном сотрудничестве с приехавшим в 1932 году в Харьков будущим академиком и Нобелевским Лауреатом – Л.Д. Ландау (рис. 34.3.).

Высокий уровень исследований харьковских криогенщиков и их широкий диапазон способствовали тому, что в 1960 году в Харькове был создан специализированный низкотемпературный институт – Физико-технический институт низких температур (ФТИНТ) АН Украины, первым директором которого стал академик Б.И. Веркин.

В 1972 году в Харькове был организован научно-исследовательский Институт проблем криобиологии и криомедицины, что создало идеальные условия для развития криомедицины. Многолетние исследования его коллектива позволили ответить на многие вопросы теории криовоздействия и криозащиты биологических объектов, выработать ясные практические рекомендации по методике применения низких температур.



Рис. 34.3. Родоначальники физики низких температур. (г. Харьков, 1934 г.). Слева направо: 1-ряд: Л.В. Шубников, А.И. Лейпунский, Л.Д. Ландау, П.Л. Капица; 2-ряд: Б.Я. Фinkelштейн, О.Н. Трапезникова, К.Д. Синельников, Ю.Н. Рябинин.

В 1974 году вышла первая монография под редакцией Э.И. Канделя «Криохирургия», обобщившая опыт применения криохирургической технологии в разных областях практической медицины. В 1964 году было создано Международное научное общество криобиологов. С 1968 года стал выходить журнал «Cryobiology». С 1974 г. было создано Международное общество криохирургов. С 1985 года выходит журнал «Криобиология». Общеввропейское общество криохирургов организовано в 1997 году.

Радикальные криохирургические операции стали возможными только после 1980 года, когда в основном были завершены фундаментальные исследования в криобиологии и криомедицине, составляющие основу современной криохирургии.

34.2.4. Криохирургические системы XXI века

Дальнейшее развитие криохирургии связано с созданием современных управляемых криогенных установок. На данный момент накоплен огромный опыт лечения криохирургическим способом различных заболеваний, включая предопухолевые заболевания и онкологическую патологию. При этом сфера применения криохирургии разносторонняя: начиная от патологии ЛОР – органов, желудочно-кишечного тракта, заканчивая гинекологией и урологией

Это стало возможным благодаря решению трех важных задач криохирургии:

1. Определением биохимических и биофизических аспектов разрушения тканей при криохирургии;
2. Созданием нового оборудования для криохирургических операций;
3. Применением методов мониторинга и визуализации при выполнении криохирургических операций.

34.3. Криодеструкция. Механизмы повреждения тканей. Преимущества и недостатки криохирургического метода

34.3.1. Механизмы повреждения тканей при криодеструкции

Процесс криоповреждения биологических тканей очень сложный и многогранный. В настоящее время механизм криодеструкции рассматривается на молекулярном, клеточном, тканевом, органном и системном уровнях.

Одним из главных факторов повреждающего действия низких температур на клеточном уровне является вне- и внутриклеточное кристаллообразование (рис. 34.4.).

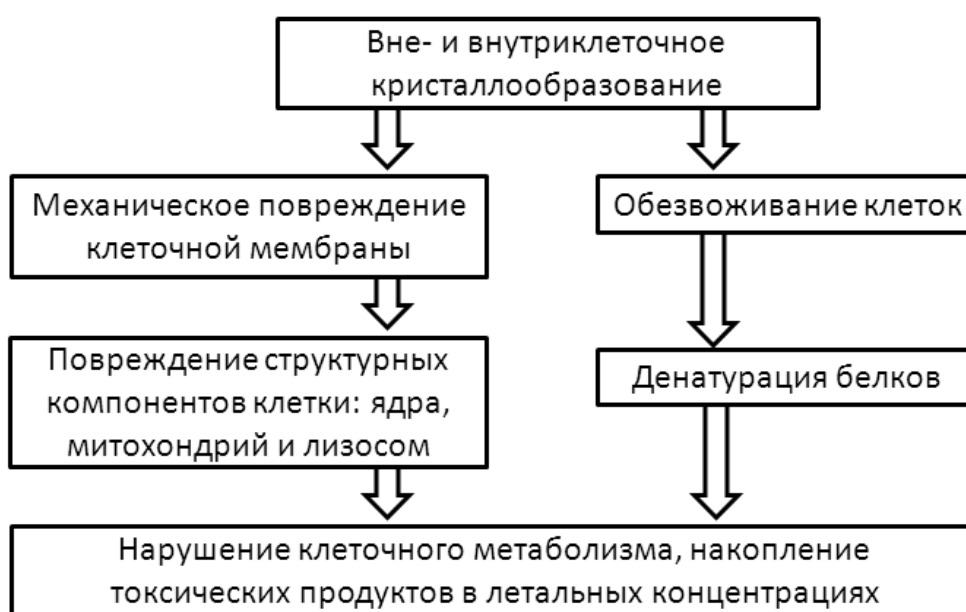


Рис. 34.4. Схема повреждающего действия низких температур на клеточном уровне. Патогенетические механизмы крионекроза клеток:

1. Разрушение клеточных и субклеточных мембран, обусловленное образованием кристаллов льда во время замораживания и отогревания.
2. Обезвоживание клеток вследствие формирования кристаллов льда, повышение концентрации электролитов, оказывающее на клетки токсическое и летальное воздействие.
3. Денатурация белков и связанная с ней деструкция клеточных мембран ядер, митохондрий, лизосом.
4. Нарушение клеточного метаболизма, накопление токсических продуктов в летальных концентрациях.

Обезвоживание клеток в результате кристаллизации воды приводит к денатурации белков. Изменение осмотического давления, pH и дегидратацию считают дополнительными факторами деструкции, к которым особенно чувствительны липопротейды клеточных мембран. Степень повреждения клеток зависит от ряда условий, особенно от скорости охлаждения и отогрева

биообъекта. Установлено, что при ускоренном прохождении клеточной суспензии зоны фазовых превращений снижается уровень дегидратации, при этом увеличивается количество внутриклеточных кристаллов льда и вызванных ими повреждений.

Медленное замораживание клеток приводит к зарождению, формированию и росту внеклеточных кристаллов льда, которые являются главными повреждающими факторами при сдавливании клеток. Кроме того, на гибель клеток оказывает влияние изменения электролитного баланса и pH. Данные явления происходят на фоне деградации клеточной мембраны. Показано, что в липидной части биомембраны при медленном замораживании активируются перекисные процессы, приводящие к потере холестерина и нарушению функций митохондрий.

Медленное оттаивание биообъекта сопровождается рекристаллизацией внеклеточного льда, нарушением физиологических концентраций растворов солей вне и внутри клеток, что способствует их осмотическому лизису.

Характерной особенностью данного метода является формирование границы крионекроза – демаркационной линии между обратимыми и необратимыми криогенными повреждениями, отделяющей очаг деструкции от окружающих тканей. На рис. 34.5. представлена схема температурных зон, образованных после локального криовоздействия на ткань *криоаппликатором*, который представляет собой металлический наконечник, соединенный с источником охлаждения, позволяющий производить ограниченное равномерное криовоздействие.

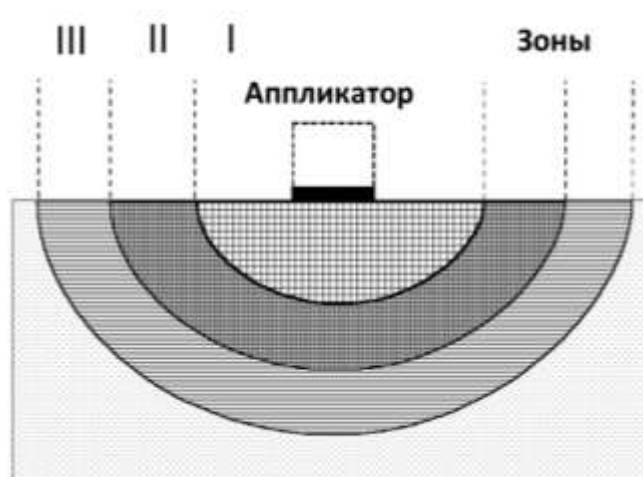


Рис. 34.5. Температурные зоны, образованные после локального криовоздействия на ткань криоаппликатором: *I – зона замораживания, которая соответствует первоначальной зоне оледенения, возникающей после контакта ткани с криоаппликатором; II – зона охлаждения, в которой температура снижается до 0°C после перераспределения тепла; III – зона гипотермии, возникающая при криовоздействии на ткань, минимальная температура которой не выходит за пределы положительных значений.*

Ткани и органы биологических объектов представляют собой сложноорганизованные системы клеток и межклеточного вещества, поэтому повреждающие факторы низких температур действуют на них с разной степенью выраженности.

Размер очага криодеструкции в ткани зависит:

- от ее теплофизических свойств, связанных с микроциркуляцией и тканевым метаболизмом;

- от состояния воды в тканях;

- особую роль в распространении ледяного фронта при криовоздействии играет расположение слоев ткани относительно криоаппликатора.

- сложные системы внутритканевых и внутриорганных регуляторных взаимодействий обеспечивают естественную криопротекцию живой ткани, что ограничивает зону криодеструкции.

Анализ экспериментальных и клинических данных позволил говорить о наличии а) первичного и б) вторичного повреждения клеток и тканей. В слоях, непосредственно прилегающих к зоне действия криоаппликатора, клетки гибнут вследствие первичного некроза. При этом во всем объеме замораживаемой ткани наблюдается деструкция кровеносных сосудов микроциркуляторного русла, что вызывает вторичные изменения в виде ишемического некроза близлежащих тканей. На рис. 34.6. представлены первичные и вторичные изменения в ткани печени после криодеструкции (по В.В. Шафранову).



Рис. 34.6. Первичные и вторичные изменения в ткани печени после криодеструкции. (по В.В. Шафранову). *Первичные изменения (первичный некроз): разрушение слоев клеток, непосредственно прилегающих к зоне действия криоаппликатора; Вторичные изменения (вторичный некроз): гибель тканей вследствие ишемического некроза, обусловленного тромбозом сосудов микроциркуляторного русла и изменением реологических свойств крови.*

Клетки, расположенные в более глубоких слоях тканей, в первые часы после низкотемпературного воздействия находятся в состоянии белковой дистрофии или некробиоза, затем в результате апоптоза множество таких клеток погибает.

Локальное криовоздействие на ткани приводит к спазму сосудов. После оттаивания происходит расширение мелких сосудов с последующей реперфузией, что способствует миграции в зону криоповреждения клеток воспаления: лейкоцитов, лимфоцитов, макрофагов и фибробластов. Замедленный кровоток в микроциркуляторном русле в присутствии поврежденных эндотелиоцитов приводит к агрегации тромбоцитов и последующему тромбозу, что является дополнительным повреждающим фактором.

Следует отметить, что тромбоз микрососудистого русла обеспечивает надежный гемостаз. В центральной зоне криовоздействия гибель клеток происходит вследствие некроза, а на периферии, где температуры не достигают критического уровня кристаллообразования, – апоптоза.

Выделяют несколько фаз холодового воздействия на ткани (по В.И. Грищенко, Б.П. Сандомирскому) табл. 34.1.

Таблица 34.1. Фазы холодового воздействия на ткани

№	Название фазы	Признаки
1	Первоначальная, или мгновенная	Фаза обусловлена процессами охлаждения – замораживания – оттаивания – отогревания
2	Замедленная	Заканчиваются процессы деструкции охлажденных тканей, для чего требуется от нескольких часов до нескольких дней; процесс очищения от некротических масс продолжается от одной до нескольких недель
3	Поздняя	Восстановление пораженных тканевых структур и иммунологические реакции на холодовое повреждение тканей, обладающих определенной специфичностью

На основании результатов многолетних экспериментальных и клинических исследований криодеструкции биологической ткани были определены основные принципы проведения криохирургических операций и технические требования к криохирургической аппаратуре, от соблюдения которых зависит эффективность проводимого лечения.

Оптимальными параметрами для криодеструкции патологических очагов являются:

1. Высокая скорость замораживания (выше 10 град/мин и скорость продвижения фронта замораживания более 0,5 мм/мин);
2. Медленная (самостоятельная) скорость оттаивания тканей до полного исчезновения ледяной зоны (зона льда под аппликатором);
3. Температура криоаппликатора ниже минус 50°C и продолжительность криовоздействия не менее 3 мин;
4. Не менее двух циклов «замораживания-оттаивания».

34.3.2. Кримоиммунология

Низкие температуры, кроме прямого деструктивного действия на ткани, могут оказывать опосредованное влияние и на иммунную систему. Первоначально возникнув как частная задача кримобиологии, кримоиммунология в настоящее время представляет собой отдельное направление. Впервые Аблин совместно с Соанес и Гондер в 1969 г. сообщили о фактах обратного развития метастазов у больных под влиянием кримоэктомии (кримодеструкции) простаты. Одновременно появилось сообщение Майерс, Хаммонд и Кэтчем (1969 г.) об индукции противоопухолевого иммунитета под влиянием кримодеструкции экспериментальных опухолей у животных.

Противоопухолевая активация иммунной системы под влиянием кримодеструкции получила название **«кримоиммунологический ответ»**. Однако в литературе сведения о данном феномене противоречивы.

Было предложено несколько механизмов иммунологического ответа при использовании низких температур. Первая теория – *выработка противоопухолевых антител*. Когда опухолевые клетки умирают, антигены высвобождаются и фагоцитируются антигенпрезентирующими клетками.

В-клетки с антителами, специфичными для антигена, стимулируются и трансформируются в плазматические клетки. Причем этот процесс может активироваться как с помощью Т-клеточного звена (Т-хелперов), так и без него. Образование антител индуцирует фиксацию комплемента, что приводит к нейтрофильному и макрофагальному хемотаксису. В дальнейшем эти клетки высвобождают свободные радикалы и ферменты, которые убивают опухолевые клетки.

Второй механизм иммунологического ответа заключается в *индукции цитотоксических Т-клеток*. Обычно внутриклеточные антигены переносятся на клеточную мембрану и распознаются цитотоксическими Т-клетками, которые высвобождают ферменты и убивают опухолевые клетки. Схема иммунного ответа на примере вторжения антигена в организм представлена на рис. 34.7.

Существует мнение, что степень и направленность иммунного ответа (активация или супрессия) зависят от исходного состояния иммунной системы организма, а использование низких температур может способствовать активации как клеточного, так и гуморального иммунитета.

Иммунный ответ определяется объемом ткани, которая подвергается воздействию низких температур. Экспериментально показано, что при частичной кримодеструкции опухолевого очага в печени показатель выживаемости крыс был значительно выше, чем при тотальном кримонекрозе опухоли. Аналогичный иммуностимулирующий эффект после локальной кримохирургии печени был установлен и при экспериментальном циррозе печени.

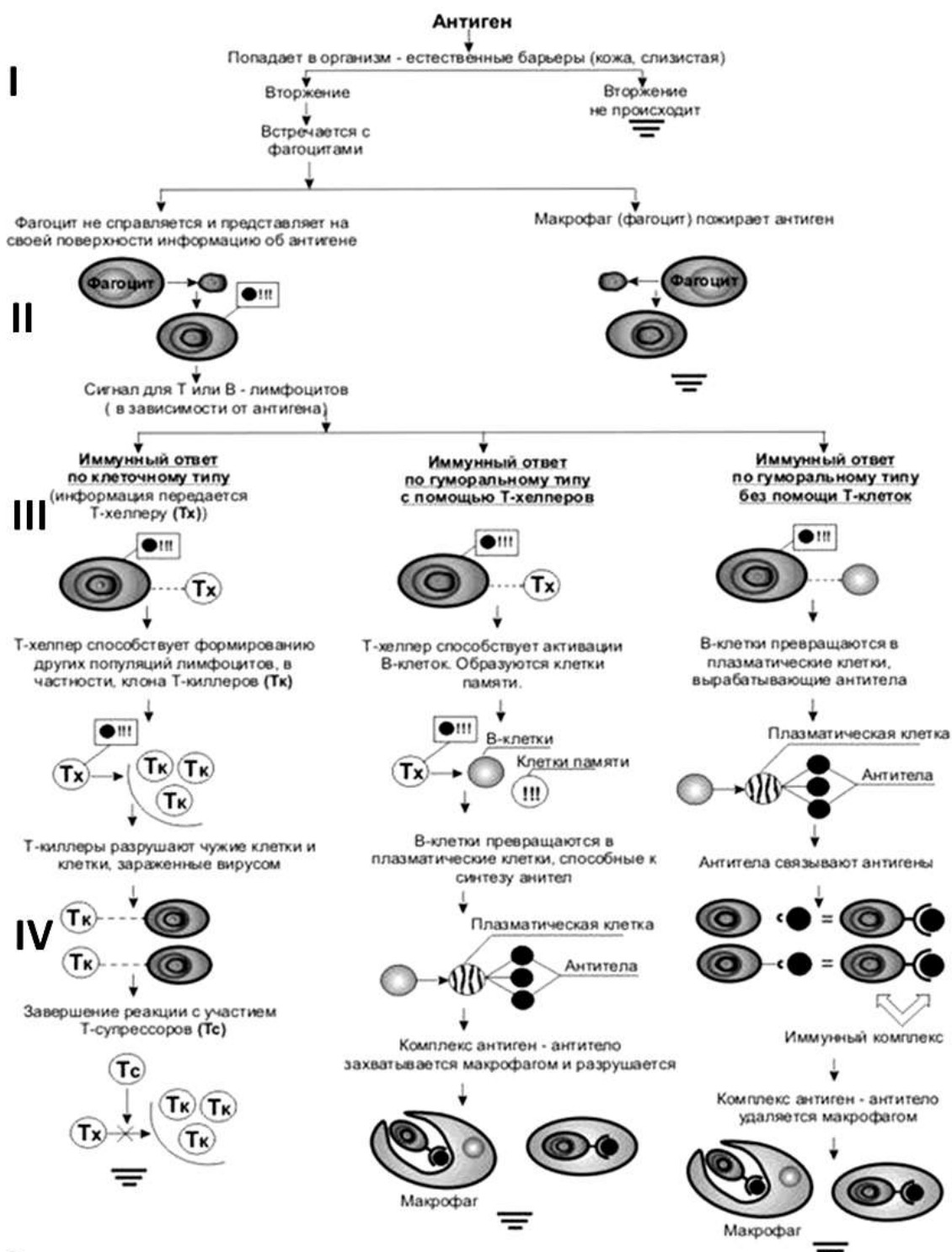


Рис. 34.7. Схема иммунного ответа (по Н.Л. Иванову). Основные этапы иммунного ответа (по Р.М. Хаитову): I – контакт с антигеном/патогеном и индукция воспалительной реакции; II – поглощение и переработка (процессинг и презентация) антигена антигенпрезентирующей клеткой; III – Распознавание антигена и активация лимфоцитов, приводящая к образованию эффекторных клеток памяти; IV – Реализация эффекторных механизмов – деструкция антигена и/или патогена и поврежденных/измененных клеток и тканей, выведение продуктов распада.

Известно, что степень иммунного ответа зависит от уровня и профиля цитокинов, которые образуются при криодеструкции. Некротизированная ткань опухоли является адъювантом гуморального иммунного ответа. После криодеструкции антигены опухолевой ткани более доступны для антиген-презентирующих клеток. Кроме того, криовоздействие стимулирует перемещение в очаг повреждения иммунокомпетентных клеток (макрофагов и дендритных клеток). Макрофаги, которые мигрируют в зону криодеструкции, могут инициировать гуморальный ответ, а проникновение дендритных клеток и их созревание до антигенпрезентирующих клеток усиливает Т-клеточное звено иммунного ответа.

Будет ли иммунный ответ при криовоздействии, зависит от следующих факторов:

- гистологический тип опухоли;
- исходное состояние иммунной системы;
- метод криовоздействия;
- объем замороженной опухоли;
- время, когда оценивали иммунный ответ.

Комбинация этих нюансов является инициатором той или иной формы иммунного ответа – активации или супрессии.

Вид иммунного ответа после криовоздействия зависит от следующих параметров:

1. Профиль цитокинов, которые образуются при криодеструкции (либо провоспалительные, либо противовоспалительные);
2. Доступность антигенов, которые формируются при криодеструкции для антиген-презентирующей клетки;
3. Механизм клеточной смерти (некроз или апоптоз);
4. Состав фагоцитов в очаге криодеструкции (либо макрофаги, либо дендритные клетки).

В зависимости от сочетания этих факторов криовоздействие может являться пусковым механизмом:

- только гуморального ответа;
- только клеточного ответа;
- комбинированного ответа;
- отсутствия иммунного ответа;
- иммуносупрессии.

На сегодняшний день до конца не установлены все механизмы и составляющие криоиммунологического ответа, поэтому исследование данного вопроса вызывает повышенный интерес.

34.3.3.Преимущества и недостатки криохирургического метода

Применение криохирургического метода в медицине обусловлено рядом преимуществ:

1. Метод позволяет полностью разрушить заданный объем патологической ткани практически любого органа.

2. Доступ к глубокорасположенным тканям, подлежащим криодеструкции, может быть осуществлен с минимальной травматизацией здоровой ткани.

3. Локальное криохирургическое воздействие на живые ткани, как правило, безболезненно и поэтому не требует предварительного обезболивания. Это объясняется ранним «выключением» чувствительных волокон при замораживании.

4. Очаг крионекроза обладает своеобразной «биологической инертностью» и вызывает лишь минимальную перифокальную реакцию.

5. Холодовое воздействие блокирует мелкие артериальные и венозные сосуды, что позволяет производить разрезы и очаги деструкции практически бескровно даже в самых богато васкуляризированных органах.

6. Высокая резистентность стенки крупных сосудов к низкой температуре, обуславливающая восстановление нормального кровотока даже после их полного замораживания.

7. Очаги криодеструкции быстро заживают, не вызывают грубых рубцов и дают лучший косметический эффект.

8. Расширяет возможности радикального лечения.

9. Возможна иммунная реакция организма против выживших или рецидивных злокачественных клеток.

Наиболее эффективен метод криодеструкции в тех случаях, когда в ходе операции сложно выбрать тактику оперативного вмешательства из-за большой вероятности перфорации полого органа и/или кровотечения из крупных сосудов (труднодоступные места, расположение патологических очагов в области крупных сосудов). Под воздействием низких температур происходит гибель клеточных элементов сосуда с сохранением коллагенового каркаса, что предупреждает риск кровотечения как во время криодеструкции, так и после нее.

Ограничения и трудности при проведении криохирургических операций:

- глубина зоны криодеструкции ограничена низкой теплопроводностью льда, образующегося в ткани в зоне контакта с устройством охлаждения или хладоносителем, а также теплопродукцией организма;

- при проведении криодеструкции в полостях организма возникают проблемы теплоизоляции рабочей части криоинструмента, тепловой защиты окружающих тканей и контроля их температуры;

- для полной деструкции очагов патологии часто требуются повторные криохирургические вмешательства, при необходимости отторжения части органа (ткани) криохирургия может применяться только в комплексе с традиционным хирургическим лечением.

34.3.4. Показания и противопоказания к криохирургическим операциям

Преимущества и недостатки криохирургического метода лечения формируют показания и противопоказания к его использованию.

Показания: Поверхностное расположение кожных образований, отсутствие формирования грубых келоидных рубцов способствует широкому внедрению криохирургических технологий при доброкачественных и злокачественных образованиях кожи.

Криодеструкция и криоорошение показано при лечении воспалительных процессов слизистых оболочек полости рта и хронических фарингитах.

Сохранение эластическо-коллагенового каркаса при криодеструкции сосудов и периферических нервов способствовало использованию данного метода для крионевролиза (денервации).

Область применения стационарных криохирургических систем включает лечение опухолевых заболеваний, преимущественно трудно доступной локализации, методом криодеструкции. Кроме того, их используют при выполнении паллиативных вмешательств для устранения болевого, компрессионного (сдавливающего), обтурационного (охватывающего полые органы – трахея, пищевод, кишка) и воспалительного синдромов.

Противопоказания: Криохирургия не применяется, когда проявление заболевания связано с воздействием холода, например, при криоглобулинемии, криофибриногенемии, холодовой крапивнице, болезни Рейно. К лечению больных с выраженной пигментацией кожи следует подходить с осторожностью, поскольку у них большая склонность к образованию гипо- или гиперпигментированных рубцов.

Отдельно следует отметить противопоказания к выполнению криогенной деструкции с использованием чрескожных пункционных систем, так как:

- существует опасность прорастания опухоли в стенку полого органа, лежащего интра- и мезоперитонеально;
- возможно вовлечение в опухоль внепеченочных желчных протоков и желчного пузыря;
- вероятно повреждение крупных сосудов при интимном прилегании опухоли к стенке аорты и магистральным артериям;
- невозможность визуализации процессов наведения криозондов и контроля криодеструкции.

34.4. Криохирургическая аппаратура

На основе результатов проведенных фундаментальных, теоретических, экспериментальных и клинических исследований в области криохирургии и криогенной техники была создана высокоточная аппаратура для проведения

локальной криодеструкции патологически измененных участков ткани и/или органов.

34.4.1. Классификация криогенной аппаратуры

Широкая область применения, многообразие требований и условий эксплуатации, а также различие используемых методов криогенного охлаждения способствовали появлению большой номенклатуры криохирургических установок и инструментов разных типов и конструкций.

1. По криогенному циклу или методам охлаждения криогенная техника подразделяется на аппараты, принцип работы которых основан на:

- выделении теплоты фазового перехода (переход хладагента из жидкой фазы в газовую). Например, превращение жидкого азота в газообразное состояние вызывает быстрое поглощение большого количества тепла (39 ккал/л азота) и соответственно приводит к резкому снижению температуры на теплообменнике криоинструмента, находящегося в контакте с биологической тканью;

- эффекте Джоуля-Томпсона (охлаждение или нагревание газа хладагента в процессе дросселирования). Принцип работы криозондов заключается в том, что газ, проходя через суженное отверстие в зону низкого давления, изменяет свою температуру. В данной системе для охлаждения применяют газообразный аргон, а для оттаивания – газообразный гелий. Следует отметить, что для безопасной работы необходимы дополнительные условия, поскольку аргон и гелий должны храниться в отдельных металлических баллонах емкостью 40 л и под давлением порядка 400 и 40 bar соответственно;

- термоэлектрическом эффекте – выделение или поглощение теплоты при прохождении электрического тока через контакт двух различных проводников). При пропускании электрического тока в одном направлении капля воды, расположенная между проводниками, превращается в лёд, при смене направления тока – лёд тает, что позволило установить, что в зависимости от направления протекающего в эксперименте тока, помимо джоулева тепла, выделяется или поглощается дополнительное тепло;

- гальванотермомагнитном эффекте – совокупности эффектов, связанных с воздействием магнитного поля на электро- и теплопроводность твердотельных проводников;

- комбинированном способе охлаждения, представляющем сочетание двух и более вышеуказанных методов.

2. По способу передачи холода к наконечнику криоинструменты подразделяются на:

- инструменты, соединенные с криогенератором с дистанционным расположением инструмента относительно криогенератора;

- автономные, в которых используется газообразный, жидкий или твердый хладагент, расположенный в рукоятке инструмента.

3. По назначению:

- для деструкции;
- для экстракции;
- для функциональных воздействий замораживания перед экстирпацией и криорезекцией.

4. По способу передачи холода к биологической ткани криоинструменты подразделяются на:

- инструмент для криоорошения (криораспылитель) (рис. 34.8, а.);
- криодеструктор аппликационного типа (рис. 34.8, б.);
- криоустановки с игольчатыми криозондами пенетрационного типа (рис. 34.8, в.).

5. По способу применения в оперативных вмешательствах:

- для полостных операций. Например, на брюшной полости;
- для эндоскопических операций, криоинструмент встроен в гибкие и жесткие зонды;
- для операций, при которых проводят криодеструкцию с помощью эндоскопов или других методов визуализации.



А



Б



В

Рис. 34.8. Виды криоинструментов. А – Криораспылитель «CryoSkin» («Криотек», Россия); Б – Криодеструктор «КриоИней КИ-402» («Криотек», Россия) с различными видами сменных криоаппликаторов; В – Тонкоигольный криозонд «МКС» («Международный институт криомедицины», Россия).

Инструменты для деструкции, в свою очередь, подразделяются на разрушающие большие или малые участки (объемы) патологической ткани, а также предназначенные для использования при заболеваниях наружных и внутренних органов человека.

Выбор определенного типа криохирургического инструмента в каждом конкретном случае обуславливается комплексом показателей и требований, выполнение которых обеспечивает его нормальное функционирование.

В клинической практике были апробированы различные хладагенты, физические свойства которых определяют область применения криохирургического оборудования:

- жидкий азот (-196°C);
- аргон ($-87,3^{\circ}\text{C}$);
- гелий (-269°C);
- двуокись углерода (-78°C);
- фреон ($-40,8^{\circ}\text{C}$).

В аппаратах, основанных на выделении теплоты фазового перехода, в качестве хладагента наиболее широко применяется жидкий азот, обладающий оптимальными физическими свойствами. Аппараты такого типа чаще используются при проведении лапароскопических операций криоинструментами аппликаторного (прикладывающего) и пенетрационного (проникающего) типа.

Разработка и усовершенствование современных криохирургических систем с использованием эффекта Джоуля-Томпсона связано с созданием тонких игл (криозондов) диаметром 1,7–3,8 мм для криодеструкции (рис. 34.9.).

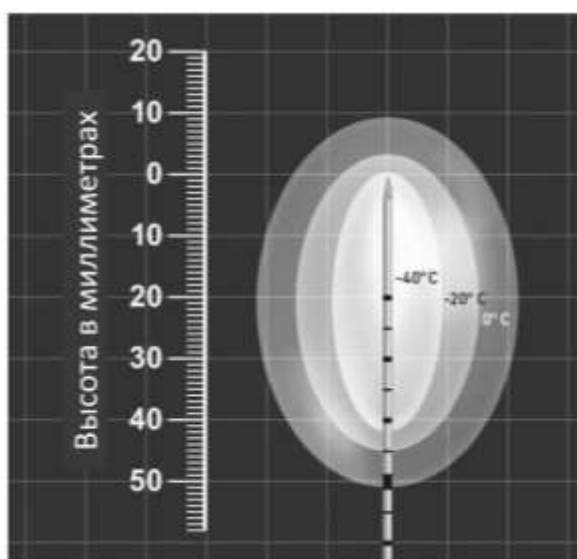


Рис. 34.9. Распределение температурных зон вокруг охлажденного аргонном криозонда в геле (21°C). При контакте с охлажденным аргонном формируется эллипсовидная зона замороженной ткани. Образованная зона распространяется вокруг криозонда, при этом температура замораживания существенно снижается в направлении от криозонда к периферии.

Чрескожным введением криозонда могут обеспечиваться как криоабляция (криодеструкция) множественных опухолей, так и деструкция опухоли большого объема, в том числе и ассиметричного строения, за счет синхронного действия двух или более зондов.

Кроме того, в медицинской практике используются криохирургические системы, в которых охлаждаются игольчатые криозонды при открытом или

транскутанном (чрескожном) доступе не за счет дросселирования инертных газов, а за счет циркуляции азота. По такому принципу работает криоустановка «CRYO-6» («ERBE Elektromedizin», Германия) и «МКС» («Международный институт криомедицины», Россия).

34.4.2. Требования к современным криохирургическим установкам

После накопления представлений о механизмах и условиях, вызывающих криодеструкцию той или другой биологической ткани, проведения многочисленных исследований и разработок, были сформулированы основные принципы и базовые технические требования к современной криохирургической аппаратуре, реализация которых и определяет эффективность применения криохирургических операций в клинической практике (по С.В. Конгурцеву):

- высокая холодильная мощность – обеспечение минимальной температуры рабочей поверхности криохирургического инструмента, находящегося в контакте с патологическим очагом, что подлежит криодеструкции, на уровне минус 180°C и ниже;
- обеспечение возможности программируемого достижения и удержания с высокой точностью реализации любой температуры в пределах рабочего диапазона температур от 0°C до минус 180°C и ниже;
- обеспечение измерения с высокой точностью реальной температуры рабочей поверхности криоинструмента и зоны замораживания во время проведения криовоздействия;
- обеспечение УЗИ, сканирования, МРТ, КТ, СКТ визуализации, построение трехмерной реконструкции образований в органах;
- наличие широкого набора криоинструментов и криоаппликаторов;
- автоматическое управление работой аппарата и процессами криовоздействия – замораживания и оттаивания;
- непрерывное слежение за динамикой роста зоны замораживания и измерение ее размеров в трехмерной ориентации;
- воспроизводимость параметров криовоздействия;
- индикация всех необходимых параметров криовоздействия;
- задание и отсчет времени криовоздействия;
- высокая надежность, эргономичность, простота и удобство в эксплуатации;
- пожаро–, взрыво– и токсикологическая безопасность;
- универсальность и надежность узлов стыковки;
- подготовка криохирургической установки к работе и ее непосредственное действие не должно приводить к потере темпа всего операционного процесса, что особенно важно в случае, когда применение криохирургической установки потребовалось уже в ходе операции и не планировалось заранее;
- безопасность процесса заправки;

- унификация основных узлов и элементов аппаратов, таких как криостаты, криопроводы, разъемы, клапаны, датчики температуры и давления, насосы, элементы, криоинструменты и криоаппликаторы, что позволит быстро создавать оборудование для решения конкретных задач;

- экономичность – низкая потребляемая мощность, оптимальный расход криоагента.

Учитывая перечисленные знания о механизмах криодеструкции и сформированные требования современный криоаппарат должен состоять из следующих основных элементов:

- блок хранения и подачи хладагента;
- блок управления;
- криопровод с криоинструментом;
- блок термометрии;
- блок визуализации.

На основании результатов анализа и функциональных возможностей криохирургических установок можно заключить, что на сегодняшний день проблема ограничения использования данной аппаратуры связана не столько с несовершенством ее медико-технических характеристик, а в большей степени с недостаточным контролем за проведением процедуры криовоздействия.

Для повышения эффективности криохирургических операций эта проблема должна решаться комплексно. А.В. Шакуров и др. выделили основные направления мероприятий, направленных на решение научно-технических задач.

Первое направление – разработка методик дозирования криовоздействия с повышенной точностью. Для его выполнения необходима разработка и использование криопротокола – подробного описания (алгоритма) процедуры, которую хирург должен выполнить с помощью криохирургического аппарата.

Второе направление связано с прогнозом обеспечения заданной зоны крионекроза, поскольку от точности обеспечения дозы зависит как безопасность, так и эффективность проведения криохирургических операций.

Третье направление — исследование теплофизических свойств биотканей в широком диапазоне температур (в том числе патологически измененных), а также изменения их свойств под воздействием внешних факторов для улучшения результатов криовоздействия.

Четвертое направление — совершенствование методик контроля процедуры криовоздействия. Необходима автоматизация работы элементов криохирургической аппаратуры и мониторинг зоны замораживания в режиме реального времени по ходу операции, которые позволяют предоставлять хирургу более полную картину происходящего.

Пятое направление исследований связано с созданием робототехники в криохирургии.

Несмотря на это, выбор определенного типа криогенной аппаратуры в каждом конкретном случае обуславливается комплексом показателей и требований, выполнение которых обеспечит лучшее его использование и направлено на высокоэффективные результаты лечения.

34.4.3. Эндоскопические криохирургические системы

В аппаратах криохирургии, применяемых в настоящее время, предпочтение отдано принципам с использованием теплоты фазового перехода и эффекта Джоуля-Томпсона.

В Украине разработан универсальный автоматизированный передвижной криохирургический комплекс «Крио-Пульс» (Научно-производственная фирма «Пульс», Украина). Данный комплекс состоит из трех автоматизированных криогенных систем (передвижной, переносной и стационарной), каждая из которых снабжена унифицированным узлом стыковки со сменными криоинструментами и аппликаторами. Его конструкция основана на последних научных и технических достижениях в области низкотемпературного теплообмена, криогенного материаловедения, низкотемпературной прецизионной термометрии, микропроцессорных технологий и т.п., что соответствует всем требованиям использования криогенной аппаратуры (рис. 34.10.).



Рис. 34.10. Криохирургический комплекс «Крио-Пульс». 1 – блок управления с монитором; 2 – криопровод с криоинструментом; 3 – Сосуд Дьюара с жидким азотом.

Из основных технических характеристик следует отметить быстрое (не более 3 мин) время выхода на рабочий режим. Объем зоны замораживания

составляет от 5 до 180 см³, при этом время экстренного отогрева составляет 2 мин.

Установка «Крио-Пульс» широко представлена как в клиниках Украины, так и за рубежом, в частности, аналогичная установка «Крио-МТ» («Мед-Технолоджи») зарегистрирована в России.

К основным областям применения криохирургической установки «Крио-Пульс» можно отнести абдоминальную хирургию, гинекологию, урологию и дерматологию.

С 1970 г. в Физико-техническом институте низких температур (г. Харьков, Украина) на основании медико-технических требований, разработанных кафедрой акушерства и гинекологии Харьковского государственного медицинского университета под руководством академика НАН Украины В.И. Грищенко, была разработана аппаратура для лечения гинекологических заболеваний. Созданная криоустановка «АКГ-01» («ФТИНТ», Украина) обеспечивала температуру охлаждения за счет эффекта Джоуля-Томпсона в зоне контакта с тканью (от минус 50 до минус 60°С) дросселированием закиси азота в охлаждающем наконечнике до атмосферного давления.

Аппарат «АКГ-01» предназначен для криодеструкции патологически измененных участков ткани наружных половых органов, влагалища, шейки матки и криокоагуляции слизистой (эндометрия) полости матки с помощью эндоскопа, а также может применяться в урологии и проктологии. Рабочий инструмент аппарата – криозонд – компактен, портативен и удобен в работе. Его конструкция обеспечивает мгновенную подачу и прекращение подачи хладагента, а также быструю смену наконечников необходимой формы и размера.

В 2013 г. разработана малоинвазивная криохирургическая система «МКС» («Международный институт криомедицины», Россия) с использованием чрескожных зондов. Данный аппарат предназначен для выполнения малоинвазивных криотерапевтических и криохирургических операций путем чрескожной пункции и точно направленного локального низкотемпературного воздействия на патологические ткани. Он применяется для лечения опухолевых заболеваний преимущественно труднодоступной локализации методом хирургии, а также для выполнения паллиативных (облегчающих страдания) вмешательств с целью устранения болевого, компрессионного, обтурационного и воспалительного синдромов. Оригинальные разработки криозондов с минимальным временем обеспечения рабочего режима экстренного отогрева с высокой эффективностью криодеструкции патологического очага, а также многократным использованием криозондов, что позволяет снизить стоимость криохирургической операции, свидетельствуют о перспективности использования данного оборудования (рис. 34.11.а).

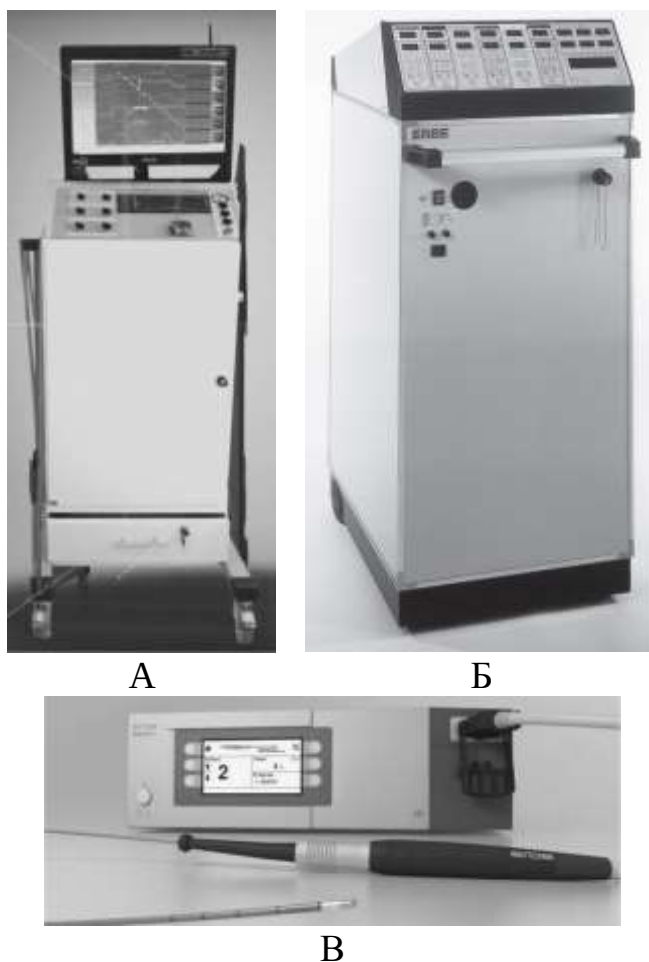


Рис. 34.11. Крихирургические системы: *А* – малоинвазивная криотерапевтическая система «МКС»; *Б* – крихирургическая установка «Cryo-6»; *В* – криоаппарат «Cryo-2».

За рубежом хорошо зарекомендовала себя высокоэффективная криоустановка «CRYO-6» («ERBE Elektromedizin», Германия). С помощью специального погружного азотного насоса в системе создается необходимое для генерации холода рабочее давление. Благодаря компактности системы возможно проведение оперативных вмешательств в труднодоступных участках (рис. 34.11. б).

К аппарату «CRYO-6» можно подключить до шести криозондов с настройкой индивидуальной температуры замораживания. Наличие нескольких зондов и высокая мощность замораживания обеспечивают максимальную эффективность оперативного вмешательства и комфортную работу криохирурга.

Сонографический мониторинг зоны криооперации поддерживается и уточняется в ходе оперативного получения необходимых температурных параметров, что позволяет точно определить момент оптимальной некротизации опухоли.

В перечне продукции компании «Erbe Elektromedizin GmbH» (Германия) представлены также криоаппараты «ERBECRYO CA», «ERBECRYO 2», предназначенные для биопсии, реканализации

(восстановления просвета канала) и девитализации (удаление жизнеспособных тканей) при бронхоскопии, криодеструкции патологических очагов в дерматологии и гинекологии (рис. 34.11. в). Аппараты оснащены как жесткими, так и гибкими криозондами. Из преимуществ криоаппаратов следует отметить удобный и быстрый выход устройства в режим эксплуатации, автоматический контроль температурных параметров для каждого зонда. В качестве охлаждающего агента используются N_2O или CO_2 .

Результаты биопсии (прижизненного взятия биологической ткани для гистологического анализа), выполненной с помощью аппарата «Cryo 2» (криобиопсии), имеют большую диагностическую ценность, поскольку при выполнении данной манипуляции любой тип ткани не захватывается щипцами, что позволяет сохранить клеточную структуру биоптата и исключить наличие травматических артефактов и кровоизлияний. Кроме того, при проведении данной процедуры размер биоптатов в три раза больше, чем при традиционной биопсии. Гистологический анализ выявил диагностическую точность примерно в 95% случаев по сравнению с результатами, полученными классическим способом.

Фирмой «GalilMedical» (Израиль) разработаны системы для криоабляции «Visual-ICE», которые предназначены для малоинвазивного лечения злокачественных и доброкачественных опухолей в стационарных и амбулаторных условиях.

Система «Visual-ICE» обеспечена сенсорным экраном с высокой четкостью изображения и блоком управления циркуляцией газов высокого давления (аргон – для замораживания, гелий – для оттаивания) через игольчатые аппликаторы (рис. 34.12. а).



А



Б

Рис. 34.12. Криохирургические системы: А – установка «Visual-ICE»; Б – установка «CryocareCS»).

Она основана на запатентованной технологии «i-Flow», которая представляет собой проприетарный программный алгоритм для оптимизации работы каждой иглы, что позволяет прогнозировать очаг крионекроза биологической ткани. Мониторинг температуры осуществляется в режиме реального времени с помощью термодатчиков, подключенных к системе, что обеспечивает контроль процесса.

Фирмой «Endocare, Inc.» (США), а с 2008 г. в составе компании «HealthTronics» разработана и введена в производство система «Cryocare CS», принцип работы которой основан на использовании новейших технологий и инноваций. Криохирургические операции, проводимые с помощью данной системы, безопасны и эффективны (рис. 34.12. б).

Система «Cryocare CS» позволяет проводить криоабляцию злокачественных опухолей с помощью восьми чрескожных криозондов с изменяющимся диаметром и длиной, что обеспечивает формирование зоны кристаллизации (*ледяной шар*) различной величины. Каждый зонд имеет уникальную запатентованную конструкцию с прямым углом для максимального эргономичного управления и вакуумную изоляцию криоапликатора.

Данная система хорошо зарекомендовала себя при проведении операций на предстательной железе, криоабляции легких и почек. Особенностью конструкции системы «Cryocare CS» является наличие встроенного модуля управления, интегрированного ультразвукового аппарата, разработанного для визуализации зоны криодеструкции.

Компания «Candela» (США) с 1970 г. производит лазерное и криохирургическое оборудование, а с 1994 г. – криохирургические установки «Candela LCS 2000» и «Candela LCS 3000». Первая предназначена для криохирургических вмешательств при метастатических поражениях печени, а вторая – для криоабляции предстательной железы и общей хирургии.

В 1996 г. после заключения соглашений с компаниями «Cryotech» и «Spemby», начато совместное производство криоустановки «CS-5» («Candela» США / Великобритания), которая состоит из консоли управления и связанных с ней аксессуаров. Для доставки хладагента в ткани-мишени используются криозонды, а для мониторинга температур в очаге криодеструкции и окружающих тканях – температурные датчики.

34.5. Криохирurgia в практической медицине

Применение криодеструкции как основного метода лечения оказывается возможным в условиях специализированных клиник, оснащенных современным криогенным оборудованием. Кроме того, ее применение оправдано в лечебных и косметологических учреждениях, в которых использование низких температур является альтернативным способом лечения.

На современном этапе наибольшего внимания заслуживают малоинвазивные криохирургические методы лечения с использованием эндоскопических технологий.

34.5.1. Криохирургический метод в нейрохирургии

Криохирургический метод явился важным достижением, и во второй половине XX века обеспечил существенный прогресс стереотаксической нейрохирургии, что явилось отправной точкой в широком использовании его в медицине.

Стереотаксис представляет собой совокупность приемов и расчетов, позволяющих с большой точностью произвести введение тонкого хирургического инструмента (канюли, электрода) в заранее определенную глубоко расположенную структуру головного и спинного мозга (рис. 34.13.).

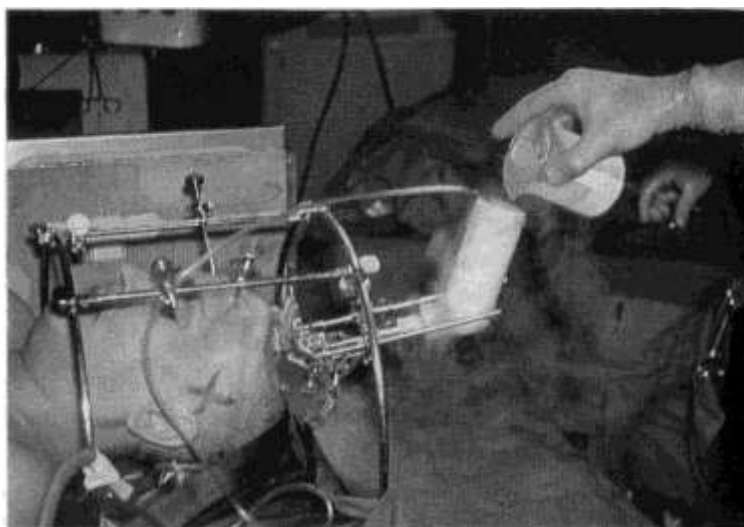


Рис. 34.13. Установка для проведения стереотаксических операций.
Заливание жидкого азота в резервуар прибора для локального замораживания во время стереотаксической операции (по Э.И. Канделю).

При этом используют следующие модификации проведения стереотаксических криохирургических операций:

1. Криодеструкция опухоли без ее последующего удаления (при подкорковых разветвленных глиомах). Замороженная часть опухоли сначала некротизируется, а затем рассасывается.

Этапы операции:

- Определение координат патологического процесса.
- Расчет глубины и направления подведения наконечника с хладагентом.
- Формирование фрезерного отверстия в своде черепа (краниотомия).
- Закрепление стереотаксического аппарата.
- Управляемое введение наконечника криодеструктора в центральную часть опухоли.
- Контроль замораживания и оттаивания опухоли.

- Извлечение наконечника.

2. *Криоэкстирпация* – замораживание опухоли мозга до твердого состояния с последующим тотальным удалением.

Этапы операции:

- Определение топографии (координат) патологического процесса.
- Выполнение костнопластической трепанации для доступа кратчайшим путем к патологическому очагу.
- Введение наконечника криодеструктора в центр опухоли.
- Замораживание опухоли до твердого состояния.
- Извлечение опухоли вместе с криодеструктором.
- Закрытие раны.

3. Комбинированный вариант:

- центральную часть опухоли замораживают и удаляют;
- периферическая часть при этом некротизируется и рассасывается.

При проведении стереотаксических криохирургических операций по поводу паркинсонизма отмечено значительное снижение частоты послеоперационных осложнений и летальности по сравнению с ранее применявшейся деструкцией алкоголем. Значительное и стойкое улучшение в виде исчезновения или резкого уменьшения тяжелых гиперкинезов в конечностях и туловище наблюдали после криохирургической деструкции таламических ядер у пациентов с деформирующей мышечной дистонией.

В 1962 г. появилось сообщение J. Соорег о применении метода замораживания для деструкции новообразований различной локализации. Во многих случаях был получен обширный некроз операбельных опухолей, после которого наблюдалось уменьшение опухоли в размере. При применении метода криодеструкции ни у одного больного не возникало вторичных кровотечений, что дало основание J. Соорег назвать этот метод гемостатическим (способным останавливать кровотечения).

Было показано, что криогенный метод применим при различных гистологических структурах опухолей мозга в трех вариантах (криоэкстирпация, криодеструкция и комбинация обеих методик). При менингиомах и поверхностных глиомах опухолевый узел можно удалить путем криоэкстирпации. При глубоких, явно неоперабельных глиомах, захватывающих подкорковые структуры, целесообразно производить криодеструкцию опухолевой ткани.

34.5.2. Криохирургия в эндокринологии

По литературным данным известно о достаточно высокой эффективности и относительной безопасности трансназальной стереотаксической криодеструкции при гормональноактивных аденомах гипофиза.

Метод стереотаксической селективной криодеструкции аденом гипофиза позволил минимизировать травматичность, максимально сохранить интактные ткани гипофиза, значительно снизить риск послеоперационных инфекционных осложнений и ликвореи (истечение спинномозговой

жидкости), а также улучшить качество жизни пациентов. В работе В.И. Сипитого показан положительный эффект использования криохирургических подходов при трансназально-трансфеноидальной криохирургии аденом гипофиза. Установлено, что с помощью метода эндовидеомониторинга можно оптимизировать тактику оперативного вмешательства. Применение эндоскопов с угловой оптикой позволило значительно расширить зону осмотра при хирургическом вмешательстве в условиях хорошей освещенности, увеличить объем манипуляций в области средней черепной ямки.

Клинически доказано, что трансназально-трансфеноидальный (через нос) подход в хирургии больших и гигантских аденом по сравнению с транскраниальным (через кости черепа) доступом позволяет существенно уменьшить число интраоперационных (с 23,2 до 12 %) и послеоперационных (с 27,9 до 13 %) осложнений, а также минимизировать показатели послеоперационной летальности (с 7 до 3 %).

В экспериментальном исследовании M.S. Kuriana показана эффективность использования криохирургических методов в лечении патологии щитовидной и паращитовидных желез на модели свиньи. При проведении оперативных вмешательств на шее был успешно применен эндоскопический подход. По результатам гистологического исследования установлено, что локальная криодеструкция щитовидной и паращитовидных желез приводит к их полному разрушению без повреждения окружающих тканей. Подтверждением эффективности операции служили данные, полученные на 40-е сутки после вмешательства об уровне свободного T_4 и кальция, которые значимо не отличались от дооперационных значений.

34.5.3. Криохирургия в офтальмологии

Применение холода при лечении больных с офтальмологическими заболеваниями в течение длительного времени ограничивалось операциями по поводу катаракты. Извлечение хрусталика особенно удобно производить с помощью его криoadгезии (прикрепления) к активному наконечнику криоинструмента, температура которого должна быть в пределах от минус 50 до минус 80°C. Криoadгезия между охлажденным инструментом и хрусталиком позволяет проводить тракцию (вытяжение) силой до 300–400 г без угрозы разрыва капсулы хрусталика (рис. 34.14.).

Кроме интракапсулярной криоэкстракции катаракты, криогенный метод дал принципиально новые возможности в решении ряда офтальмологических проблем, в том числе: подготовка сосудистых белков к пересадке, разрушение опухолей, лечение различных заболеваний роговицы.

Хорошие результаты были получены при использовании криогенного метода в лечении отслойки сетчатой оболочки глазного яблока. Локальное замораживание склеры, производимое непосредственно или через конъюнктиву, вызывает асептическое воспаление оболочек глаза в зоне замораживания, характеризующееся четкой стадийностью альтеративных,

экссудативных, пролиферативных процессов, заканчивающихся формированием хориоретинального рубца соответственно зоне воздействия. При этом опасность возникновения массивных кровотечений в сетчатку, хороидею (сосудистую оболочку глаза), стекловидное тело сводится к минимуму, в связи с лучшей переносимостью низких температур стенками крупных сосудов.

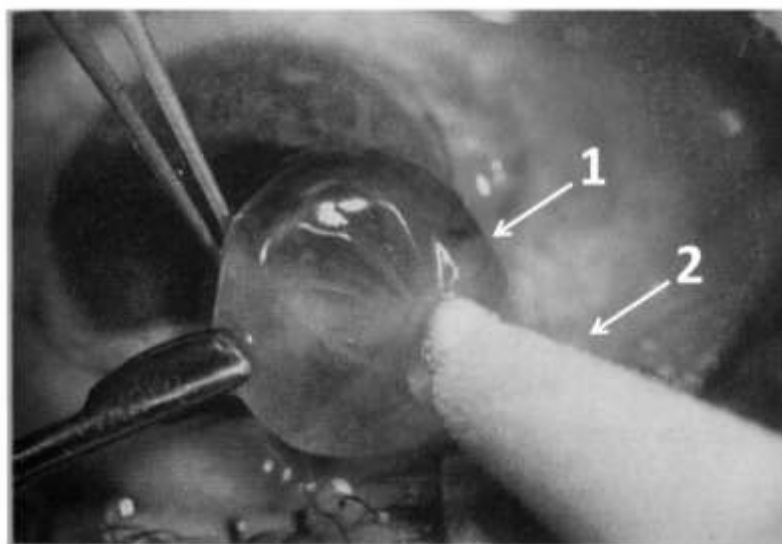


Рис. 34.14. Удаление хрусталика криоэкстрактором. 1 – хрусталик; 2 – криоэкстрактор (по Э.И. Канделю).

Внедрение локального замораживания области цилиарного тела с целью снижения внутриглазного давления у больных глаукомой возникло в 60-х годах XX века. Непосредственный гипотензивный эффект обусловлен реактивным воспалением увеального тракта, в состав которого входит радужная оболочка, ресничное тело и сосудистая оболочка, что сказывается на уменьшении продукции внутриглазной жидкости. По результатам экспериментальных и клинических работ установлено, что криогенный метод эффективен, безопасен и может быть применен как самостоятельно, так и в сочетании с другими антиглаукоматозными операциями. Локальное замораживание наиболее эффективно в случаях открытоугольной глаукомы, преимущественно у людей пожилого возраста.

Простота, доступность, хорошая переносимость и высокая эффективность послужили быстрому распространению криогенного метода не только при лечении герпетических и других форм поверхностных кератитов, но и другой патологии роговой оболочки и окружающих ее отделов глазного яблока.

34.5.4. Криохирургия в отоларингологии

В зависимости от того или иного положительного эффекта при использовании низких температур, криовоздействие на ЛОР-органы используется с различными терапевтическими целями. Так, например,

гемостатический эффект от криовоздействия широко используется при остановке носовых кровотечений различной этиологии. Остановка незначительного кровотечения (паренхиматозное или кровотечение из мелких сосудов) во время криохирургических вмешательств объясняется внутрикапиллярным тромбозом в участке замораживания. Массивные кровотечения из крупных артериальных стволов локального замораживания не могут быть остановлены этим методом.

В ряде случаев локальное криовоздействие применяется с целью разрушения отдельных структур и органов при воспалительных и опухолевых процессах. Криодеструкция небных миндалин – малоинвазивный и эффективный метод хирургического лечения хронического тонзиллита у взрослых и детей, который можно проводить в амбулаторных условиях под местной анестезией. Преимуществами эндоскопического криовоздействия являются быстрое и бескровное разрушение патологической ткани с дальнейшим восстановлением нормальной структуры и функциональной активности оставшейся небной миндалины, а также с гибелью патогенной микрофлоры.

Объективным критерием эффективности криохирургического метода является нормализация всех иммунологических показателей небных миндалин. Для исчезновения симптомов хронического тонзиллита и восстановления функции небных миндалин проводят 2–3 сеанса криодеструкции. Полная эпителизация наступает через месяц. К недостаткам данного метода можно отнести необходимость проведения криодеструкции в несколько этапов.

Механизм терапевтического действия локальных криовоздействий при хронических фарингитах объясняется следующими обстоятельствами (по Б.П. Сандомирскому):

1. Криодеструкция гипертрофированных хронических воспалительных участков лимфаденоидной ткани на слизистой оболочке ротовой части глотки устраняет очаги хронической инфекции.

2. При замораживании слизистой оболочки происходит гибель дистрофически измененных нервных окончаний и волокон с последующим прорастанием молодых аксонов, что способствует восстановлению нервной трофики, улучшению репаративной регенерации.

3. В результате криовоздействия происходит медленное всасывание белковых продуктов из зоны дистрофических изменений. Это оказывает стимулирующий эффект по типу тканевой терапии.

4. На криовоздействие наблюдается иммунный ответ организма, приводящий у больных хроническим фарингитом к нормализации показателей гуморального и клеточного иммунитета.

Хорошо зарекомендовал себя метод криодеструкции при полипах и гипертрофии носовых раковин, папиллом глотки, а также при новообразованиях голосовых связок: при рецидивирующей гранулеме и контактной язве голосовых связок. Локальное замораживание также

применяют с паллиативной целью у людей, страдающих болями и дисфагией на почве неоперабельного рака гортани с метастазами.

34.5.5. Криохирургия грудной полости

Развитию клинической торакальной криохирургии способствовали экспериментальные работы на животных. Первое масштабное исследование в Европе по лечению бронхиальной карциномы с помощью специально разработанного жесткого зонда было проведено в 1986 г.

Криохирургический метод, основанный на разрушении тканей с помощью низких температур, нацелен на лечение пациентов с неоперабельным центральным обструктивным раком легких. Эндобронхиальная криотерапия с применением жестких и гибких криозондов, по сравнению с другими методами лечения, наиболее эффективна, поскольку минимизирует осложнения и хорошо переносится пациентами. Для лечения местно-распространенного рака легких в настоящее время используют чрескожную криоабляцию. Криовоздействие у больных с нерезектабельной опухолью приводит к уменьшению массы оставшейся опухолевой ткани и тем самым способствует восстановлению легочного и дыхательного объема, обеспечивает условия для проведения лучевой и химиотерапии, а также продлевает ремиссию (рис. 34.15.).



Рис. 34.15. Криодеструкция сегментарных бронхов с использованием криохирургической эндоскопической системы «ERBECRYO 2» (Германия).

Криохирургическая абляция позволяет улучшить качество жизни пациентов при тяжелых стадиях заболевания. Кроме того, состояние больных раком легких (30%), как правило, усугубляется центральной обструкцией дыхательных путей – тяжелейшим синдромом, который может быть причиной нетрудоспособности и смертности.

К недостаткам данного метода можно отнести отсутствие универсальных криозондов для бронхоскопов и отсроченные результаты криотерапии, связанные с удалением некротических тканей, которые проявляются дыхательной недостаточностью вследствие обструкции дыхательных путей.

Кроме того, криовоздействие целесообразно применять для радикального удаления микроинвазивного рака и неэпителиальных доброкачественных опухолей (гемангиомы, лейомиомы, липомы, фибромы, хондромы, гамартомы и др.).

Клинически доказана эффективность использования криоабляции при нарушении сердечного ритма. Это позволило кардиохирургам применять данный метод как в сочетании с вмешательствами на клапанах сердца при ишемической болезни сердца, так и самостоятельно. По данным мировой литературы, торакоскопические технологии позволяют безопасно осуществлять резекцию ушка левого предсердия, а также выполнять абляцию коллектора легочных вен на работающем сердце при лечении фибрилляции предсердий. Возможно, в будущем такого рода операции можно будет проводить не только радиочастотным и ультразвуковым, но и криохирургическим способом.

34.5.6. Криохирургия в гастроэнтерологии

В экспериментальной гастроэнтерологии на модели свиней продемонстрирована возможность применения низких температур в дистальной части пищевода с помощью специальной криогенной системы, снабженной эзофагоскопом. Исследования показали, что криохирургический метод позволяет индуцировать контролируемый поверхностный некроз слизистой оболочки пищевода с последующим полным ее заживлением, но при этом у 3-х из 20 пациентов по всей окружности пищевода отмечалось образование стриктур.

В работе Р.Ж. Pasricha представлены результаты экспериментального и клинического применения криотерапии на пищеводе. С помощью катетера, позволяющего доставлять жидкий азот через эндоскоп, на модели собак проводили криовоздействие на дистальную часть пищевода. При анализе гистологических препаратов через три недели после воздействия была установлена полная реэпителизация очага криодеструкции.

В работе В.И. Пономарева представлены результаты воздействия низкими температурами на рубцы при стенозах пищевода у детей. Неподвижным аппликатором на аппарате КМТ-2 (ОАО «ЕЛАМЕД», Россия) проводили криовоздействие на мембранозные рубцы пищевода и гортани. Использование мобильного криоаппликатора оправдано в случаях протяженных рубцов пищевода как в качестве самостоятельного метода лечения, так и в комплексе с бужированием (введением гибких бужей для расширения канала) пищевода.

Данные многоцентровых исследований подтверждают возможность использования указанного способа лечения как при предраковых состояниях заболеваний пищевода (пищевод Баррета и дисплазия), так и при начальной форме опухолевого процесса. После эндоскопической криотерапии у 72–100% пациентов наблюдалось полное излечение пищевода Баррета, а у 61–100% больных с ранней стадией рака пищевода – полное выздоровление.

В работе В. Greenwald показано, что криохирургический подход безопасен и хорошо переносится пациентами с раком пищевода. Наибольшая его эффективность в качестве паллиативного метода лечения отмечается на более поздних стадиях заболевания, это связано с хорошим локальным контролем криовоздействия, отсутствием серьезных побочных эффектов и низким процентом осложнений.

Схема криовоздействия на патологически измененную ткань печени обусловлена особенностями строения данного органа.

Во-первых, криохирургическая аппаратура должна обладать достаточно большой хладопроизводительностью, поскольку печень имеет большую массу и мощный кровоток.

Во-вторых, экспериментально установлено, что криодеструкция при сверхнизких температурах приводит к образованию в печени очага крионекроза, размер которого зависит от экспозиции. В течение 4–8 недель после криодеструкции происходит замещение асептического некроза соединительнотканым «нежным» рубцом.

В 1997 г. в Канаде была впервые проведена лапароскопическая криохирургическая операция у пациентов с опухолью печени. В 1998 г. во Франции появилось сообщение о лечении неоперабельной опухоли печени с применением чрескожной криодеструкции.

В экспериментальных работах показана целесообразность использования низких температур при лапароскопической субтотальной холецистэктомии (удалении желчного пузыря). В частности, криодеструкция слизистой оболочки оставшейся части задней стенки желчного пузыря расширяет возможности лапароскопической холецистэктомии при остром калькулезном холецистите. Она выполняется в том случае, когда из-за рубцовых изменений возникают технические трудности отделения задней стенки желчного пузыря от ложа. Кроме того, криовоздействие, в отличие от электрокоагуляции, не приводит к гибели печеночной паренхимы печени, а, напротив, стимулирует местные иммунологические реакции, способствующие ускорению регенерации.

Кроме того, криодеструкция показана большинству пациентов с раком поджелудочной железы, поскольку она может заменить стандартную операцию. Литературные данные подтверждают возможность проведения криодеструкции пациентам с местно-распространенным и неоперабельным раком поджелудочной железы, а также криоабляции при локальных рецидивах заболевания.

34.5.7. Крихирургия в проктологии

Современная крихирургическая аппаратура, обеспечивающая эффективное и быстрое замораживание патологически измененных тканей организма человека, применяется для некоторых заболеваний прямой кишки и перинатальной области. Криогеморроидэктомия обладает рядом существенных преимуществ:

- может проводиться в амбулаторных условиях;
- не требует обезболивания;
- приводит к раннему восстановлению трудоспособности. После отторжения некротических узлов образуются нежные рубцы.

При выпадающих анальных полипах после проведения криодеструкции происходит формирование демаркационной линии, затем усиливается набухание зоны некроза, и в последующем некротические ткани отпадают на 10-14 день. Положительные результаты крихирургического лечения показаны при раке прямой кишки как в качестве радикального, так и паллиативного способа. Криодеструкции могут подвергаться разные гистологические формы рака прямой кишки (аденокарцинома, плоскоклеточный рак и т.д.). Улучшение самочувствия отмечается сразу же после первого сеанса криовоздействия. Исчезает болевой синдром, уменьшается выделение слизи и, как следствие, нормализуется общее состояние (настроение, сон и аппетит).

34.5.8. Крихирургия в урологии

Крихирургические методики в урологии на сегодняшний день нашли широкое применение. В историческом аспекте первые попытки использования низких температур в урологии с применением криоскальпеля описаны в 1969 году. Именно гемостатические свойства замораживания позволили применить этот метод при рассечении почки. Криоабляция почек позиционируется как альтернатива классическому способу удаления опухолей почек. По сравнению с радиочастотной абляцией криодеструкция обладает рядом преимуществ: возможностью четкого контроля за краями ледяного шара и наличием менее выраженных изменений вокруг зоны абляции после первичного воздействия.

Описаны случаи использования крихирургического метода при онкозаболеваниях мочевого пузыря. Он показан при папилломах, папиллярных солидных инфильтрирующих раках. При проведении этих операций криодеструктор вводится в мочевой пузырь либо через уретру, либо путем прокола брюшной стенки мочевого пузыря. Использование эндоскопа позволяет визуально оценить место патологического образования и интраоперационно решить вопрос об объеме и характере оперативного вмешательства.

Криоабляция простаты в настоящее время представляет собой малоинвазивный и высокоэффективный способ лечения рака предстательной железы. Лечение сопровождается небольшим количеством осложнений и

позволяет добиться высокой безрецидивной выживаемости. Первая криоабляция простаты была проведена в 1966 г. М. Gonder с использованием одной трансуретральной иглы для лечения инфравезикальной обструкции, вызванной увеличением предстательной железы. В качестве хладагента использовался жидкий азот, а процесс замораживания контролировался пальпаторно *per rectum* (через прямую кишку).

Криоабляция предстательной железы – локальное замораживание и девитализация тканей. Данный метод позволяет создать зону некроза необходимой формы и размера для деструкции пораженной ткани железы и прилежащей к ней здоровой ткани. Американская и Европейская ассоциация урологов признали криоабляцию клиническим методом терапии локализованного рака предстательной железы (рис. 34.16.).

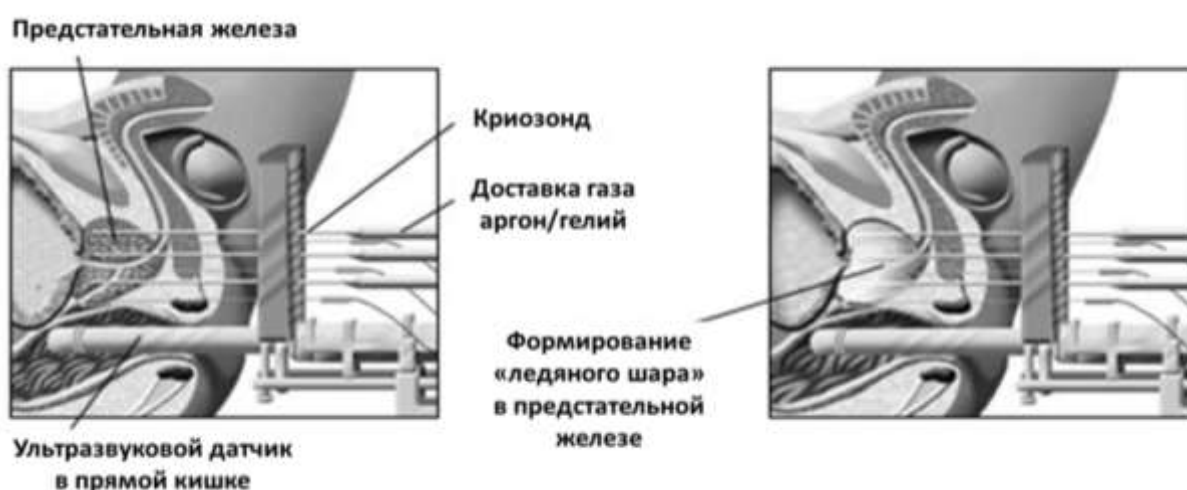


Рис. 34.16. Криодеструкция предстательной железы с использованием тонкоигольных криозондов. После введения тонкоигольных криозондов под контролем ультразвукового исследования проводится криодеструкция предстательной железы заданной экспозиции. При необходимости данную манипуляцию повторяют.

На сегодняшний день применяют три вида криодеструкции предстательной железы. Наиболее эффективна эндоскопическая криодеструкция. Ее проводят через эпицистостому под эндоскопическим контролем с холодовой экспозицией два раза по 10 мин с интервалом 5–7 мин. Дальнейшее отмывание некротических масс осуществляют через эпицистостому в течение 3–4 недель.

34.5.9. Криохирurgia в гинекологии

Применение холода с лечебной целью в акушерско-гинекологической практике хорошо зарекомендовало себя и широко используется в настоящее время. Так же, как и в других областях клинической медицины, результаты применения криохирургии в гинекологии свидетельствуют о ее

преимущества по сравнению с традиционными консервативными и оперативными методами.

Показаниями к применению криохирургических методов лечения в гинекологии являются: эрозии, диспластические процессы после удаления полипов, эндометриоз матки, лейкоплакии, остроконечные кондиломы (не поддающиеся консервативному лечению), дисфункциональные маточные кровотечения, гиперпластические процессы эндометрия, аденомиоз матки, развивающийся вблизи эндометрия.

Наружные половые органы, влагалище и шейка матки являются легкодоступными для криовоздействия органами. Современные криохирургические приборы позволяют проводить криовоздействия также на канал шейки матки и эндометрий.

Безболезненность, бескровность, минимальная травматичность делают криохирургию методом амбулаторного лечения. Отсутствует необходимость в анестезии и в последующем накладывании швов. Кроме того, часто в дальнейшем отпадает необходимость в госпитализации больных. Для лечения патологических процессов в области шейки матки первым применил криотехнику в нашей стране В.И. Грищенко (1969 г.).

Криовоздействия в гинекологии применяют в форме орошения хладагентом и контактного замораживания. Для гинекологических операций большое значение имеет форма наконечника криозонда. Так, для криовоздействий на наружные половые органы и влагалище более удобными для применения являются плоские зонды и в виде шпателя, на шейку матки – изогнутой грибовидной формы, плотно прилегающие к наружному отверстию канала шейки матки, где чаще всего возникает поражение матки. Для криокоагуляции шейки матки при эрозиях обычно используют криозонд, позволяющий одновременно вызвать криокоагуляцию тканей в канале шейки матки и на поверхности влагалищной части матки. Для внутришеечного криовоздействия используют цилиндрические наконечники с диаметром, соответствующим диаметру отверстия матки.

Ряд авторов на обширном клиническом материале убедительно показали, что после лечения холодом происходит нормализация состояния шейки матки, отсутствуют рецидивы и осложнения. Вместо разрушения ткани в виде кратеров при электроприжигании, после криовоздействия отмечается равномерная деструкция эпителиальной и субэпителиальной ткани. В отличие от диатермокоагуляции, при криолечении регенерация происходит под эластичным струпом и не создается условий для имплантации эндометрия во время менструации, возникновения эндометриоза шейки матки. Это позволяет проводить такое лечение в любую фазу менструального цикла.

К преимуществам криохирургического метода при заболеваниях шейки матки относятся:

- возможность четкого воздействия на патологический очаг с минимальным повреждением окружающих здоровых тканей; отторжение

очага криовоздействия происходит с одновременным замещением его здоровой тканью;

- после криодеструкции полностью восстанавливаются ткани, специфичные для данного органа, отсутствует интоксикация на момент отторжения участка крионекроза;

- при криодеструкции происходит активация естественных защитных механизмов организма (иммунной системы) в очаге криовоздействия. Заболеваниям шейки матки часто сопутствуют иммунодефицитные состояния, под влиянием криовоздействия активируются клеточные факторы, повышается функциональная активность Т-лимфоцитов, отмечается корригирующее влияние на показатели гуморального иммунитета, поэтому процедура может быть использована для лечения некоторых форм шеечного бесплодия;

- криохирургический метод лечения патологических процессов шейки матки не оказывает вредного воздействия на менструальную и детородную функции женщины.

В литературных источниках широко представлены результаты внутриматочного эндоскопического криохирургического вмешательства с целью лечения патологии эндометрия. Установлено, что внутриматочная органосохраняющая криохирургическая операция позволяет повысить эффективность лечения гиперпластических заболеваний эндо- и миометрия до 94,0% и предотвратить тромбоэмболические осложнения.

34.5.10. Криохирurgia в дерматологии

Кожные заболевания, при которых целесообразно использование низких температур, могут быть разделены на 2 группы (по Б.П. Сандомирскому) (табл. 34.2):

Таблица 34.2. Первичные опухоли кожи, поддающиеся холодовой деструкции.

Генез	Доброкачественные опухоли, в том числе предраковые	Злокачественные опухоли
Эпителиальные опухоли	Папиллома, Себорейная (сенильная) кератома, Кожный рог, Кератома (сальный, или псевдокарциноматозный моллюск), Кератоз	Базальноклеточный рак, Плоскоклеточный рак кожи
Соединительнотканые опухоли	Ангиофиброма	Саркома и фибросаркома, Дерматофибросаркома
Сосудистые опухоли	Гемангиома Ангиокератома Лимфангиома	Злокачественная гемангиома Эндотелиома Ангисаркома Саркома Капоши Лимфангиосаркома

1. Вирусные процессы (вульгарные бородавки, остроконечные кондиломы, контагиозные моллюски);
2. Опухолевые процессы.

Холодовое лечение как метод выбора следует использовать при следующих показателях:

1. Доброкачественные опухоли, в том числе сосудистого характера, у больных со склонностью к келоидозу.
2. Опухоли, расположенные на лице, где другие методы дают худшие результаты.
3. Рецидивирующие опухоли после хирургического, лучевого, электрохирургического, химиотерапевтического лечения.
4. Новообразования у больных с тяжелым соматическим статусом, у которых другие методы лечения (хирургическое, лучевое) не могут быть использованы.
5. Быстро прогрессирующие и запущенные опухоли больших размеров, осложняющиеся эрозивными кровотечениями, при которых может быть достигнуто временное облегчение.

Технология криодеструкции в значительной степени определяется глубиной расположения удаляемого объекта. Для удаления поверхностных образований (вульгарных и плоских бородавок, остроконечных кондилом, пигментных пятен, гипертрофических рубцов) действия выполняют в следующей последовательности:

1. Кожу перед процедурой обрабатывают 70% спиртом.
2. Аппликатор прикладывают к удаляемому объекту с экспозицией 10-30 секунд.
3. При необходимости эту процедуру повторяют несколько раз.

В первую минуту после окончания процедуры появляется резко выраженный отек тканей; через 6–24 ч образуется эпидермальный пузырь с серозным или геморрагическим содержимым; через 3–7 суток происходит подсыхание оболочки пузыря; через 9–10 суток оболочка пузыря отторгается.

Замораживание с помощью распылителей жидкого азота или аппликаторов дает большие удобства и уверенность в достаточности криовоздействия (рис. 34.17.).

Метод холодовой деструкции обладает несомненными преимуществами перед другими способами, так как выполняется обычно амбулаторно, обеспечивает полное излечение за одно посещение, не требует дополнительных действий по обезболиванию, не дает осложнений, не оставляет грубых рубцов и келоидов.

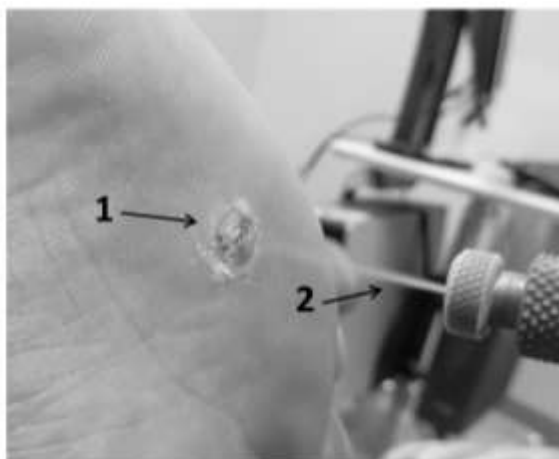


Рис. 34.17. Криодеструкции кожи стопы с использованием криораспылителя (по Е. Zimmerman). 1 – локализация базальноклеточного рака кожи на подошвенной поверхности стопы; 2- парожидкостная струя азота.

34.5.11. Криохирургия костей и суставов

В ряде экспериментальных работ показано, что дополнительное повреждение структур ложного сустава (после перелома трубчатой кости), связанное с замораживанием-отогревом, приводит к сосудистым реакциям гиперемического типа, что способствует интенсификации пролиферативных реакций, процессов дифференциации по остеогенному типу и в дальнейшем восстановлению целостности кости.

Установлено, что контактное криовоздействие на новообразования костей не нарушает стадийность репаративного остеогенеза. Удлинение начальных стадий формирования хрящевой, а затем костной ткани связано с нарушением структурной организации костной ткани после локального криовоздействия на стенки резекционного дефекта. Отмечены морфологическая идентичность и одинаковая скорость репаративной регенерации костной ткани при ауто- и аллопластике после криохирургии.

Показано, что воздействие артроскопическим криоаппликатором на область коленного сустава, разрушенного вследствие травм и/или дегенеративно-дистрофических изменений, стимулирует хондрогенез суставного хряща и приводит к формированию хрящевого фиброзно-гиалинового регенерата.

Артроскопическая криопластика, дополненная при необходимости парциальной или тотальной менискэктомией, частичной хейлэктомией, синовэктомией, может быть операцией выбора при хирургическом лечении последствий травм и остеоартроза коленного сустава. Ее проведение уменьшает выраженность суставного синдрома, увеличивает период ремиссии.

Метод артроскопической криодеструкции хорошо себя зарекомендовал и для удаления синовиальной оболочки суставов при бурситах различной локализации и хроническом артрите.

34.6. Итоги и перспективы

Метод криодеструкции позволяет расширить рамки операбельности различных патологических состояний организма, в том числе и резектабельности опухолей, а совершенствование технологий выполнения криохирургических операций, криохирургического оборудования, методик мониторинга делает криохирургию одним из наиболее важных компонентов комбинированного и комплексного лечения больных.

Наряду с очевидным прогрессом криохирургических технологий, криохирургия до сих пор находится в стадии активного развития и требует проведения углубленных научных исследований. Раскрыть реальный потенциал криохирургии возможно при создании научной экспериментально-практической базы для внедрения криохирургических методик в полном объеме в практическую медицину. Перспективы развития исследований в данной области хирургии состоят в расширении использования низких температур в эндоскопической хирургии, что позволит улучшить результаты хирургического лечения больных.

Список рекомендованной литературы:

1. Грищенко В.И., Сандомирский Б.П. Практическая криомедицина. – К.: Здоров'я, 1987. – 246 с.
2. Ионкин Д.А., Кунгурцев С.В., Чжао А.В. Этапы развития криохирургии // Высотехнологическая медицина. – 2014. – Т. 1, №1. – С. 4–15.
3. Кандель Э.И. Криохирургия. – М.: Наука, 1974. – 134 с.
4. Кожевников Е.В., Кожевников В.А. Артроскопическая криопластика в лечении остеоартроза коленного сустава // Проблемы клинической медицины. – 2005. – Т. 1, №1. – С. 101–105.
5. Кунгурцев С.В., Локтев Н.П. Криохирургическая аппаратура. Настоящее и будущее // Российский онкологический журнал. – 2014. – Т. 19, №4. – С. 31–32.
6. Песня-Прасолов С.Б., Васильев С.А. Применение ультранизких температур в нейроонкологии // Нейрохирургия. – 2013. – № 3. – С. 92–98.
7. Слета И.В., Чиж Н.А., Луценко Д.Г., Олефиренко А.А., Сандомирский Б.П. Криохирургия при диффузных заболеваниях печени // Клінічна хірургія. – 2010. – Т. 7, № 6. – С. 27–33.
8. Чиж Н.А. Эндоскопическая криохирургия // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2017. – Т. 27, № 1. – С. 3–18.
9. Шакуров А.В., Пушкарев А.В., Пушкарев В.А., Цыганов Д.И. Предпосылки для разработки нового поколения криохирургических аппаратов (обзор) // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9, №2. – С. 178–189.

10. Шафранов В.В., Борхунова Е.Н., Костылев М.А. и др. Механизм разрушения биологических тканей при локальной криодеструкции // Вест. Росс. акад. естеств. наук. – 2012. – №1. – С. 68–75.
11. Ablin R.J., Soanes W.A., Gonder M.J. Prospects for cryoimmunotherapy in cases of metastasizing carcinoma of the prostate // Cryobiology. – 1971. – №8. – P. 271–279.
12. Cooper I.S., Lee A. Criostatic congelation: a system for producing a limited controlled region of cooling or freezing of biologic tissues // J. Nerv. Ment. Dis. –1961. – Vol. 133. – P. 259–263.
13. Gage A.A. History of cryosurgery // Sem. Surg. Oncol. – 1998. – Vol. 14. – P. 99–109.
14. Johansson K.A., Marcoux V.S., Ronksley P.E., Ryerson C.J. Diagnostic Yield and Complications of Transbronchial Lung Cryobiopsy for Interstitial Lung Disease. A Systematic Review and Metaanalysis // Ann Am Thorac Soc. – 2016. – Vol. 13, №10. – P. 1828–1838.
15. Larson T.R., Robertson D.W., Corica A., Bostwick D.G. In vivo interstitial temperature mapping of the human prostate during cryosurgery with correlation to histopathologic outcomes // Urology. – 2000. – Vol. 55, №4. – P. 547–552.
16. Xu K., Korpan N., Niu L. Modern cryosurgery for cancer. – World Scientific, 2012. – 901 p.

Глава 35. Крионика

35.1. Введение в крионику. 35.2. История и предпосылки развития крионики. 35.3. Технология крионирования человека. 35.4. Организации, занимающиеся крионированием человека. 35.5. Перспективы крионики

35.1. Введение в крионику

Основоположником крионики считают Р. Эттингера благодаря написанию своей знаменитой книги «Перспективы бессмертия». В своей книге он развил концепцию «приостановленной смерти», которая гласит о том, что процесс умирания не мгновенный акт, а процесс, протяженный во времени. Считают, что этот процесс может быть приостановлен путем криоконсервирования с перспективой оживления умершего человека в будущем.

Концепция «приостановленной смерти» постулирует, что современные способы диагностики не могут с абсолютной точностью констатировать наступление смерти, потому что смерть относительна и зависит от уровня развития медицинских технологий и их доступности в критический момент. Некоторые криобиологи считают, что человек, которого современная медицина считает мертвым, может быть оживлен в будущем, если в момент смерти с ним будут рядом специалисты по крионике, которые смогут «приостановить» процесс умирания путем заморозки до криогенных температур.

На современном этапе развития крионики криоконсервация умерших людей является необратимой. Пока науке не известны случаи успешного криоконсервирования и оживления даже животных, размер которых превышает несколько миллиметров. Еще раз отметим, что криоконсервация с успехом применяется только для долгосрочного хранения клеточных суспензий, кусочков тканей, эмбрионов на ранних стадиях развития, микроскопических биологических объектов.

Но, несмотря на фантастическую идею крионики — оживление умерших людей, она уже сейчас представляет ценность для будущего поколения, в частности, крионавты могут оказать неоценимую услугу антропологической науке.

Кроме того, эксперименты, проведенные на собаках и кошках в организации «Alcor», позволили укрепить главное утверждение крионики о том, что существует значительный интервал времени между клинической смертью, оцениваемой по остановке дыхания и кровообращения, и смертью, которая, согласно утверждениям крионики, наступает при необратимом разрушении головного мозга.

Крионика — исследовательская деятельность, связанная с разработкой технологий замораживания и хранения юридически умерших людей при ультранизких температурах в надежде на восстановление их жизни в будущем.

Криопациент – умерший человек, проходящий подготовительные процедуры для крионирования.

Крионавт – криопациент, который был полностью заморожен до температуры минус 79 или минус 196°C.

Нейропациент – криопациент, у которого была заморожена только голова или головной мозг.

При разработке методов замораживания умерших людей специалисты-крионисты опираются на знания и достижения в области криобиологии, криогенной инженерии и клинической медицины.

35.2. История и предпосылки развития крионики

Благодаря открытому письму, которое в 2016 г подписали 69 ученых мира из таких высших учебных заведений, как Гарвардский и Кембриджский университеты, МИТ, НАСА, крионика является признанной и обоснованной областью исследований, задачей которой является сохранение людей с целью их оживления в будущем. В письме утверждается, что благодаря существующим методам и технологиям будущего будет возможна реанимация крионированных пациентов. Считают, что это подтверждают следующие факты:

- в 1966 г. было установлено, что кошачий мозг может восстанавливать свою электрическую активность после замораживания до минус 20°C;
- в 1973 г. было показано, что тонкая кишка собак может быть успешно восстановлена после криоконсервирования при минус 196°C;
- в 1974 г. в результате экспериментов было установлено, что мозг кошки восстанавливает свою электрическую активность после низкотемпературного хранения в течение 7 лет;
- в 1984 г. было установлено, что методом витрификации можно замораживать крупные органы;
- в 2000 г. была проведена успешная аутотрансплантация криоконсервированной сосудистой ткани;
- в 2004 г. была проведена успешная трансплантация почек криоконсервированных при минус 45°C;
- в 2004 г. была проведена витрификация целого мозга, который после отогрева не имел существенных повреждений;
- в 2006 г. впервые была установлена возможность витрификации срезов гиппокампа с сохранением их структуры и функции;
- в 2009 г. была проведена успешная витрификация и дальнейшая трансплантация замороженных почек;
- в 2015 г. впервые было зарегистрировано сохранение памяти у нематоды *Caenorhabditis elegans* после замораживания-отогрева;
- в 2015 г. удалось полностью крионировать и восстановить мозг кролика и свиньи.

Таким образом, многочисленными экспериментами показано, что многие ткани и органы животных, а также некоторые небольшие целые организмы могут быть заморожены, а затем разморожены с восстановлением активности. Это дает надежду на успешное решение проблем крионирования человека.

35.3. Технология крионирования человека

Рассмотрим на примере организации «Alcor» технологию крионирования умершего человека (табл. 35.1).

Таблица 35.1. Основные стадии технологии крионирования

Стадии					
I	II		III	IV	V
Контракт на крионирование	Подготовка криопациента к стабилизации и крионированию		Стабилизация криопациента	Насыщение криопротектором путем перфузии	Охлаждение до температуры -196°С
Юридическая констатация смерти, разрешение на крионирование, время его начала	Тип крионирования		1.Кардиопульмональная поддержка 2.Гипотермическое охлаждение 3.Введение антикоагулянта, лекарств 4.Замена крови	Витрифицирующие растворы	Процесс занимает не менее 12 часов
	Тело полностью (крионавт)	Головной мозг в черепной коробке (нейропациент)		M22, LM5	

Контракт на крионирование заключается непосредственно юридической службой в организации «Alcor».

Юридическая констатация смерти и приезд бригады из «Alcor», которая проводит первые процедуры подготовки криопациента к крионированию (перевязка яремных вен). При этом специалисты делают все возможное, чтобы максимально сократить время между смертью «de jure» и «de facto».

Стабилизация криопациента включает 4 процедуры – кардиопульмональную поддержку, гипотермическое охлаждение, введение антикоагулянта и лекарственных препаратов, и замену крови.

Гипотермическое охлаждение следует начинать сразу после констатации смерти человека. Для этого используют ванну с сухим льдом и водой. Криопациента полностью погружают в нее, при этом следует хорошо погрузить голову, пах, подмышечные впадины,

Кардиопульмональную поддержку осуществляют для восстановления циркуляции крови и мозга кислородом, распространения лекарств для

поддержки обмена веществ в тканях и защиты их от ишемии, увеличения скорости охлаждения пациента извне. Это осуществляется в ледяной ванне с помощью специальных приборов.

Введение антикоагулянтов (Гепарин, Стрептокиназа, Пропофол, Цитрат натрия и др.) и лекарственных препаратов (ГЭК, Маалокс, Маннит) зачастую осуществляют совместно.

В некоторых случаях требуется замена крови, которая способствует поддержанию жизнеспособности головного мозга, предотвращает свертывание крови. Для этого используют перфузионные системы типа Stockert SCPC в раствор МНР-2. Эта процедура проводится только в том случае, когда криопациент не имеет никаких противопоказаний к ее проведению.

Если эти подготовительные стадии проходят без осложнений, то хирургия и фармакологические воздействия завершаются в течение 45 минут. В течение следующих 15 минут криопациент охлаждается до $+5^{\circ}\text{C}$ и в таком виде транспортируется в главное здание «Alkor» для IV этапа – насыщения тканей криопротектором.

Насыщение органов и тканей криопротектором осуществляется с целью защиты криопациента от воздействия криоповреждений в процессе замораживания (рис.35.1). В настоящее время в «Alkor» используют криозащитный раствор М22 или его модификацию LM5 для уменьшения отека у криопациентов во время перфузии. По мнению исследователей, раствор М22 более эффективно защищает мозг от криоповреждений, чем глицерин. В состав витрифицирующего раствора М22 входит: 22,3% ДМСО, 12,8% формамида, 16,8% ЭГ, 3% N-метилформамида, 4% 3-метокси-1,2-пропандиол, 2,8% ПВП К2, 1% X-1000, 2% Z-1000.

Криозащитный раствор М22 для насыщения тканей тела вводят в возрастающих концентрациях, при этом используется собственная система кровообращения криопациента, которого подключают к искусственной системе циркуляции крови. Длительность этого этапа составляет от 2 до 4 ч.

При замораживании нейропациентов отсечение головы от тела происходит только после предоставления вышеперечисленного комплекса процедур.

После завершения процедуры насыщения тела криозащитным раствором криопациента отсоединяют от системы искусственного поддержания циркуляции крови и начинают процедуру крионирования.

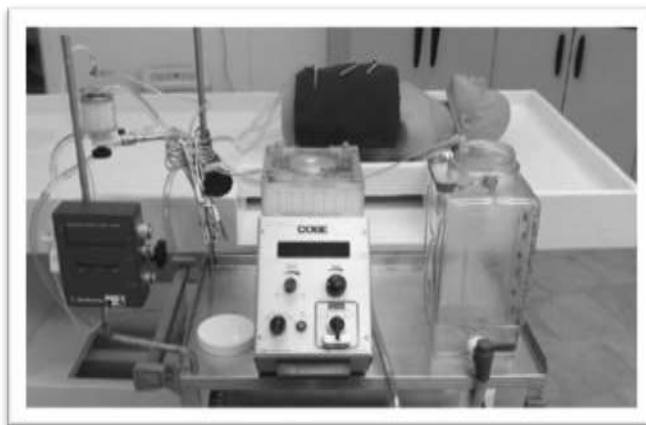


Рис. 35.1. Моделирование процесса насыщения тела криоконсервирующим раствором. На рисунке изображены манекен и приборы для контролируемой перфузии организма через кровеносную систему.

Процесс крионирования тела человека начинают с того, что тело помещают в два пластиковых пакета, непроницаемые для жидкостей. Далее криопациента помещают в ванну с холодным силиконовым маслом и сухим льдом на 36-48 ч, в которой постепенно снижается температура от 5 до минус 79°C (рис. 35.2). Когда криопациент охладится до этой температуры, его быстро вынимают, снимают верхний пакет, переносят в мешок и оправляют в сосуд Дьюара для дальнейшего охлаждения до температуры минус 196°C. Процесс замораживания до этой температуры длится приблизительно 5 дней. После этого процесс крионирования считают завершенным и осуществляют долгосрочное хранение криопациентов.



Рис. 35.2. Оборудование (А) и процесс (Б) осуществления охлаждения тела.

35.4. Организации, занимающиеся крионированием людей

Во всем мире существует всего 4 организации, которые занимаются развитием идей крионики и внедрением их в практическую деятельность – Институт крионики (Cryonics Institute), «Алькор» («Alcor») (Alcor Life

Extension Foundation)), компания «Криорус», а также Общество бессмертия (Immortalist Society).

На данный момент крупнейшей организацией по замораживанию людей является «Алькор». Эта организация впервые была зарегистрирована в 1972 г. в США штате Аризона. Первым крионавтом, замороженным в этой организации, был профессор психологии Д. Бедфорд. До сих пор тело профессора находится на криосохранении в одном из сосудов Дьюара.

По состоянию на 31 июля 2017 года членами «Alcor» являются 1139 человек, а 152 человеческих тела уже находятся на криосохранении. При этом количество крионированных мужчин превышает количество таковых женщин. Кроме того, «Alcor» занимается крионированием животных.

Для сохранения замороженных тел в организации «Alcor» используют сосуд Дьюара «Bigfoot» (рис. 35.3). Он позволяет хранить 4 целотельных крионавта и шесть нейропациентов при температуре минус 196°С.



Рис. 35.3. Сосуд Дьюара «Bigfoot» для низкотемпературного хранения крионавтов и нейропациентов.

В 1976 г в США штате Мичиган был создан *Институт крионики*, президентом которого стал Эттингер. Первым крионавтом, замороженным в институте, была мать Эттингера, а вторым – его первая жена.

По состоянию на 22 июля 2016 года членами Cryonics Institute являются 1250 человек, а 138 человеческих тела уже находятся на криосохранении. В институте также проводят крионирование тел крупных животных.

Для сохранения замороженных человеческих тел в Cryonics Institute используют криостаты с жидким азотом (рис. 35.4).

В 2005 г. в РФ, г. Москва была основана организация «КриоРус» («CrioRus»). Первых криопациентов организация «Криорусс» заморозила в апреле 2006 г. По состоянию на декабрь 2015 в «Криорус» хранится 50 криопациентов. В институте также проводят крионирование собак, кошек, грызунов и птиц.



Рис. 35.4. Криостат для низкотемпературного хранения крионавтов.

Для сохранения криопациентов в «КриоРус» используют уникальные дьюары «Анабиоз-1», «Анабиоз-2» и «Анабиоз-3», которые рассчитаны на хранение до 10 криопациентов (рис. 35.5).



Рис. 35.5. Дьюар «Анабиоз-3» для низкотемпературного хранения крионавтов и нейропациентов

35.5. Перспективы крионики

По современным представлениям крионистов, для оживления человека в будущем будут использоваться следующие технологии: нанотехнологии, выращивание органов, использование искусственных органов, моделирование мозга, 3D-печать органов и тканей, трансплантация органов.

Однако это не полный перечень технологий, многие технологии еще предстоит разработать.

Известный ученый в области нанотехнологий Э. Д. Марвин в своей книге «Машины созидания» описал возможный сценарий оживления криопациентов. По его представлениям, сценарий оживления криопациентов будет таким:

1. В размороженное тело криопациента внедряется огромное количество молекулярных нанороботов, которые анализируют все повреждения, возникшие на клеточном уровне в организме в процессе умирания, после смерти, во время перфузии, охлаждения и при низкотемпературном хранении. Для успешного исправления повреждений нанороботы должны обмениваться информацией между собой и компьютером, к которому они присоединены.
2. На основе проведенного анализа нанороботы должны исправить все повреждения, возникшие в клетках. Например, восстановить клеточные мембраны и органеллы.
3. После окончания исправлений нанороботы покидают оживленное человеческое тело, подобно вирусам, через кровеносную систему или дыхательные пути.

Процедура оживления умершего человека, по расчетам специалистов в области крионики, может занять несколько месяцев, а технологии для этого процесса будут готовы через 50 лет.

Следует отметить, что крионика пока не пользуется особой популярностью, так как это очень дорогая процедура и нет гарантий успешного размораживания и оживления пациентов.

Источники рисунков: <https://www.cryonics.org>, [alcor.org](https://www.alcor.org)

Рекомендуемая литература:

1. Перспективы бессмертия Р.Эттингер, 2002, с.264
2. Preserving minds, Saving lives // G.Benford, S.Bridge et al., 2015, p.570

Раздел 2. Основы криомедицины

Глава 24. История развития и главные направления применения холода в лечебных целях

24.1. Исторический опыт использования холода. 24.2. Основные способы применения низких температур. 24.2.1. Гипотермия, криотерапия и криохирургия. 24.2.2. Криоконсервирование и трансплантация биообъектов в медицинских целях

24.1 Исторический опыт использования холода

Древняя медицина использовала охлаждение как один из наиболее распространенных терапевтических приемов.

- Рецепт, датируемый 3500 г. до н.э., содержит рекомендации по местному применению холода при ранениях головы, грудной клетки и других участков тела.

- Гиппократ и его ученики с помощью холодной воды и льда снижали уровень болевых ощущений при травмах, подагре, останавливали кровотечения из ран, уменьшали страдания больных при столбняке и судорогах.

- Об использовании холода в лечебных целях упоминается в материалах, найденных при раскопках Помпеи.

- Гай Юлий Цезарь (102 – 44 г. до н.э.) и Август (63 г. до н.э. – 14г. н.э.) лечились холодом от артрита и ревматизма.

- На Востоке (~ 200 г. до н.э.) больных при хронической лихорадке оборачивали намоченными холодной водой покрывалами, обкладывали пакетами со льдом.

- Еще в древности не без основания считали, что закаливание холодом обеспечивает долголетие.

- В средние века холод применялся как эффективный способ терапии. Известно, что спасением от последствий тяжелого ранения Ричард Львиное Сердце (1157 – 1199) был обязан холоду – его тело обкладывали снегом.

- Французский хирург Лоррей во время войны 1812 г. ампутировал конечности, обкладывая их льдом.

- Н.И. Пирогов (1810 – 1881), исходя из опыта лечения ранений во время Крымской войны, считал целесообразным использовать холод при кровотечениях.

- Английский врач Д. Арнотт в середине XIX столетия использовал наполненные льдом и солью кожаные мешки для лечения головной боли, межреберной невралгии, рожистого воспаления и др. заболеваний. Он обратил внимание на то, что холод снижает уровень болевых ощущений,

способствует остановке кровотечений и уменьшает количество выделений из ран.

Внедрение в лечебную практику термометрии и достижений физики низких температур дало новый толчок развитию медицинских криотехнологий. Но одновременно стало ясно, что холодотерапия (в частности, общая гипотермия) – процедура отнюдь не безопасная: в ряде случаев она сопровождалась осложнениями, среди которых наиболее распространенными были нарушения деятельности сердца, почек и других органов. Это, в свою очередь, стимулировало развитие научной базы криомедицины.

Экспериментируя с животными, профессор Киевского университета А.П. Вальтер (1898 – 1941) установил, что снижение температуры тела приводит к уменьшению частоты сердечных сокращений, анестезирующему эффекту. Позднее ученик А.П. Вальтера, профессор Казанского университета А.М. Хорват установил, что общим эффектом общей и краниocereбральной (охлаждение головы) гипотермии является снижение кровяного давления, уменьшение ЧСС и угнетение рефлекторных реакций.

Открытие свойства гипотермии замедлять процессы жизнедеятельности стало предпосылкой поиска способов увеличения длительности жизни, ее временной остановки с целью предотвращения преждевременного умирания. Оказалось, что гипотермия способна отсрочить гибель организма от гипоксии при остановке кровообращения.

Следует подчеркнуть, что охлаждение без фармакологической поддержки чревато остановкой сердца при 24 – 25°C, которой предшествует фибрилляция. Но даже с применением наркоза в настоящее время считается допустимым охлаждение человека до температур не ниже 28 - 32°C.

Во второй половине XX столетия осуществлен прорыв в криоконсервации клеточных суспензий, прежде всего крови и костного мозга, нашедших применение при лечении ряда заболеваний кроветворения. В этот же период активно развивается криохирургия, в основе которой лежит криодеструкция и криоэкстракция тканей.

Оценивая исторический опыт использования холода в лечебных целях, следует отметить, что он связан, прежде всего, с местным применением холода для снижения уровня болевых ощущений, остановки кровотечения и лечения воспалительных заболеваний. Общее охлаждение организма в древности применялось в борьбе с гипертермией, и лишь в XX столетии нашло применение в борьбе с гипоксией. Применение охлаждения как фактора стимуляции функций организма, известное с давних пор как закаливание, в настоящее время стало основой экстремальной холодовой терапии.

К сравнительно новым направлениям криомедицины, получившим развитие только в XX столетии, следует отнести криохирургию и криоконсервацию клеток и тканей, которые используют достижения современной криогенной техники.

Медицинские криотехнологии своим развитием во многом обязаны физике низких температур. Первые значительные успехи физика низких температур достигла в середине 19 века. Искусственное получение низких температур сначала осуществлялось путем использования теплоты фазовых переходов различных криоагентов. Например, при смешивании льда с хлоридом кальция получали температуры до 223К (минус 50°C). В 1845г. М.Фарадей достиг температуры 163К (минус 110°C) при смешивании твердого углекислого газа и спирта в вакууме. Низкие температуры сразу же нашли применение в медицине. В 1845 и 1851гг. были опубликованы сообщения об использовании температур ниже минус 12°C для лечения рака матки и молочной железы. Основной целью врача было обезболивание. Ему удалось путем сравнительно простой процедуры, прикладывания к очагу поражения пузыря, заполненного измельченным льдом и солью, затормозить развитие опухолей.

Во второй половине 19 века во Франции и Швейцарии физиками начали разрабатываться адиабатические процессы охлаждения, основанные на резком расширении газов. В результате была показана возможность сжижения атмосферного воздуха, получения жидкого кислорода и азота. В 1892г. Дьюар (Великобритания) изобрел термос, что существенно облегчило хранение и транспортировку сжиженных газов. В 1895 г. эффект Джоуля-Томсона уже начал использоваться для непрерывного получения жидкого воздуха. В конце столетия жидкий воздух и его компоненты стали поступать в свободную продажу. Медицина отреагировала на это достаточно быстро: уже в 1899 г. врачи стали использовать жидкий воздух для лечения разнообразных болезней кожи. Первый опыт подведения жидкого воздуха к патологическому очагу включал использование смоченного в жидком воздухе ватного тампона, распыление жидкого воздуха из емкости и использование заполненных жидким воздухом контейнеров (стеклянных и медных) для контакта с очагом патологического процесса. Жидкий воздух стал применяться для выведения бородавок, обработки фурункулов, лечения варикозных язв голени, опоясывающего лишая, герпеса, эпителиом.

В начале 20 века популярным хладагентом стала твердая угольная кислота, получать которую оказалось достаточно просто. В 20-е годы столетия стал коммерчески доступен жидкий кислород, однако легкая воспламеняемость при контакте с маслами и взрывоопасность не способствовали широкому применению этого хладагента в медицинской практике.

В 1942г. появились охлаждающие системы замкнутого типа на основе фреонов.

В начале 40-х годов П.Л.Капица в СССР и Коллинз в США приступили к разработке систем промышленного получения жидкого гелия и водорода. Жидкий азот при этом стал побочным продуктом производства, резко упал в цене и стал наиболее доступным из всех хладагентов.

Первые криохирургические инструменты на основе азота появились в конце 50-х годов. В 1959г. сразу несколько ученых сообщили о создании

устройств для замораживания участков мозговой ткани. В этих устройствах возникла конструкция канюли, в которой активно циркулирует хладагент (рис 24.1). В качестве хладагента, охлаждающего рабочую часть канюли, можно использовать спирт, фреон и жидкий азот. Канюля состоит из трех коаксиально расположенных внутри друг друга трубок. По центральной трубке хладагент поступает в полость внутри рабочей поверхности аппликатора и возвращается через зазор между центральной и средней трубкой. Зазор между средней и наружной трубкой вакуумирован и представляет собой тепловой защитный экран.

Альтернативным способом подвода хладагента в рабочую зону криохирургического устройства и его отвода является использование системы двух параллельных трубок (рис 24.2). В некоторых устройствах хладагент пропускают через трубку, образующую спираль, которая служит рабочей частью криоинструмента и непосредственно контактирует с зоной криовоздействия. Контроль температуры в криохирургических инструментах может осуществляться путем встраивания термодатчика в рабочую поверхность устройств для замораживания (рис 24.2) или соответствующих направляющих (при использовании нейрохирургических криозондов), в которые вводятся эти устройства. Кроме того, стенки криоинструмента могут быть сделаны из разнородных металлов, контакт которых на наконечнике приводит к образованию термопары.

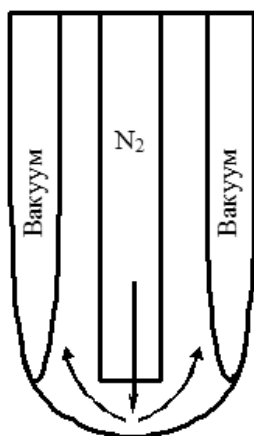


Рис.24.1. Схема устройства канюли

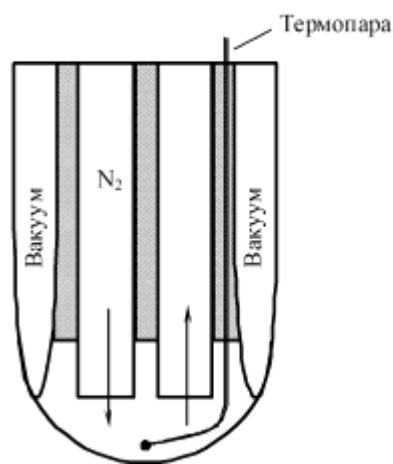


Рис.24.2 Схема подвода хладагента в рабочую часть криоинструмента и его отвода с помощью параллельных трубок

В настоящее время существует много разновидностей криохирургической аппаратуры. В зависимости от области применения криохирургических устройств и выбора хладагента в современных криомедицинских установках, помимо охлаждения, основанного на разнице температур рабочего тела (хладагента) и охлаждаемого объекта, применяются следующие методы охлаждения:

- охлаждение за счет теплоты фазового перехода хладагента;

- охлаждение за счет расширения рабочего тела в дроссельных устройствах и детандерах (эффект Джоуля Томсона);
- термоэлектрическое охлаждение (эффект Пельтье).

В середине 20 века началось использование аппаратуры для гипотермии. В гипотермических устройствах может использоваться разомкнутый или замкнутый цикл охлаждения.

В устройствах первой группы отсутствует возврат теплоносителя для повторного цикла. Они могут быть выполнены в виде гибких или жестких оболочек различной формы с разнообразными прижимными средствами. Гипотермическая повязка может содержать вещества, смешивание которых приводит к поглощению тепла. Оболочки могут быть заполнены снегом или льдом, через них может пропускаться холодная вода.

Охлаждение в устройствах второго типа осуществляется с помощью парокомпрессионной или термоэлектрической систем охлаждения. Примером парокомпрессионной гипотермической установки служит хладоновая система охлаждения, испаритель которой размещен в охлаждающей подушке, прикладываемой к части тела.

В медицине стали применяться парокомпрессионные системы охлаждения, в которых испаритель служит для охлаждения циркулирующих теплоносителей. Теплоносителями в таких устройствах чаще всего служат растворы одноатомных (этиловый спирт) и двухатомных (этиленгликоль) спиртов. Схема одного из устройств для краниocereбральной гипотермии (охлаждения головы), использующего в качестве теплоносителя охлаждаемый спирт, представлена на рис. 24.3.

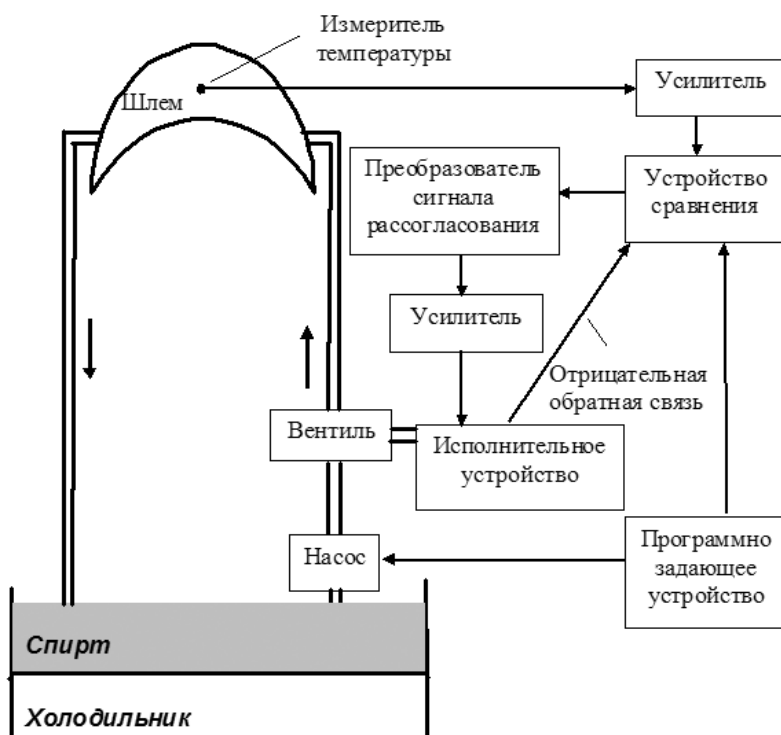


Рис 24.3 Схема устройства гипотермии для краниocereбральной гипотермии.

24.2. Основные способы применения низких температур

24.2.1. Криотерапия и криохирургия

Криотерапия. Криотерапия – это совокупность методов и подходов охлаждения организма или его частей до гипотермических температур в лечебных целях. В ней можно выделить несколько областей применения с разными целями и задачами.

- А) Общая гипотермия организма.
- Б) Краниоцеребральная гипотермия.
- В) Региональная гипотермия.

Подробную информацию смотри в *главе 31*.

Криохирургия. Основная цель криохирургии – разрушение (криодеструкция) патологических очагов и удаление с использованием криоадгезии (холодового прилипания) кусочков пораженной ткани и структурных элементов (криоэкстракция). Кроме деструктивного действия, криохирургическое вмешательство оказывает и криотерапевтический эффект на окружающую зону деструкции ткань.

Живые клетки, которые непосредственно контактируют с рабочей поверхностью криохирургического инструмента, гибнут вследствие прямого действия низких температур (первичный крионекроз), а нарушение микроциркуляции и явления гипоксии вследствие тромбирования мелких сосудов приводят к появлению вторичного некроза в окружающих зону криодеструкции тканях. Другими факторами, ответственным за повреждение в результате криовоздействия, являются нарушение микроциркуляции и гипоксия. В окружающем зону крионекроза микроциркуляторном русле замедляется кровоток, образуются тромбы, закупоривающие сосуды. Такие изменения наблюдаются чаще всего в венах, затем в капиллярах. Артериолы затрагиваются в меньшей степени. Изменения в системе кровотока после криовоздействия формируются в течение 3 –5 часов и соответствуют сосудистой реакции при воспалении.

Особо повышенный интерес к криохирургии возник после сообщений о том, что криовоздействие при раке толстой кишки, злокачественных опухолях матки и простаты приводит к образованию *аутоиммунных антител*, благодаря этому уменьшается опухоль и улучшается состояние больных. Применение криохирургии в онкологии стимулировало появление нового направления науки – криоиммунологии.

Преимущества криохирургии перед другими методами хирургического вмешательства:

- отсутствие грубых послеоперационных рубцов;
- возможность деструкции тканей в труднодоступных местах;
- отсутствие кровотечений;
- возможность точечной деструкции;
- ограничение метастазирования из-за ограничения поступления крови из зоны деструкции в другие части тела.

Ограничения и трудности при проведении криохирургических операций:

- глубина зоны криодеструкции ограничена низкой теплопроводностью льда, образующегося в ткани в зоне контакта с устройством охлаждения или хладоносителем, а также теплопродукцией организма;
- при проведении криодеструкции в полостях возникают проблемы теплоизоляции рабочей части криоинструмента, тепловой защиты окружающих тканей и контроля их температуры;
- для полной деструкции очагов патологии часто требуются повторные криохирургические вмешательства; при необходимости отторжения части органа (ткани) криохирургия может применяться только в комплексе с хирургией.

Области применения криохирургии: проктология, урология, гинекология, офтальмология, отоларингология, нейрохирургия, гастроэнтерология, кардиология, дерматология и общая хирургия.

Подробную информацию смотри в *главе 34*.

24.2.2. Криоконсервирование и трансплантация биообъектов в медицинских целях

Криоконсервирование обеспечивает долгосрочное хранение клеток для трансфузий и тканей для трансплантации.

Криоконсервирование клеток крови и костного мозга. Криоконсервирование крови и костного мозга облегчает решение проблем иммунологического подбора пар донор – реципиент, позволяет создавать запасы лечебных доз материала для экстренных ситуаций.

Гипотермическое хранение решает эти проблемы менее эффективно. Так, эритроциты человека в сбалансированном солевом растворе при 4°C сохраняют способность переносить кислород в ткани и забирать из них CO₂ в течение 3÷4 недель, но уже после 2÷3 суток хранения количество полноценных клеток прогрессивно снижается. Время допустимого хранения костного мозга при 4°C в физиологической среде составляет не более 5÷8 суток.

Хранение в низкотемпературном холодильнике (минус 80°C) под защитой криопротекторов позволяет хранить эритроциты несколько месяцев, а в жидком азоте (минус 196°C) – десятки лет. Особую ценность для медицинской практики представляет долгосрочное хранение редких групп крови.

Криоконсервирование клеток крови и костного мозга подробно описаны в *главах 28 и 30*.

Кожа. Криоконсервированная кожа находит применение в пластической хирургии. Пересадку кожи, в том числе и криоконсервированной кадаверной, осуществляют при глубоких ожогах, поскольку массивные дефекты не могут закрыться самостоятельно. Кроме

этого, трансплантат в большинстве случаев играет роль и биологической повязки. Процесс криоконсервирования лоскутов кожи включает этапы забора, погружения в раствор криопротектора (ПЭО-400), медленного программного замораживания в специальных контейнерах, отогрева в водяной бане и отмывания физиологическим раствором.

Роговица. Трансплантация (кератопластика) криоконсервированной роговицы применяется для лечения больных с бельмом на глазу. Криоконсервирование и краткосрочное гипотермическое хранение позволяют сохранить трансплантат прозрачным и жизнеспособным. Кератопластика используется при лечении больных с механическими травмами и ожогами глаз. В отдаленные сроки после пересадки роговица остается прозрачной. Принципиальных отличий в процессах криоконсервирования кожи и роговицы нет.

Эндокринные органы. При нарушении функций эндокринных органов (щитовидной железы, яичников, надпочечников) подсадка кусочков криоконсервированных тканей оказывается более эффективной, чем гормонотерапия. Источником препаратов щитовидной железы могут служить резецированные при лечении гипертиреоза кусочки ткани. При лечении гипотиреоза используются как ауто-, так и аллотрансплантаты. Последние со временем отторгаются организмом. Трансплантация тканей яичников и надпочечников предполагает использование, как резецированных тканей человека, так и ксенотрансплантатов.

Криоконсервирование тканей встречается с меньшими трудностями, чем криоконсервирование клеточных суспензий. Это, прежде всего, связано с большей криоустойчивостью тканей, механизмы которой до сих пор неясны.

Криоконсервируют и многие другие биологические объекты в медицинских целях, что описано в последующих главах 25 – 30.

Рекомендуемая литература:

1. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкарь Н.С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов. – К.: Наук. думка, 1993. – 174 с.
2. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. Шк., 1987. – 80с.

Часть 4. Криоконсервирование биообъектов в медицинских целях

Глава 25. Криоконсервирование тканей и органов

25.1. Действие замораживания-отогрева на ткани и органы. 25.2. Проблема замораживания органов. 25.3. Криоконсервирование роговицы. 25.4. Криоконсервирование костной ткани. 25.5. Криоконсервирование хряща. 25.6. Криоконсервирование кожи. 25.7. Криоконсервирование сосудов. 25.8. Криоконсервирование конечностей. 25.9. Криоконсервирование эндокринных органов. 25.9.1. Щитовидная железа. 25.9.2. Надпочечники. 25.9.3. Островки Лангерганса. 25.9.4. Мужские гонады. 25.9.5. Овариальная ткань.

25.1. Действие замораживания-отогрева на ткани и органы

При замораживании биологических объектов происходит затвердевание клеточной и неклеточной воды. Это приводит к значительным изменениям в их состоянии. При общем сохранении организации и структуры биообъектов происходит полная остановка метаболизма и функций. Это связано с тем, что все жизненные процессы протекают только в жидкой водной среде, а затвердевание водного окружения биологических структур полностью останавливает движение всех молекул, что прекращает работу ядра, митохондрий, рибосом и других органелл, а также всех клеток. Ферменты также целиком прерывают свои функции, так как их субстраты не двигаются и не достигают их активных центров, да и сами молекулы ферментов находятся в твердом неподвижном состоянии. В замороженном состоянии отмечается полная остановка жизненных процессов, приостанавливается газообмен, прекращается использование энергии и веществ, происходит фиксация биологической структуры. Но очень важно заметить, что в замороженном состоянии происходит и полная остановка спонтанного разрушения клеток, тканей и органов. Поэтому энтропия замороженной высокоорганизованной биологической системы не повышается, что обуславливает возможность криоконсервирования и длительного хранения биологических объектов.

Однако физико-химические факторы замораживания всё-таки существенно повреждают клеточные и тканевые структуры, что обычно проявляется на стадии отогрева. Степень повреждений сложных биологических объектов, обусловленных замораживанием и оттаиванием, зависит от температуры, длительности замораживания, криопротекторов, скорости охлаждения и ряда других факторов. Структурно-функциональные нарушения в тканях и органах *после замораживания-отогрева* наблюдаются на нескольких уровнях.

- **Молекулярный.** Действия факторов замораживания приводят к нарушению структуры и функций многих структурных белков,

ферментов и молекулярных функциональных комплексов (см. главу 7).

- **Мембранный.** Большинство клеточных органелл имеет мембранную основу строения. Поэтому повреждения их структуры и функции приводит к нарушению многих биохимических процессов и к дискоординации метаболизма (см. главу 5).
- **Клеточный.** Повреждаются ядро, органеллы, структура цитозоля и цитоплазматическая мембрана. Клетка теряет внутренний гомеостаз и функциональность (см. главу 8).
- **Межклеточный.** В результате замораживания-отогрева повреждаются межклеточные контакты, разрушается структура гликокаликса. Орган или ткань теряют свою монолитность, клеточную координацию и управляемость.
- **Макроструктурный.** Кристаллы льда, растущего сквозь орган, могут просто расколоть его на отдельные части.
- **Трофический.** Повреждается капиллярно-сосудистая система снабжения объекта кислородом и питательными веществами. Развивается ишемия, недостаток субстратов, накопление шлаков и метаболитов (аммоний, мочевины, лактат).
- **Функциональный.** В итоге ткань или орган получают повреждения, не совместимые с функционированием.

Таким образом, замораживание может существенным образом влиять на структурно-функциональное состояние клеток, тканей и органов. Замораживание-отогрев изменяет физическое состояние липидов и затрудняет мембраносвязанные процессы, такие как транспорт веществ, ионно-осмотическую регуляцию и внутриклеточное взаимодействие. Повреждения клеток происходят также и от осмотической потери воды, ведущей к клеточному сжатию и гиперосмотическому эффекту на макромолекулы, мембраны и клеточный гомеостаз. Так, например, рвутся мембраны, нарушается осмотическое равновесие, клетки теряют автономность, нарушаются их метаболизм и функции.

Большинство простых ферментов относительно легко переносят замораживание-отогрев и восстанавливают свою активность. Но сложные белки и мембраносвязанные ферменты могут существенно повреждаться и утрачивать свою активность. В частности, белки, состоящие из нескольких субъединиц, при замораживании распадаются на несколько составляющих, а при отогреве могут восстанавливаться уже не в том составе. Так, лактатдегидрогеназа, состоящая из 4 субъединиц, восстанавливается в другие полимерные формы, не обладающие активностью. А мембранные ферменты «выдавливаются» из липидного бислоя, меняют свою конформацию в процессе замораживания и, в большинстве случаев, не полностью восстанавливаются после отогрева.

Кроме эффектов, которые оказывает криоконсервация органов на клетки, необходимо также учитывать разрушение межклеточных контактов,

клеточных взаимодействий, а также нарушение внеклеточного вещества. В частности, неадекватные режимы криоконсервирования приводят к растрескиванию органа во время охлаждения ввиду наличия температурных градиентов. На растительных тканях было показано, что кристаллизация часто распространяется вдоль клеток в пространстве между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной, что может приводить к механическому расколу ткани.

Первичным местом образования кристаллов льда является межклеточное вещество. Кроме раскола ткани, кристаллы льда, появившиеся в межклеточном пространстве, потенциально могут индуцировать и внутриклеточную кристаллизацию в результате миграции льда через плазматическую мембрану. Проникновение кристаллов льда в клетки кровеносных сосудов нарушает их архитектуру, структуру и функции капилляров, запускает ишемический некроз или апоптоз.

Даже применение криопротекторов и щадящих режимов замораживания не обеспечивает полную защиту сложных биологических объектов при криоконсервировании.

25.2. Проблема замораживания органов

Необходимость криоконсервации тканей и органов обусловлена растущей потребностью в этих органах как материала для трансплантации.

Однако использование криоконсервирования для хранения крупных сложных органов человека остается пока вне пределов практического применения.

Экспериментально была показана возможность криоконсервирования некоторых органов животных (крысы, свиньи). Например, почку крысы удалось заморозить после перфузии растворами, содержащими ДМСО и глицерин. Однако после отогрева орган далеко не всегда был способен полноценно функционировать. Аналогичные эксперименты были проведены с печенью животных. Но только в некоторых случаях печень мышей или поросят после замораживания-отогрева с применением этиленгликоля имела нормальную гистологическую структуру и была способна синтезировать желчь после трансплантации.

Криоконсервирование таких органов как печень, легкие, почка, поджелудочная железа является проблемой по нескольким причинам. В основном эти причины сводятся к двум: *большой объем и гетерогенность структуры органа*.

- Органы достаточно крупные по сравнению с клетками. Большой объем органов неизбежно связан с малым, по сравнению с клетками, отношением поверхностной площади к объему клеток. В процессе криоконсервирования это неизбежно ведет к возникновению температурных градиентов, при которых поверхность органа имеет значительно более низкую по отношению к центру температуру. Это

может приводить к растрескиванию или даже разрыву органа в процессе замораживания.

- Органы состоят из огромного количества различных клеток, которые имеют разную устойчивость к условиям криоконсервирования. Более того, ввиду значительного объема органа, даже клетки одного типа оказываются в различных условиях.
- Из-за большого объема, равномерное насыщение органа криопротекторами затруднительно, что приводит к неравным условиям замораживания различных частей объекта.
- Разные органы характеризуются индивидуальными морфо-функциональными структурами, как-то: интерстициальная ткань, нефроны, дольки, альвеолы, ацинусы, островки Лангерганса и др. Они обладают разной криочувствительностью и будут повреждаться в разной степени. Кроме этого, распространение криопротекторов и фронта кристаллизации в этих структурах будет не одинаковым и может приводить к механическому повреждению структур.

Разрабатываются подходы по применению методов витрификации для замораживания органов. Витрификация в целом позволяет избежать роста кристаллов льда. Однако она связана с применением растворов, содержащих высокие концентрации криопротекторов, что довольно токсично для биообъектов. Очень часто эти растворы содержат комбинации проникающих (ДМСО, глицерин, 1,2 пропандиол) и непроникающих криопротекторов (поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт), а также дополнительно глюкозу, сахарозу, трегалозу.

Хотя была показана возможность замораживания почки, в целом проблема хранения органов в замороженном или витрифицированном состоянии остается не решенной, но перспективной задачей.

Однако вполне доступно замораживание и долгосрочное хранение небольших изолированных биологических объектов: частей тела, кусочков тканей и органов.

25.3. Криоконсервирование роговицы

Трансплантация роговицы, или кератопластика, является одним из способов лечения болезни, травм и ожогов глаз, который позволяет улучшить остроту зрения или сохранить целостность этого органа. Естественно, создание банка доступного материала для трансплантации позволяет сделать эту операцию рутинной.

Еще в 1963 году была показана возможность криоконсервирования роговицы кроля. В 1978 году харьковскими учеными Института проблем криобиологии и криомедицины был разработан способ низкотемпературного криоконсервирования роговицы человека с криопротектором ПЭО-400. Метод включает в себя следующие этапы:

1. Помещение роговицы в специальный контейнер эпителием вверх.
2. Инкубация роговицы с 10% ПЭО-400 при температуре 18-20°C, 10 мин.
3. Программное медленное охлаждение биообъекта в контейнере со скоростью 1-2град/мин до минус 6°C, а затем быстрое погружение в жидкий азот, минус 196°C.
4. Отогрев контейнера с роговицей проводят на водяной бане при 42°C в течение 55-60 сек.
5. Помещение роговицы в физиологический раствор для гидратации и удаления криопротектора на 3-5 мин при 18-20°C.
6. Помещение роговицы в физиологический раствор.

Была показана хорошая сохранность клеток эндотелия. Однако установлено, что наличие жизнеспособных клеток роговицы не является необходимым условием для консервирования роговицы.

Ввиду того, что при заготовке роговицы часто нет необходимости сохранять живые клетки, методы её заготовки для кератопластики могут быть более простыми, что облегчает задачу создания банков и удешевляют технологию. Например, было показано, что роговица, которая была просто заморожена до минус 80°C в растворе 20% глицерина, после отогрева оставалась целой, имела нормальную толщину, прозрачность, механическую прочность и морфологическую структуру.

25.4. Криоконсервирование костной ткани

Костные трансплантаты широко используются в стоматологии для лечения атрофии костной ткани челюсти, которая может быть результатом травмы, онкологического заболевания, инфекции ротовой полости или врожденного отсутствия зубов. Стандартом для трансплантации в этих случаях является трансплантация аутологичной кости. Однако этот подход не всегда доступен. Поэтому чаще используют донорский аллогенный материал, взятый у трупа. Для криоконсервирования костей было предложено использовать протокол, который включает в себя следующие этапы:

1. Забор материала (берцовой кости) в течение первых 12 ч после смерти донора.
2. Дезинфекция кости на протяжении 72 ч при 4°C в растворе, содержащем ванкомицин, полимиксин, глазидин, линкомицин.
3. Ополаскивание материала в стерильном физиологическом растворе.
4. Замораживание кости в физиологическом растворе без криопротекторов до минус 80°C.
5. Долгосрочное низкотемпературное хранение.
6. Размораживание и подготовка к трансплантации.

25.5. Криоконсервирование хряща

Особенности криоконсервирования хрящей во многом зависят от целей, а также типа хрящей. Суставной хрящ – это ткань, содержащая в основном только один вид клеток (хондроциты), без кровеносных и лимфатических сосудов и нервов. Эти клетки получают питательные вещества и избавляются от продуктов жизнедеятельности через экстраклеточный матрикс в синовиальную жидкость. Особенностью хрящей является очень ограниченные возможности для самообновления.

Замена хряща может быть предписана в случае его травматического повреждения, эпифизарного рака, артрита. Единственная техника, которая позволяет восстановить часть или целый сустав – это остеохондральная трансплантация, которая связана с трансплантацией кости и хряща. Эта ткань должна быть взята не позже 24 ч после смерти донора и использована в течение 2-3 суток, что существенным образом ограничивает доступность хрящей для трансплантации.

Одним из способов продлить существование трансплантата является использование гипотермического хранения при 4°C. Однако оно существенным образом ухудшает качество трансплантата. Поэтому успешное криоконсервирование существенным образом увеличивает доступность этого материала для трансплантации.

Сложность консервирования хряща заключается в том, что оба компонента: клеточный и внеклеточный матрикс должны быть сохранены. Это отличает хрящ от таких трансплантатов, как кости и роговица.

Для консервирования хряща предложено использовать следующий протокол:

1. Помещение целого блока коленного сустава от 18-60-летних доноров в водно-ледяную шугу не позднее 120 ч после смерти.
2. Вырезание остеохондральных блоков (10-20 мм в диаметре и 1-3мм толщиной) из дистальной бедренной и проксимальной берцовой кости.
3. Удаление костной части каждого блока, оставляя только гиалиновый хрящ и остаточную субхондральную кость.
4. Проделывание пор через всю толщину остеохондрального блока (рис. 25.1) для улучшения трофики хряща.
5. Замораживание в растворе, содержащем 7-10% ДМСО при помощи программного замораживателя со скоростью 1 град/мин и хранение при минус 80°C.
6. Отогрев остеохондральных блоков на водяной бане при 37°C и промывание в физиологическом растворе.

Разрабатываются также методы витрификации хряща, которые имеют определенные сложности, главным образом связанными с толщиной хряща, которая препятствует свободному проникновению криопротекторов.

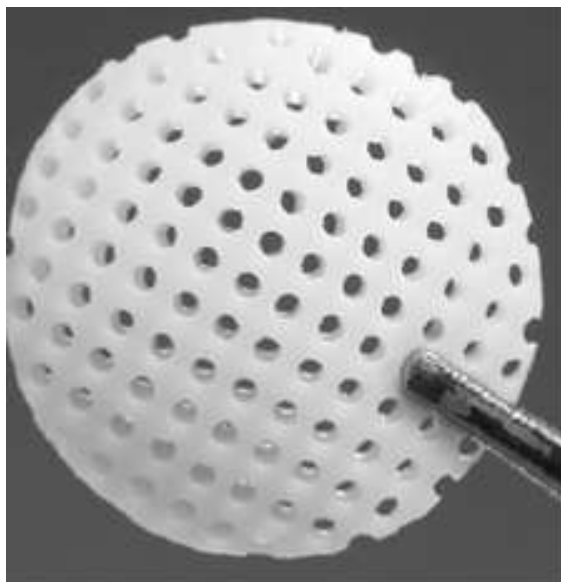


Рис. 25.1. Подготовленный для замораживания блок хрящевой ткани (из Sandra Geraghty, Jin-QiangKuang, Dana Yoo, Michelle LeRoux-Williams, C. Thomas Vangsness Jr, AllaDanilkovitch. A novel, cryopreserved, viable osteochondral allograft designed to augment marrow stimulation for articular cartilage repair. Geraghty et al. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* (2015) 10:66. DOI 10.1186/s13018-015-0209-5).

Кроме суставного хряща, в клинике достаточно широко используется трансплантация межпозвонковых дисков. На сегодняшний день существуют два основных типа имплантата межпозвоночного диска: искусственный, например, М6-С, сделанный из инертных материалов, не вызывающих воспалительную реакцию, а также аллогенные межпозвоночные диски, полученные от трупных доноров. При этом в качестве среды замораживания используется RPMI-1640 с 10% ДМСО и 10% телячьей сывороткой. Однако разработка протоколов для криоконсервирования межпозвоночных дисков остается скорее областью экспериментальных исследований.

25.6. Криоконсервирование кожи

Трансплантация кожи может быть использована для лечения ран и ожогов. Трансплантация кожи способствует защите от обезвоживания, от микробной контаминации, содействует реэпителизации и ослаблению боли. Очень часто, особенно при обширных ожогах, пациент сам не может быть источником аутологичной кожи. Поэтому необходимы запасы кожи аллогенного происхождения.

Однако использование аллогенного материала рассматривается как временное покрытие раневой поверхности, которое способствует заживлению. Он, в конечном счете, подвергается иммунологическому отторжению.

На рисунке 25.2. показан результат трансплантации деэпидермизированной криоконсервированной кожи, который свидетельствует в пользу использования девитализированных кожных трансплантатов.

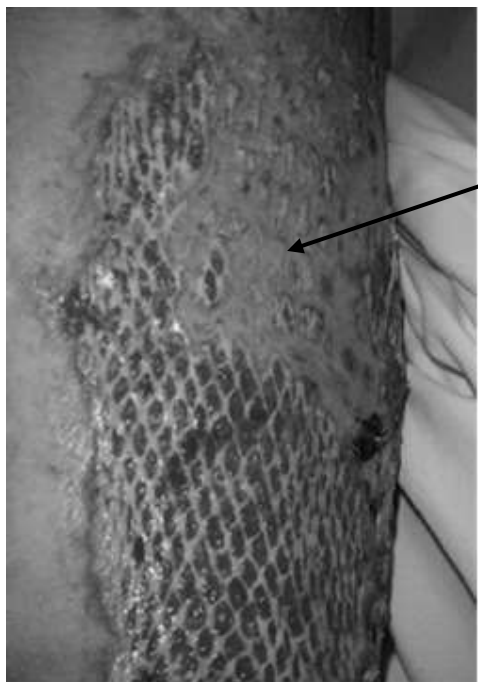


Рис. 25.2 Кр​иоконсервированный кожный трансплантат, покрывающий поверхность ожога. Стрелкой обозначены участки реэпителизации после трансплантации деэпидермизированной кожи

(из Tognetti.L, Pianigiani.E, Ierardi.F, Mariotti.G, Perotti.R, DiLonardo.A, Rubegni.P, Fimiani.M. Current in sights.in.to.skin banking: storage, preservation and clinical importance of skin allografts 18 July 2017 Volume 2017:5 Pages 41—56).

Криоконсервирование кожи включает в себя следующие основные этапы:

1. Забор кожных лоскутов у трупного донора.
2. Дезинфицирование кожи с помощью растворов антибиотиков.
3. Инкубация в растворе с криопротектором. Обычно глицерин 20-30% или 7-15% ДМСО.
4. Помещение образцов в контейнеры и охлаждение до минус 80°C со скоростью 1-4 град/мин при использовании ДМСО и 7-8 град/мин при использовании глицерина.
5. Отогрев кожи производят на водяной бане при температуре 38°C.

25.7. Криоконсервирование сосудов

Трансплантация аутовен (и в некоторой степени аутоартерий) является основным методом реконструкции снабжающих артерий среднего и малого калибра (≤ 8 мм). Еще в начале прошлого века были проведены успешные операции по трансплантации сосудов. Однако на практике может возникнуть проблема нехватки сосудов подходящей длины или просвета. Это обуславливает разработку способов получения искусственных сосудов, сделанных из синтетических материалов, а также способов криоконсервирования сосудов.

Известны разные способы хранения сосудов. Например, хранение в солевых растворах при температурах 0 – 4°C, хранение в жидком гелии, аутологичной сыворотке, охлаждение до минус 70°C и последующее хранение при температуре твердого углекислого газа (около минус 70°C), лиофилизация и последующее хранение при минус 15-25°C. Однако

отмечается слабая сохранность полученных таким образом трансплантатов, кроме этого аллотрансплантаты могут вызывать иммунологическую реакцию, которая приводит к тромбозу. Поэтому на сегодняшний день одной из задач трансплантологии сосудов является снижение иммуногенности аллотрансплантатов. Замораживание и низкотемпературное хранение ткани частично снижают экспрессию антигенов, а также способствуют устранению самих антигенов.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины разработан принципиально новый подход к созданию девитализированных сосудистых ксенопротезов малого диаметра (≤ 6 мм) с использованием физических факторов (замораживание-отогрев и ионизирующее облучение в дозе 25кГр). Показано, что применение низких температур в сочетании с ионизирующим облучением снижает иммуногенность ксеногенных артерий и замедляет скорость их биodeградации. Полученные результаты позволили разработать методику девитализации ксеноартерий малого диаметра без использования цитотоксических химических реагентов.

В результате комплекса выполненных работ выявлено благоприятные характеристики криоконсервированных девитализированных ксеноартерий в виде отсутствия иммуногенных реакций, стенозов и дилатаций, адекватное функционирование в течение 36 мес.

25.8. Криоконсервирование конечностей

Восстановление конечностей, утраченных в результате травмы, лечения онкологических заболеваний или коррекции врожденных дефектов путем трансплантации имеет огромную практическую значимость. Идея аллотрансплантации конечностей сама по себе не нова, однако широкого применения еще не нашла. В частности, за период 1998-2015 было проведено немногим более ста трансплантаций верхних конечностей. Трудности связаны с тем, что при их трансплантации необходим прием реципиентами мощных иммуносупрессивных препаратов. Кроме этого, как правило, трансплантация конечностей не связана с состояниями, угрожающими жизни, и существуют хорошая альтернатива трансплантации – протезирование.

Другими проблемами являются подбор доноров для трансплантации, забор органа и время его транспортировки – процедуры, которые могут забирать многие часы и дни. Поэтому криоконсервирование конечностей может стать тем способом, который потенциально позволит решить выше перечисленные проблемы.

Существуют экспериментальные работы, показывающие возможность использования криоконсервирования для хранения (рис. 25.3) задней конечности крысы. При этом были использованы следующие процедуры:

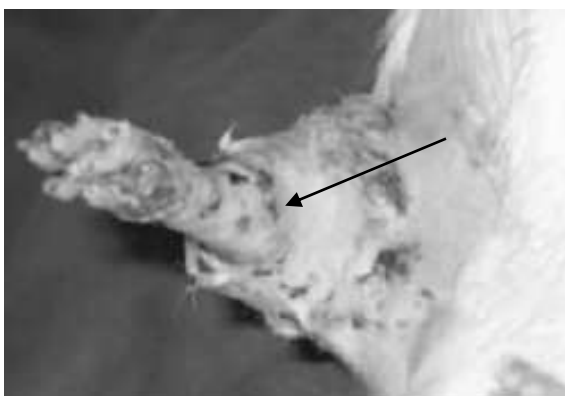


Рис. 25.3. Аутотрансплантированная задняя конечность крысы, которая подвергалась криоконсервированию. Стрелкой обозначена граница между культей и трансплантатом. (из Zengtao Wang, Bo He, Yongzhuang Duan, Yun Shen, Lei Zhu, Xiaolei Zhu and Zhaowei Zhu Cryopreservation and replantation of amputated rathindlimbs Wangetal. *European Journal of Medical Research* 2014, 19:28).

1. Промывание ампутированной конечности физиологическим раствором непосредственно перед криоконсервированием.
2. Перфузирование конечности раствором криопротектора, содержащим 10% ДМСО, 10% ФБС и 5% сахарозу.
3. Помещение конечностей в пластиковые контейнеры и замораживание со скоростью 0.3-0.5 град/мин до минус 40°C с последующим погружением в жидкий азот.
4. Отогрев с использованием среды RPMI1640, нагретой до 40°C, в которую помещают конечность непосредственно из жидкого азота на 8 мин. Перфузирование средой RPMI1640 на протяжении 15 мин со скоростью 50 мл/час.
5. Трансплантация конечности.

25.9. Криоконсервирование эндокринных органов

Несмотря на заместительную терапию, которая позволяет значительным образом улучшить состояние больного, интерес к использованию трансплантации желез внутренней секреции не угасает. Главным преимуществом данного метода является активное участие пересаженной ткани в стабильном и длительном поддержании физиологического уровня гормонов.

Например, при лечении гипогонадизма используют препарат тестостерон-энантат. Это эфир гормона тестостерона, который используют для подкожных инъекций. Концентрации данного препарата в крови в течение нескольких дней после введения повышаются значительно выше физиологических и падают намного ниже к моменту приема следующей дозы. Эти колебания уровня тестостерона могут вести к ослаблению либидо, а также негативно влиять на сердечнососудистую систему. Однако такие отрицательные эффекты могут быть предотвращены при помощи

трансплантации криоконсервированной тестикулярной ткани или клеток Лейдига.

Разнообразие методов криоконсервирования эндокринных органов и их клеток велико, равно как и самих желез внутренней секреции. Создание низкотемпературных банков может послужить фундаментом для дальнейшей разработки методов трансплантации желез и внедрения их в практику. Ниже, как примеры, представлено описание методов криоконсервирования лишь некоторых из них.

25.9.1. Щитовидная железа

Несмотря на то, что терапия тиреоидными гормонами признана эффективной, пациенты часто страдают от таких побочных эффектов как депрессии, головные боли, нарушения сердечнососудистой системы. Поэтому лечение гипотиреоза, возникшего в результате хирургического удаления щитовидной железы при раке, зобе и др. при помощи метода трансплантации может значительно улучшить качество жизни и быть экономически обоснованным.

Протокол для криоконсервирования щитовидной железы, разработанный в ИПКиК:

1. Срезы щитовидной железы толщиной 5-7 мм и длиной 15-20 мм помещают во фторопластовые пакеты с консервирующим раствором, содержащим 100 мл среды Хэнкса, 50 мг KI и 12-13 мл ДМСО.
2. Пакеты герметизируют, и после 10-15 мин экспозиции при 0-2°C подвергают замораживанию со скоростью 5-7 град/мин до минус 70°C, а затем до минус 196°C со скоростью 85-100 град/мин.
3. Отогревают объекты на водяной бане при 37-40°C.
4. Трансплантацию осуществляют в подкожную клетчатку передней брюшной стенки.

По результатам экспериментальных работ установлено, что трансплантация ткани щитовидной железы способствует улучшению общего состояния больных, восстановлению трудоспособности, исчезновению сонливости, медлительности, заторможенности, болей в сердце, сухости кожи и слизистой, отеков, избыточной массы, брадикардии, положительной динамики содержания гормонов в крови, нормализации показателей липидного обмена.

25.9.2. Надпочечники

Недостаточность надпочечников – достаточно редкая патология, но она может угрожать здоровью и жизни пациента. Существует большое количество препаратов глюко- и минералокортикоидов для заместительной терапии, однако потребность в стероидах изменяется в течение суток, поэтому такая терапия не идеальна. Кроме того, надпочечник имеет еще и

мозговую часть, ответственную за синтез катехоламинов. Структурная целостность этого органа важна для его функционирования.

Единых протоколов для криоконсервирования надпочечников, одобренных для применения в клинике, не существует. Однако имеется опыт проведения трансплантации фрагментов фетальных надпочечников крыс после их криоконсервации с 20% ДМСО. После трансплантации криоконсервированные надпочечники были способны продлевать выживаемость животных после адреналэктомии. При этом показано снижение иммуногенности фрагментов надпочечников после криоконсервирования и алло/сингенной экспериментальной трансплантации в подпочечную капсулу.

25.9.3. Островки Лангерганса

Трансплантация островков поджелудочной железы может быть рассмотрена как один из способов лечения диабета 1-го типа. Однако для компенсации инсулиновой недостаточности необходимо приблизительно 5000 островков/кг веса реципиента, которые можно вводить ему в порталную вену. Получение такого количества островков для каждой трансплантации очень затруднительно, поэтому криоконсервирование дает возможность коллекции островков для трансплантации.

При замораживании островков обычно используют ДМСО в концентрации около 10%, так как более высокие количества оказывают значительное токсическое действие. Поэтому дополнительно используются и другие криоконсерванты. Например, растворы трегалозы или гидроксиэтилкрахмала. Все это позволяет снизить концентрацию ДМСО до 5-6%. Кроме того, показана возможность использования 15% растворов этиленгликоля или полиэтиленгликоля.

Трансплантация криоконсервированных островков поджелудочной железы способствует устранению симптомов экспериментального диабета, глюкозурии и гипергликемии, а также нормализации выделения суточного объема мочи и веса животных.

25.9.4. Мужские гонады

Сохранение репродуктивного здоровья населения и генетического разнообразия животного мира является актуальной задачей современной биологии и медицины. Наиболее эффективным методом сохранения фертильности является криоконсервирование гамет. Криоконсервирование гонад является средством сохранения фертильности при невозможности получения гамет, при гонадотоксическом лечении, хирургической кастрации или тяжелых заболеваниях органов репродукции. Основная цель методов криоконсервирования тестикулярной ткани заключается в сохранении клеток-предшественников сперматозоидов. Криоконсервирование гонад является одним из потенциально способных подходов, позволяющих восстановить фертильность мужчин. Например, лечение онкопатологии у

неполовозрелых мужчин связано с развитием азооспермии во взрослом состоянии. При этом аллотрансплантация ткани тестисов может служить подходом, позволяющим в будущем иметь детей. Кроме того, трансплантация тестикулярной ткани может быть рекомендована и для пациентов, которые прошли курс радиотерапии и трансплантацию костного мозга при лечении талассемии, идиопатической медуллярной аплазии, гранулематоза. Пациенты с травмами яичка в результате аварий, боевых действий, также могут использовать криоконсервированный материал тестикулярной ткани в терапевтических целях.

Трансплантация целого криоконсервированного органа приводит к его отторжению. Поэтому существуют несколько других потенциально возможных способов трансплантации: фрагментов тестисов, клеток Лейдига, криоконсервированных сперматогониальных стволовых клеток тестисов.

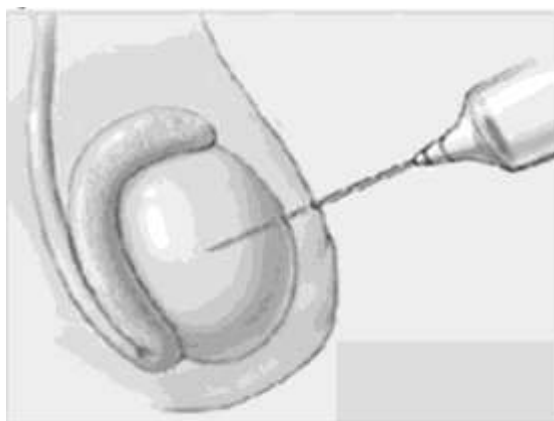


Рис. 25.4. Аспирационная биопсия яичка. *Относительно простая в исполнении манипуляция, которую выполняют в операционной, под местной анестезией. Проводится без разреза, длится не более 15 мин. С помощью специальной, очень тонкой пункционной иглы, которая вводится через кожу мошонки, из яичка аспирируется содержимое.*

В некоторых случаях единственной возможностью сохранения репродуктивного потенциала является криоконсервирование биоптата яичка (Рис.25.4). Он может быть заморожен в виде суспензии герминогенных клеток или в виде извитых семенных канальцев. Ткани или суспензию клеток насыщают криозащитным раствором, замораживают и хранят в жидком азоте. После размораживания проводят аутоотransплантацию герминогенных клеток в ткань семенников, при этом наблюдается восстановление дифференцировки сперматогониев. После размораживания семенных канальцев проводят трансплантацию биоптата, после чего инициируется сперматогенез. При использовании этих методов возможно сохранение тестикулярной ткани без потери способности к дифференцировке сперматогенного эпителия.

Процедуры криоконсервирования включают в себя инкубацию фрагментов в среде, содержащей 1.5-3М ДМСО, глицерин или пропандиол. Данная защитная среда, как правило, содержит ещё 0.5М сахарозу, бычий сывороточный альбумин (5 мг/мл), 20мМ Hepes. Используют медленный режим охлаждения – 0.5-1 град/мин до температуры минус 75°C.

Для криоконсервирования изолированных клеток Лейдига крыс используют 7-20% ДМСО. Замораживают со скоростью 1град/мин до минус 70°С, с последующим погружением образцов в жидкий азот. После хранения образцы отогревают на водяной бане при 37°С. При трансплантации таких клеток в подкожную клетчатку или под капсулу почки было показано, что после замораживания-отогрева клетки сохраняли способность синтезировать и секретировать тестостерон.

Отдельную проблему представляет криоконсервирование тестикулярной ткани, полученной у пациентов препубертатного возраста, поскольку случаев успешного формирования сперматозоидов после размораживания таких образцов на сегодняшний день не описано.

25.9.5. Овариальная ткань

Основная цель криоконсервирования овариальной ткани заключается в сохранении клеток-предшественников ооцитов. Криоконсервирование овариальной ткани рассматривается как один из способов сохранения женской фертильности. Известно, что ряд лечебных протоколов связан с применением препаратов, снижающих возможность получения здорового потомства. Например, лечение рака связано с химио- и радиотерапией, известной своим отрицательным влиянием на структуру яичника. Поэтому сохранение овариальной ткани является актуальным.



Рис 25.5. Процесс инкубации фрагментов овариальной ткани в растворе криопротекторов и помещение их в контейнер для замораживания.

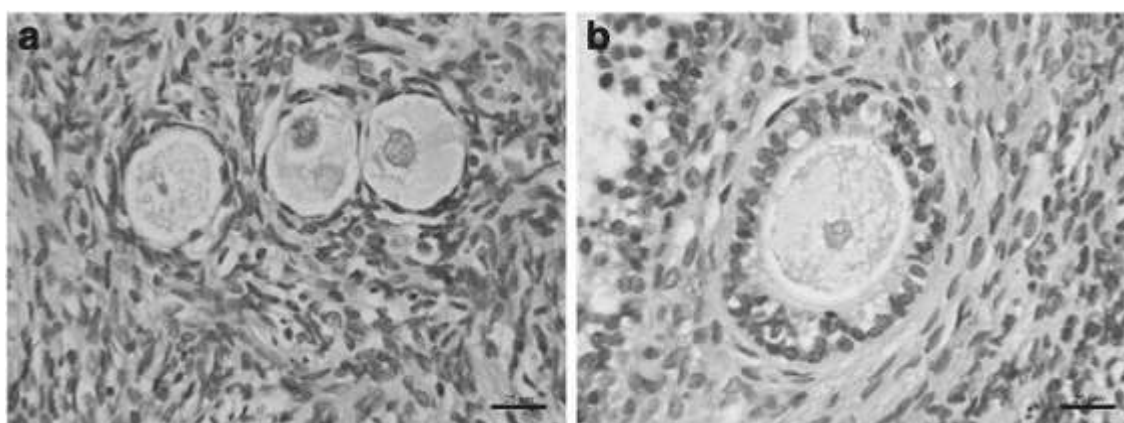
Существуют несколько форм хранения женского репродуктивного материала. Например, криоконсервирование зрелых ооцитов. Однако эта процедура требует предварительной стимуляции и времени перед забором материала, которого часто не хватает, когда пациенту необходимо срочно начать лечение в связи с онкопатологией. Кроме этого, замораживание ооцитов не подходит пациентам, не достигшим половой зрелости. Другой способ, криоконсервирование эмбрионов, хотя и известен высокой частотой наступления беременности, сохраняет все недостатки первого подхода. Низкотемпературное консервирование овариальной ткани не требует предварительной подготовки пациентов, например, гормональной стимуляции овуляции, и поэтому может быть использован для сохранения фертильности неполовозрелых пациенток. После лечения сохраненная ткань может быть трансплантирована. Было показано, что ортотопически

трансплантированная криоконсервированная ткань яичника способствовала восстановлению менструального цикла. Результатом аутотрансплантации криоконсервированных фрагментов яичников была беременность и рождение детей.

Не существует общепринятого протокола для криоконсервирования и методологий трансплантации овариальной ткани. Как правило, фрагменты овариальной ткани, кортекса толщиной около 1-2 мм и с размерами около 2х2 – 5х5 мм помещают в фосфатно-солевой буфер (Рис. 25.5), в который добавляют криопротектор (ДМСО, ПД, ЭГ). Дополнительно среда включает 10% человеческую сыворотку (часто аутосыворотку) или человеческий сывороточный альбумин 4 мг/мл. Криоконсервирование включает следующие этапы:

1. Инкубация фрагментов ткани в среде с криопротектором при субнулевых температурах от 5 до 15 мин.
2. Замораживание объектов от 0 до минус 7 – 8°C со скоростью 2 град/мин.
3. Температурная остановка до 10 мин для выравнивания температуры по всему образцу.
4. Охлаждение фрагментов ткани от минус 7 до минус 40°C со скоростью 0.3 град/мин.
5. Замораживание образцов от минус 40 до минус 150°C со скоростью 10 град/мин.
6. Погружение биообъектов в жидкий азот.
7. Отогрев образцов на водяной бане при 37°C.

После размораживания более 70% фолликулов сохраняют нормальное строение и возможность восстановления мейоза в ооцитах (Рис.25.6).



А

Б

Рис.25.6. Микропрепарат гистологического среза криоконсервированной ткани яичника после длительного хранения. А - примордиальные фолликулы, Б - вторичный фолликул (<https://ovarianresearch.biomedcentral.com>).

После отогрева проводят реимплантацию ткани – ортотопическую (в яичник) или гетеротопическую (под капсулу почки, кожу предплечья или брюшной стенки). Наиболее разработанной и часто применяемой является ортотопическая трансплантация.

Таким образом, разработанные методы и методологии криоконсервирования репродуктивных тканей и органов позволяют добиться высокой частоты их выживаемости. Но, в большинстве случаев, работы носят фундаментальный характер и не нашли широкого применения в клинической практике. Тем не менее, научные исследования в области криоконсервирования системы репродукции человека являются актуальными и, учитывая быстрые тенденции развития науки, достаточно перспективными.

Итак, несмотря на определенные достижения в разработке методов замораживания, криоконсервирование каждого отдельного органа или ткани человека до сих пор остается отдельной сложной, но многообещающей задачей.

Рекомендуемая литература:

1. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкар Н.С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов. – К.: Наук. думка, 1993. – 174 с.
2. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. Шк., 1987. – 80с.
3. ErsulaRauen, HerbertdeGroot. New insights into the Cellular and Molecular Mechanisms of Cold Storage Injury. *Journal of investigative medicine*. V.52., N.5. – 2004.
4. Di Liu, Feng Pan. Advances in Cryopreservation of Organs. *J/ HuazhongUnivSciNechnol [Med Sci]* 36(2) – 2016. P/153-161.
5. Abdulla K. Salahudeen Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F181-187, 2004.
6. Cameron AM, Barandiaran Cornejo JF. Organ preservation review: history of organ preservation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015 Apr;20(2):146-51.
7. Hameed AM, Hawthorne WJ, Pleass HC. Advances in organ preservation for transplantation. *ANZ J Surg*. 2017 Dec;87(12):976-980.
8. Liu D, Pan F. Advances in cryopreservation of organs. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2016 Apr;36(2):153-161.
9. Fahy GM, Wowk B. Principles of cryopreservation by vitrification. *Methods Mol Biol*. 2015;1257:21-82.
10. Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Dec;1066:119-35.

Глава 26. Гипотермическое хранение тканей и органов

26.1 Трансплантация. 26.2 Актуальность гипотермического хранения. 26.3. Два вида низкотемпературных воздействий и их последствия. 26.4. Основные характеристики гипотермии. 26.4.1. Физико-химические причины повреждений биообъектов при гипотермии. 26.4.2. Нарушение биологических свойств. 26.4.3. Глубина повреждений биообъектов при гипотермии. 26.5. Действие гипотермии на клетки, ткани и органы. 26.6. Основные причины повреждений. 26.7. Действие гипотермии на ферменты и метаболизм. 26.8. Среды и аппаратура для гипотермического хранения. 26.9. Низкотемпературное хранение органов и тканей. 26.10. Простое гипотермическое хранение для печени. 26.11. Простое гипотермическое хранение и гипотермическая перфузия для почек. 26.12. Гипотермия сердца. 26.13. Гипотермическое хранение роговицы. 26.14. Гипотермическое хранение кожи. 26.15. Гипотермическое хранение конечностей.

26.1. Трансплантация

Во многих случаях, когда уже невозможно восстановить функции терапевтическим путем, для лечения больных людей требуется пересадка органов, тканей или частей тела. *Трансплантация* – это замещение поврежденных или отсутствующих тканей или органов собственными тканями, либо тканями и органами, взятыми из другого организма. Организм, от которого берут материал для трансплантации, называют *донором*, организм, которому приживляют пересаживаемый материал, называют *реципиентом*. Известно несколько типов трансплантации.

А. С точки зрения локализации:

1. Ортотопическая трансплантация - пересадка органа на место утраченного.
2. Гетеротопическая трансплантация - пересадка органа на другое, несвойственное ему место.

Б. С точки зрения иммунологии:

1. Ауто трансплантация - перенос трансплантата в пределах одного организма.
2. Алло(гомо)трансплантация - пересадка органов и тканей между организмами одного и того же вида.
3. Ксено(гетеро)трансплантация - пересадка органов в пределах разных видов.

26.2. Актуальность гипотермического хранения

Обычно донорский материал берут от людей, погибших при катастрофах. Если донорский материал предназначен для отсроченной во времени процедуры или планового пополнения запаса банка органов, его следует какое-то время сохранять. Срок хранения зависит от способа его консервации и характера донорского материала. Например, ткани эндокринных органов хорошо переносят режимы замораживания и низкотемпературной криоконсервации, но крупные сложные органы могут храниться только в условиях гипотермии. В частности, такие органы как сердце, лёгкие, почки, печень, селезёнка очень чувствительны к действию замораживания-отогрева, поэтому нуждаются только в гипотермическом хранении. При бесперфузионной гипотермии при температуре 2-4°C срок хранения составляет: почки — до 48 часов, печёночный трансплантат — до 15 часов, поджелудочная железа — до 15 часов, сердце — до 4 часов.

26.3. Два вида низкотемпературных воздействий и их последствия

Действие низких температур на биологические объекты можно разделить на два, принципиально разных механизма, в зависимости от температуры и агрегатного состояния воды. Наличие двух принципиально разных видов влияния: *гипотермии* и *замораживания*, обуславливают совершенно разные эффекты на биологические объекты, а также различные подходы их использования для обеспечения сохранности.

- **Замораживание.** Процесс охлаждения биообъектов до температур ниже точки замерзания воды, сопровождающийся образованием льда. При замораживании биообъекты находятся в твердом состоянии, где отсутствует как внешняя, так и внутренняя жидкая среда. Обменные процессы полностью останавливаются, но не по причине законов Аррениуса и Ван-Гоффа, а по причине превращения жидкой воды в лёд, остановки движения и взаимодействия молекул. Однако при этом относительно целыми сохраняются макромолекулы, микро- и макроструктуры клеток, что обуславливает возможность восстановления жизнеспособности после размораживания. В замороженном состоянии (например, при минус 196°C) биообъекты могут находиться неограниченно длительное время.

Замораживание-отогрев успешно применяется для криоконсервации клеток, клеточных суспензий, культур клеток и тканей, сперматозоидов, микроорганизмов и других мелких объектов, однако не используется для хранения органов, тканей и частей тела, так как они очень сильно повреждаются кристаллами льда.

- **Гипотермия.** Процесс охлаждения биологических объектов ниже их физиологических температур, не сопровождающийся кристаллизацией внутренней и внешней воды. То есть охлаждение до момента сохранения воды в жидком состоянии. При этом скорость биохимических реакций уменьшается по законам Аррениуса и Ван-Гоффа, но обменные процессы

все-таки сохраняются на уровне гипобיוза, что может обеспечивать недолгосрочное хранение изолированных биообъектов. Именно гипотермия и используется для хранения таких крупных биообъектов, как органы и ткани.

26.4. Основные характеристики гипотермии

При гипотермии биологические образцы хранятся в жидкой среде и сохраняют своё жидкое агрегатное состояние и жизнеспособность. Но благодаря существенному снижению скорости обменных процессов, обеспечивается сохранение структуры и функции изолированных биологических объектов в течение определенного, но ограниченного времени. Низкие температуры способны обеспечить переход биологических объектов в состояние гипобюоза, главным образом, благодаря уменьшению подвижности (кинетической энергии) молекул биосистемы. Гипобюоз способствует сохранению изолированных биообъектов путем снижения уровня метаболизма, а также потребности в кислороде и питании.

Недостатком гипотермии является краткосрочность хранения биологических объектов. Преимуществом – отсутствие действия факторов замораживания-отогрева: кристаллизации, обезвоживания, действия солей и др. Поэтому нет необходимости применения специальных защитных веществ – криопротекторов.

В условиях гипотермии единственным физическим фактором, действующим на биообъекты, является пониженная температура, вызывающая целый ряд изменений. По законам Ван-Гоффа и Аррениуса в условиях гипотермии скорости биохимических и биофизических процессов могут уменьшиться в несколько раз. Увеличивается вязкость жидкой внутренней среды, снижается интенсивность Броуновского движения, ограничивается вероятность взаимодействий молекул. Белки могут частично терять свою конформацию. Поэтому многие ферменты способны полностью терять свою активность при температурах ниже 15 – 10°C. Причем, сотни разных ферментов неодинаково реагируют на снижение температуры, что дискоординирует и разобщает процессы метаболизма. А если нарушается функция ключевого фермента, то останавливается весь метаболический путь.

Еще большее значение при гипотермическом хранении имеет факт изоляции биообъектов из естественной среды. После изоляции органов или тканей прерывается их кровоснабжение, развивается ишемия, дефицит энергии и веществ.

Однако гипотермическое хранение, осуществляемое при температурах 0÷4°C, всё-таки дает возможность увеличить срок хранения изолированного из организма биообъекта до нескольких суток. Этот срок значительно меньше времени функционирования клеток в физиологических условиях, но гораздо больше времени хранения изолированного из организма биообъекта в условиях умеренного (20°C) тепла. В последнем случае клетки гибнут в течение нескольких часов.

Способность биообъектов сохраняться в изолированном виде при гипотермии и сохранять жизнеспособность обусловлена сохранением минимально достаточного уровня обменных процессов на фоне существенного торможения скорости энтропийных процессов спонтанного разрушения.

26.4.1. Физико-химические причины повреждений биообъектов при гипотермии

1. Уменьшение кинетической энергии молекул биосистем приводит к снижению скорости диффузии, уменьшению вероятности взаимодействия молекул, нарушению работы ферментов. Изменяются гидрофобные и гидрофильные силы, расстраивается работа мембран, изменяется осмос. Нарушаются питание, поступление кислорода, метаболизм, образование энергии и синтез новых веществ.
2. Увеличение вязкости коллоидного содержимого клеток, что ещё сильнее препятствует движению и взаимодействию молекул.
3. Ослабление гидрофобных сил и взаимодействий приводит к нарушению многих функций биологических мембран. Нарушению переноса кислорода, питательных веществ, метаболитов, воды и ионов.
4. По закону Ван-Гоффа скорость некаталитических химических взаимодействий малых молекул уменьшается в 2-4 раза при понижении температуры на каждые 10°C от физиологических.
5. По закону Аррениуса снижается скорость биохимических каталитических процессов за счет снижения энергии активации молекул.

26.4.2. Нарушение биологических свойств

Совокупность вышеперечисленных факторов и изоляция приводят к *изменению биологических свойств* биообъектов при гипотермии, а также ограничению времени хранения:

1. Нарушаются процессы поступления питательных веществ и кислорода, развивается ишемия, что может существенно нарушить метаболизм и гомеостаз.
2. Нарушается процесс удаления из клеток углекислого газа, аммиака и других вредных продуктов метаболизма.
3. Нарушаются процессы переноса воды и ионов, что приводит к сдвигу осмотического равновесия и набуханию.
4. Нарушается структура и работа биологических мембран, многих ферментов, особенно мембраностроенных. Это обуславливает изменения в работе метаболических систем клеток.
5. Происходит дискоординация метаболических процессов в связи с разной чувствительности тех или иных ферментов к изменению температуры.
6. Нарушаются процессы трансформации энергии и синтетические реакции.

7. Нарушаются функции клеток и нормальная клеточная кооперация в сложных органах и тканях.

8. Нарушаются функции органов, тканей и частей тела.

26.4.3. Глубина повреждений биообъектов при гипотермии зависит:

1. *От температуры хранения.* С одной стороны, чем ниже температура, тем дольше сохраняется объект. С другой стороны, чем ниже температура, тем сильнее модифицируются свойства коллоидных растворов, мембран и ферментов.

2. *От времени хранения.* Чем дольше хранится биоматериал в условиях гипотермии, тем значительнее могут быть повреждения.

3. *От среды хранения.* Среда хранения должна быть стерильной, осмотически нейтральной к биообъекту, содержать питательные вещества и аэрироваться.

4. *От природы и размеров самого биологического объекта.* Суспензии клеток дольше хранятся, чем ткани и органы.

26.5. Действие гипотермии на ткани и органы

В настоящее время в клинической практике успешно осуществляется трансплантация почек, сердца, печени, лёгких, тонкой кишки и поджелудочной железы. Число пациентов, требующих трансплантации, неуклонно увеличивается. Источниками донорских органов являются люди, у которых диагностирована смерть мозга. Существенной проблемой является сохранение и поддержание функции изолированного органа в период до его трансплантации, что может составлять десятки часов. Это возможно лишь путём гипотермии, длительного охлаждения органов вплоть до 0°C. Замораживание-отогрев органов не применяется, так как этот процесс существенно повреждает их макроструктуру и функции.

Использование гипотермии является необходимым, поскольку скорость химических реакций, происходящих в организме, существенным образом зависит от температуры. Чем ниже температура, тем меньше скорость метаболических реакций клеток и органа в целом. Соответственно, потребность в кислороде и питательных веществах у клеток данного органа снижается. А время, которое может выдержать данный орган при отсутствии кровоснабжения (ишемии), существенно увеличивается. При этом поддерживается система межклеточных взаимодействий, полной остановки метаболизма и функций не происходит, что препятствует накоплению шлаков и необратимым нарушениям.

Реакция различных органов на гипотермию индивидуальна, так как связана с особенностями строения и клеточного состава. Однако для большинства органов характерна типичная реакция на гипотермию, приводящая к структурно-функциональным нарушениям.

26.6. Основные причины повреждений органов

- **Ишемия.** Изъятие органов из тел для последующей консервации и трансплантации прерывает их кровоснабжение, в результате чего развивается *ишемия*. Нормально функционирующие органы и ткани имеют определенные потребности в кислороде и питательных веществах, которые поставляются с током крови и необходимы для получения пластического материала и энергии. Полученная энергия и вещества используются для удовлетворения всех метаболических нужд клетки (синтез белков, ДНК, РНК, липидов, полисахаридов, поддержание трансмембранных ионных градиентов, мышечное сокращение, транспорт веществ и др.).

- **Энергетическое голодание.** Отсутствие кровоснабжения делает невозможным тканевое дыхание и окислительное фосфорилирование. Приостанавливается образование АТФ и синтетические процессы. В этом случае клетки могут какое-то время получать энергию в виде АТФ анаэробным путем в процессе гликолиза. Лактат, нормальный продукт анаэробного окисления глюкозы, в отсутствие кровоснабжения и, соответственно, гипоксии накапливается в клетках, снижая рН внутри клетки, ингибируя гликолиз и другие метаболические реакции. В результате клетка оказывается лишенной всех возможностей получить энергию, необходимую для поддержания жизненно важных процессов, и постепенно погибает. Чем выше температура, тем быстрее это происходит. Поэтому понижение температуры хранения изолированных органов или тканей вплоть до 0°C способствует увеличению времени их переживания.

- **Субстратное голодание.** С прекращением кровоснабжения прерывается процесс поступления питательных веществ в изолированный орган. Даже перфузия глюкозой, аминокислотами и другими нужными веществами в условиях гипотермии не в состоянии полностью устранить дефицит пластического материала.

- **Накопление метаболитов.** Процессы, связанные с ишемией, могут быть усугублены повышением концентрации вредных метаболитов, а также натрия и кальция внутри клеток. Отчасти это вызвано недостатком АТФ, который необходим для работы Na^+/K^+ АТФазы, одного из главных ионных переносчиков необходимых для поддержания градиента концентраций Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану.

- **Закисление внутренней среды.** Снижение рН также способствует нарушению ионного и водного гомеостаза клеток. Это, в свою очередь, может вести к набуханию клеток и повреждению плазматических мембран.

- **Повышение концентрации кальция.** Кроме того, гипоксия ведёт к повышению количества ионов Ca^{2+} внутри клеток. Это, в свою очередь, активирует различные сигнальные пути гибели клетки путем апоптоза или некроза.

- **Нарушения функций клеток, клеточных взаимодействий и клеточной кооперации.**

- **Реперфузионные повреждения.** Реперфузия – это восстановление кровотока при подключении органа к кровеносным сосудам, что приводит к увеличению поставок O_2 , других веществ и удалению продуктов обмена веществ. После гипотермической консервации органов и их подключения к кровоснабжению образуются дополнительные факторы, влияющие на жизнеспособность. Эти факторы участвуют в *ишемически-реперфузионных повреждениях* (ИРП) трансплантируемого органа. Они развиваются вследствие дефектов эндотелия кровеносных сосудов и нарушения их функций. ИРП часто становятся причиной задержки или отсутствия функции трансплантата на ранних этапах после трансплантации. То есть в процессе консервации и последующей трансплантации наблюдаются не только ишемия и связанные с ней нарушения, но и появляются повреждения, вызванные реперфузией.

- **Появление активных форм кислорода.** Реоксигенация органов может способствовать развитию дополнительных повреждений. Ишемия приводит к нарушению целостности митохондриальных мембран, что ведет к утечке электронов из электрон-транспортной цепи. В присутствие O_2 это может вести к формированию *активных форм кислорода* (АФК), таких как супероксид радикал (O_2^*). Этот радикал может формировать перекись водорода H_2O_2 , которая, в свою очередь, может быть источником наиболее опасной формы свободных радикалов - гидроксил-радикала ($*OH$). Эти радикалы опасны, прежде всего, тем, что ведут к инициации цепных свободно-радикальных реакций, которые потенциально могут повреждать разные молекулы, в особенности органические, в частности, полимеры и липиды мембран.

- **Повреждения мембран.** В результате свободно-радикальных реакций и перекисного окисления липидов в биомембранах нарушается их избирательная проницаемость, что приводит к нарушению осмотического равновесия и отеку органа. Вследствие повреждения функций мембран нарушается метаболизм, гомеостаз и происходит дезорганизации клеточного содержимого.

26.7. Действие гипотермии на ферменты и метаболизм

В условиях гипотермии не происходит существенных нарушений структуры и организации клеток, таких как при замораживании. Главное – вода остается жидкой, хотя вязкость цитозоля может несколько увеличиваться. При понижении температуры биообъектов от оптимальной вплоть до $0^{\circ}C$, каталитическая активность ферментов постепенно падает, но их денатурации при этом не происходит. Понижение активности объясняется снижением скорости движения субстратов и уменьшением вероятности их попадания в активный центр ферментов. С повышением температуры их

каталитическая активность снова восстанавливается. Следовательно, белки-ферменты могут функционировать и легко переносить временное охлаждение вплоть до кристаллизации воды, что обуславливает возможность сохранения некоторой активности клеток при гипобии организмов или при хранении биообъектов в условиях гипотермии.

Температура является важным фактором, от которого зависит скорость всех ферментативных реакций (рис. 26.1). С повышением температуры скорость реакций увеличивается. Это связано с тем, что с повышением температуры движение молекул субстратов ускоряется и увеличивает вероятность их попадания в активные центры ферментов. Температура, обеспечивающая наибольшую скорость реакции, называется *оптимальной*. Для большинства ферментов млекопитающих это температуры в диапазоне $30 - 40^{\circ}\text{C}$. Повышение температуры выше оптимальной приводит к снижению скорости работы ферментов. Это объясняется изменениями, а затем потерей нормальной структуры ферментов при повышенных температурах. То есть ферменты являются очень чувствительными молекулами к изменениям температуры. При температурах выше 50°C большинство ферментов животных подвергаются *денатурации* – потере своей исходной структуры, что приводит к полной потере их активности, а значит, к нарушениям метаболизма и функций клеток.

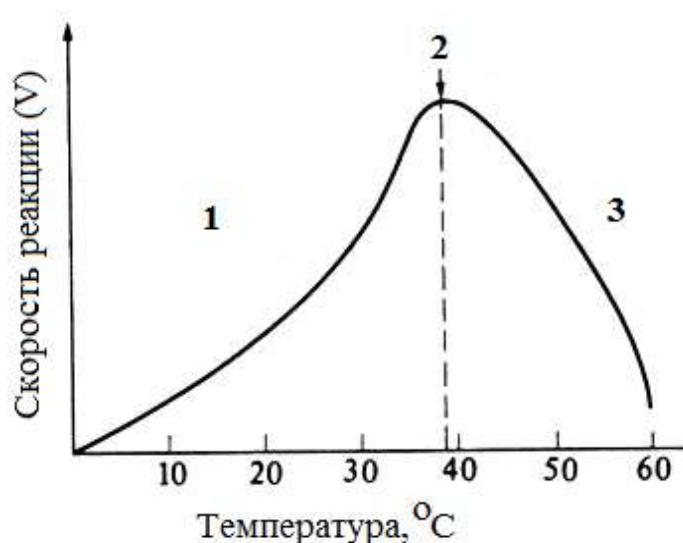


Рис. 26.1. Зависимость активности ферментов и скорости ферментативной реакции (V) от температуры. 1 – скорость реакции растет с повышением температуры, 2 – максимальная скорость реакции при оптимальной температуре, 3 – резкое снижение активности при повышении температуры выше оптимальной, денатурация фермента.

Таким образом, скорость биохимических реакций, происходящих в организме, существенным образом зависит от температуры. Чем ниже температура, тем ниже скорость метаболических реакций клеток и органа в целом. Соответственно, потребность в кислороде и питательных веществах

снижается, а время, которое может выдержать орган при отсутствии кровоснабжения (ишемии), существенно увеличивается. Было показано, например, что использование гипотермии может продлить время сохранности почки с 30-60 минут до 12-13 часов.

26.8. Среды и аппаратура для гипотермического хранения

Среды для гипотермического хранения органов должны обладать способностью поддерживать ионный гомеостаз и осмотическое давление, способствовать энергетическому балансу, содержать субстраты и удалять метаболиты, поддерживать метаболизм, противостоять АФК и ИРП. Использование специальных сред без натрия (или с его низким содержанием), с высоким содержанием калия и магния (растворы внутриклеточного типа) противодействует накоплению Na^+ и Ca^{2+} внутри клеток, что при гипотермическом хранении органов может существенно продлить их сохранность. Для таких сред очень важно наличие осмотически активных компонентов (лактобионат, раффиноза, гидроксипропилированный крахмал, маннитол), которые предотвращают набухание клеток.

Примерами таких сред являются (табл. 26.1), “Euro Collins”, UW (University of Wisconsin solution), “Celsior”, IGL-1 (Institut Georges Lopez-1 solution), Custodiол НТК, ССР (сахарозо-содержащий раствор). Добавление антиоксидантов в среды для гипотермического хранения также может существенным образом продлить выживаемость органа. Использование таких растворов в принципе может увеличить выживаемость почки и поджелудочной железы до 72 часов, печени – до 30 часов. Хотя на практике использование этих органов ограничено 4-12 часами.

Таблица 26.1. Состав сред для криоконсервации органов (мМоль/л)

	Euro-Collins	UW	Belzer's MPS	НТК	Celsior	Polysol	Custodiол-N
Натрий	9.3	25.0	100	15.0	100	136.0	16.0
Калий	115.1	125.0	25.0	10.0	15.0	5.0	10.0
Магний	4.7	5.0	5.0	4.0	13.0	14.0	8.0
Сальций			0.5	0.015	0.25	9.0	0.02
Хлор	15.0		1.0	51.03	41.5		30.04
Глюконат			85.0			10.0	
Фосфат	57.6	25.0	25.0			0.8	
Сульфат	4.7	5.0				4.0	
Бикарбонат	9.3					25.0	
Глюкоза	190		10.0			16.0	
Глутатион		3.0	3.0		3.0	3.0	
Аденозин		5.0				5.0	
Аллопуринол		1.0	1.0			1.0	
Рафиноза		30.0					
Лактобионат		100			80		
ГЭК*		5%	5%				

Гистидин				180.0	30.0		124.0
Триптофан				2.0			
Альфа кетоглутарат				1.0			2.0
Маннитол	32		30.0	30.0	60.0		30.0
Глутамат					20.0		
рибоза			0.5				
HEPES*			10.0				
Аденин			5.0			5	
Пируват						0.2	
ПЭГ*						1%	
Аминокислоты						11.0	
Феноловый красный						0.07	
N- ацетилгистидин							57.0
Сахароза							33.0
Аспартат							5.0
Глицин							10.0
Аланин							5.0
Триптофан							2.0
Аргинин							3.0
Дефероксамин							25.0
LK 614*							7.5

*-ГЭК – гидроксиптилкрахмал; HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, буфер; ПЭГ – полиэтиленгликоль; LK 614 – хелатор железа.



А



Б

Рис. 26.2. Машины для перфузии. А. – «Liver Assist» (*Organ Assist, Нидерланды*); Б. – «The metra» (*OrganOx Limited, Великобритания*).

Существует специальное оборудование, необходимое для забора органов, их транспортировки и гипотермического хранения. Например, установка Бельцера, камера для консервации органов «Викерс».

На рисунке 26.2 представлены примеры современного оборудования, которое позволяет перфузировать органы. Такие приборы способны поддерживать условия, близкие к физиологическим, поддерживать пульсирующий характер перфузии, контролировать температуру и давление перфузата с помощью ротационной помпы. Как правило, такие приборы могут использовать любые сертифицированные растворы для механической перфузии.

26.9. Низкотемпературное хранение органов и тканей

Существуют два основных подхода к гипотермическому хранению органов: статический и динамический.

Под статическим методом подразумевают простое хранение в специальной среде при низких положительных температурах (2–4°C), или *простое гипотермическое хранение*.

Динамический метод – это *гипотермическая перфузия* органа специальными растворами. Главным его достоинством является сочетание холодного торможения метаболизма с постоянным снабжением органа кислородом и питательными веществами, а также удаление метаболитов.

Простое гипотермическое хранение и гипотермическая перфузия используются в клинике только для почек, а для печени и других органов применяют только простое гипотермическое хранение.

Простое гипотермическое хранение. Гипотермическое хранение органов и тканей стали использовать с середины прошлого века. Хранение печени ограничивалось 6 часами. Использование современных растворов (Табл.26.1) позволило увеличить срок хранения до 16 часов и решило проблему доставки органов на большие расстояния. Добавление лактобионата, раффинозы, фосфата, сульфата позволяет нивелировать летальное набухание клеток. Добавление аллопуринола, глутатиона предотвращает развитие оксидативного стресса.

Использование таких факторов как бычий нейтрофильный пептид, фактор роста нервов, пептида Р, эпидермального и инсулиноподобного фактора роста увеличивало выживаемость почки собаки в эксперименте до 6 дней. Аналогичные результаты были получены для печени и сердца. Использование этих факторов приводило к улучшению митохондриальной функции и предотвращало раннее развитие апоптоза.

Однако, несмотря на определенные успехи в деле гипотермического хранения органов, срок их удовлетворительного хранения ограничивается 10–16 часами, в зависимости от вида и исходного состояния объекта.

Гипотермическая перфузия и нормотермическая перфузия

Существуют специальные машины для нормотермической или гипотермической перфузии (Рис.26.2). Такие машины поддерживают определенную температуру и импульсный характер перфузии, который имитирует волны давления, создаваемые сердечным ритмом. Без такого ритма почки склонны к набуханию и разрушению. Этот ритм необходим для поддержания адекватного давления в капиллярах почки. Обычно для гипотермической перфузии используют раствор Бельцера (Табл. 26.1).

Гипо- и нормотермическая перфузия в клинике используется пока, в основном, только для почки. Однако экспериментальные и пилотные клинические исследования показывают потенциальную возможность использования гипотермической перфузии и для хранения печени. Главной проблемой для хранения печени является высокая чувствительность эпителиальных клеток к гипотермии.

26.10. Простое гипотермическое хранение печени

Для хранения и трансплантации используют трупную печень непосредственно после регистрации смерти, или доли печени, полученной от родственных доноров.

Изъятие органов допускается только в государственных лечебно-профилактических учреждениях, научно-исследовательских институтах, высших медицинских учебных заведениях, центрах, имеющих соответствующее разрешение на этот вид деятельности.

Печень промывается раствором UW через печеночные артерии перед ее изъятием из донора.

После удаления печень повторно промывается раствором UW и сохраняется в растворе при 0 – 4°C до момента ее использования.

26.11. Простое гипотермическое хранение и гипотермическая перфузия для почек

Получение органа для трансплантации от родственных доноров или использование кадаверных органов.

Если используют простое гипотермическое хранение, то отмытый от крови орган помещают в стерильный полиэтиленовый пакет с консервантом. Данный пакет помещают в пакет со снежной шугой и помещают в ледяной физиологический раствор.

Транспортировку осуществляют в термоконтейнере или холодильнике при температуре 4-6°C.

Если используют гипотермическую перфузию, то орган подключают к перфузионной машине, которая осуществляет постоянное пульсационное промывание органа консервирующим раствором.

Перфузирование органов проводят одним из консервирующих растворов: Custodiol, EuroCollins, UW.

26.12. Гипотермия сердца

Традиционный способ. Сердце, извлеченное у погибшего донора, промывают физиологическим раствором хлорида натрия и помещают в охлажденный физиологический раствор. Транспортировка органа осуществляется в специальном пакете в контейнере со льдом. При этом трансплантация должна быть проведена в период от трех до шести часов после изъятия - в противном случае сердце признается негодным.

Перфузионный способ. Разработаны специальные контейнеры, в котором сердце подключается к системе искусственного кровообращения и продолжает сокращаться даже в условиях гипотермии во время хранения и транспортировки. Для увеличения срока хранения органа при перфузии используется кислород и специальные консервирующие растворы. С помощью такого аппарата выживаемость реципиентов превышает 97 процентов, тогда как при традиционном способе хранения этот показатель составляет около 80 процентов. В ряде случаев хирурги поддерживали надлежащее состояние донорского органа более восьми часов.

26.13. Гипотермическое хранение роговицы

Существуют несколько подходов, которые позволяют сохранить роговицу. Все они имеют свои преимущества и недостатки.

Хранение глазного яблока или роговицы от трупного донора по Филатову В.П. (рис. 26.3.):



Рис. 26.3. Хранение роговицы во влажной камере по Филатову. (из Niels Ehlers, Jesper Hjortdal, Kim Nielsen. *Corneal Grafting and Banking*. Bredehorn-Mayr T, Duncker GIW, Armitage WJ (eds): *Eye Banking*. Dev Ophthalmol. Basel, Karger, 2009, vol 43, pp 1–14)

Глазное яблоко обрабатывается дезинфицирующим раствором.

Затем оно помещается в бокс с плотно притертой крышкой (влажная камера).

Бокс с органом хранится при температуре промышленного холодильника 2 – 4°C.

Метод позволяет сохранить роговицу органа от нескольких часов до 1-2 суток. Преимуществами метода являются его дешевизна и простота. Недостатки такого метода – краткий срок хранения, а также высокий риск контаминации.

Также показана возможность хранить роговицу до 7-10 дней при температуре 4°C. Для этого роговицу вырезают и помещают в сосуд со средой для культивирования клеток, антибиотиками и декстраном. Хранят в холодильнике при 4°C.

26.14. Гипотермическое хранение кожи

Для гипотермического хранения кожи ее инкубируют в растворах глицерина с концентрациями от 50 до 85% при температуре 33°C на протяжении 3 часов. Затем хранят при температуре 2-8°C но не более двух лет. Неоднократно было показано, что наличие жизнеспособных клеток является не обязательным условием, поскольку данный трансплантат служит временным покрытием для ран и главным образом защищает ткани от потери воды, тепла и проникновения патогенной флоры.

26.15. Гипотермическое хранение конечностей

При травматической ампутации конечности её помещают в пакет, который сохраняется в ледяном растворе. Конечность вместе с пострадавшим пациентом как можно скорее доставляются в медицинское учреждение для реимплантации.

Первостепенное значение для успешной реплантации отрезанной конечности имеет своевременное оказание первой помощи пострадавшим и выполнение необходимых условий хранения и транспортировки ампутированной конечности. Решающее значение имеет также время от момента травмы до поступления пострадавшего в хирургическое отделение. Продолжительность хранения в условиях гипотермии отсеченных пальцев составляет 16 часов, кисть – 12, предплечье, плечо, стопа, голень, бедро – до 6 часов. Хранение изолированных конечностей при температурах выше 4°C существенно сокращает срок их пригодности для трансплантации.

Рекомендуемая литература:

1. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. Шк., 1987. – 80с.
2. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкар Н.С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов. – К.: Наук. думка, 1993. – 174 с.
3. Cameron AM, Barandiaran Cornejo JF. Organ preservation review: history of organ preservation. Curr Opin Organ Transplant. 2015 Apr;20(2):146-51.
4. Minor T, von Horn C, Paul A. Role of temperature in reconditioning and evaluation of cold preserved kidney and liver grafts. Curr Opin Organ Transplant. 2017 Jun;22(3):267-273.
5. Pels E, Beele H, Claerhout I. Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage. Int Ophthalmol. 2008 Jun;28(3):155-63.
6. Rivard AL, Gallegos R, Ogden IM, Bianco RW. Perfusion preservation of the donor heart: basic science to pre-clinical. J Extra Corpor Technol. 2009 Sep;41(3):140-8.
7. Taylor MJ, Baicu SC. Current state of hypothermic machine perfusion preservation of organs: The clinical perspective. Cryobiology. 2010 Jul;60(3 Suppl):S20-35.

Глава 27. Криоконсервирование половых клеток и эмбрионов человека

27.1. Криоконсервирование сперматозоидов человека. 27.1.1. Морфологические характеристики спермиев человека. 27.1.2. Показания для криоконсервирования сперматозоидов. 27.1.3. Методы криоконсервирования сперматозоидов человека. 27.1.4. Криопротекторы и криоконсерванты для замораживания сперматозоидов. 27.1.5. Размораживание сперматозоидов. 27.1.6. Удаление криопротектора. 27.1.7. Криоконсервирование единичных сперматозоидов. 27.1.8. Влияние криоконсервирования на сохранность сперматозоидов. 27.2. Криоконсервирование доимплантационных эмбрионов человека. 27.2.1. Морфологические характеристики доимплантационных эмбрионов человека. 27.2.2. Показания для криоконсервирования эмбрионов. 27.2.3. Методы криоконсервирования эмбрионов человека. 27.2.4. Криопротекторы для замораживания эмбрионов. 27.2.5. Особенности криоконсервирования эмбрионов разных стадий развития. 27.2.6. Влияние криоконсервирования на жизнеспособность эмбрионов человека. 27.3. Криоконсервирование ооцитов человека. 27.3.1. Морфологические характеристики доимплантационных ооцитов человека. 27.3.2. Показания для криоконсервирования ооцитов. 27.3.3. Методы криоконсервирования ооцитов человека. 27.3.4. Криопротекторы для замораживания ооцитов. 27.3.5. Размораживание ооцитов и удаление криопротектора. 27.3.6. Влияние криоконсервирования на жизнеспособность ооцитов

В 2010 году Нобелевская премия за развитие экстракорпорального оплодотворения по физиологии и медицине была присуждена эмбриологу Роберту Эдвардсу за разработку вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Одной из важнейших технологий является *экстракорпоральное оплодотворение* (ЭКО) – репродуктивная технология, при которой процессы оплодотворения яйцеклетки и начальные этапы развития эмбриона животных проходят не в организме, а в лабораторных условиях (*in vitro*). Для человека этот метод чаще всего используется в случае бесплодия. Синонимами термина ЭКО являются: «искусственное оплодотворение», «оплодотворение в пробирке», «оплодотворение *in vitro*», в английском языке обозначается аббревиатурой IVF (*in vitro fertilisation*).

Первый ребенок «из пробирки» на Украине появился в Харькове в 1991 году, благодаря плодотворному труду сотрудников Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (ИПККиК). А в 2003 году на свет появился ребенок после криоконсервирования на стадии раннего эмбриона. На сегодняшний день указанные биотехнологии подарили миру уже более 5 млн. «искусственных» детей, зачатие которых произошло *in vitro*.

Криоконсервирование половых клеток и эмбрионов является неотъемлемой частью репродуктивных технологий, которая позволила решить многие проблемы бесплодия, увеличить частоту наступления беременности, снизить риск осложнений, открыла новые возможности для развития генетической диагностики.

27.1. Криоконсервирование сперматозоидов человека

27.1.1. Морфологические характеристики спермиев человека

Сперматозоид человека — мужская половая клетка (Рис.27.1). Сперматозоиды человека впервые были криоконсервированы в 1953 году. Они относительно устойчивы к повреждающим факторам криоконсервирования, поскольку имеют следующие особенности строения и функции:

- Небольшой размер (длина головки 5 мкм, хвоста — 50 мкм).
- Цитоплазма находится в жидкокристаллическом состоянии, и ее объем минимален.
- Обмен веществ замедлен, поэтому потребление энергии снижено.
- Высокое соотношение площади поверхности к объему.
- Хроматин находится в высококонденсированном состоянии.



Рис. 27.1. Сперматозоиды человека *in vitro*.

27.1.2. Показания для криоконсервирования сперматозоидов

- Участие в программах ВРТ при лечении бесплодия в случаях, при которых мужчина не может находиться в клинике в день сдачи эякулята для оплодотворения яйцеклеток жены;
- При олигозооспермии (сниженное количество сперматозоидов) и астенозооспермии (низкая подвижность сперматозоидов). В этом случае сперма сдается несколько раз, выделенные сперматозоиды криоконсервируются, а затем размораживаются все образцы для накопления необходимого количества подвижных сперматозоидов.
- Предстоящее лечение онкологического заболевания, включающее химиотерапию и радиотерапию.
- Хирургические операции на половых органах мужчины.

27.1.3. Методы криоконсервирования сперматозоидов человека

Существуют три основных способа замораживания, основанных на различных скоростях охлаждения: медленное, быстрое и сверхбыстрое (витрификация).

При *медленном замораживании* сперматозоиды помещают в криопробирку с физиологической средой, к которой в соотношении 1:1 добавляют 5-10% раствор проникающего криопротектора. После 10 мин экспозиции криопробирку помещают в программируемый замораживатель (Рис.27.2). Охлаждение ведут от комнатной температуры до минус 5°C – со скоростью 0,5– 1 град/ мин. При минус 5°C проводят индукцию кристаллизации путем прикосания к пробирке пинцетом, охлажденном в жидком азоте. Затем, от минус 5 до минус 30°C, охлаждают со скоростью 1– 10 град / мин, после чего образец погружают в жидкий азот (минус 196°C).



Рис. 27.2. Оборудование программируемого замораживателя для медленного криоконсервирования спермиев: 1- криованна, 2 – криокамера, 3 - цифровой контроллер установленной температуры, 4- дисплей компьютера.

Существует множество вариантов медленного замораживания, в зависимости от вида криопротектора, его концентрации, скорости охлаждения и др. Недостатком данного подхода является длительный промежуток времени, при котором выполняется программа, необходимость дорогого оборудования и возможное повреждение сперматозоидов в результате кристаллизации льда.

При *быстром замораживании* этапы выделения спермиев и инкубацию с проникающими криопротекторами проводят так же, как и при медленном замораживании. Затем криопробирку с половыми клетками помещают в сосуд Дьюара на высоту 15–20 см выше уровня жидкого азота (минус 80°C) на 10–20 мин (скорость охлаждения составляет примерно 100 град/мин). После этого криопробирки погружаются в жидкий азот. Недостатком метода является низкая воспроизводимость результатов из-за невозможности контролировать скорость охлаждения.

Криоконсервирование методом витрификации применяют преимущественно для замораживания единичных или очень малых количеств сперматозоидов. Сперматозоиды в инкубационной среде с 0,5 М сахарозой помещают в микросоломинки (Рис.27.3), которые немедленно погружают в жидкий азот. При этом скорость замораживания составляет более 1000 град/мин, что предотвращает образование кристаллов. Содержимое соломинок затвердевает в единую аморфную массу. Это наиболее щадящий способ замораживания сперматозоидов человека.



Рис. 27.3. Криосоломинки для замораживания спермиев.

27.1.4. Криопротекторы и криоконсерванты для замораживания сперматозоидов

Большинство сред, которые используют для криоконсервирования спермиев человека, состоят, как правило, из 5-10% раствора глицерина с добавлением 10-20% сывороточного альбумина. Для защиты клеток используют также сахарозу и человеческий сывороточный альбумин. Другие криопротекторы не применяют из-за их возможного цитотоксического влияния, которое проявляется в снижении жизнеспособности половых клеток.

27.1.5. Размораживание сперматозоидов

Для восстановления физиологического состояния спермии должны быть разморожены. Для этого криопробирку вынимают из криохранилища и помещают на 10 мин в водяную баню при температуре 37°C. Для размораживания образцов можно использовать также СВЧ-отогрев или постепенное оттаивание при комнатной температуре.

27.1.6. Удаление криопротектора

Для предупреждения цитотоксического влияния проникающих криопротекторов (глицерина, ДМСО и др.) на размороженные сперматозоиды, производят их разведение растворами без криопротекторов с последующим центрифугированием. Надосадочную жидкость, содержащую криопротектор, удаляют, а осевшие на дно пробирки клетки разбавляют культуральной средой.

27.1.7. Криоконсервирование единичных сперматозоидов

Иногда количество пригодных к оплодотворению подвижных, морфологически нормальных сперматозоидов может оказаться недостаточным. В таком случае для получения необходимого количества клеток требуется их накопление путем криоконсервирования выделенных единичных сперматозоидов.

Основная проблема сохранения индивидуальных сперматозоидов состоит в том, что в процессе криоконсервирования и подготовки к

непосредственному использованию они могут быть потеряны. Решить эту проблему позволяют микроконтейнеры (биологической природы – оболочки яйцеклеток – *zona pellucida*, колонии водорослей *Volvox*; небиологической природы – альгинатные микрогранулы) (Рис.27.4). Путем микроманипуляций отдельные спермии помещаются в микроконтейнеры. Благодаря этому после размораживания поиск сперматозоидов происходит быстро.

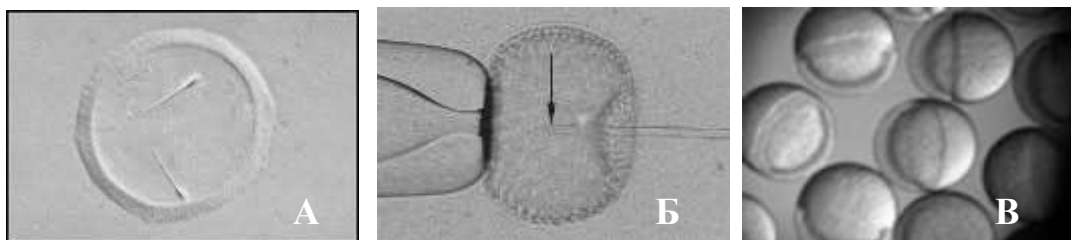


Рис. 27.4. Микроконтейнеры для криоконсервирования единичных сперматозоидов: *А* – *zona pellucida* ооцита с двумя спермиями; *Б* – колония водорослей *Volvox*; *В* – альгинатные микрогранулы.

27.1.8. Влияние криоконсервирования на сохранность сперматозоидов

Сохранность сперматозоидов после размораживания оценивают под микроскопом по их подвижности и морфологическим характеристикам. Если 70% сперматозоидов восстанавливают подвижность, то такой образец используется для оплодотворения ооцитов *in vitro* или проведения искусственной инсеминации *in vivo*. После размораживания необходимо произвести строгий контроль морфологии спермиев, потому что даже подвижные спермии с аномальными морфологическими характеристиками могут оказать отрицательное влияние на дальнейшее развитие эмбрионов.

27.2. Криоконсервирование доимплантационных эмбрионов человека

Первая беременность, после переноса в полость матки женщины замороженного эмбриона, была получена в 1983 году. В Украине ребенок из криоконсервированного эмбриона родился в Харькове, в 2003 году, благодаря работе сотрудников ИПКиК.

27.2.1. Морфологические характеристики доимплантационных эмбрионов человека

Доимплантационный эмбрион – ранняя стадия развития человека, начиная от оплодотворённой яйцеклетки (зиготы) до бластоцисты.

Благодаря методу оплодотворения *in vitro* ученые получили возможность изучать влияние криоконсервирования на морфофункциональные характеристики ранних эмбрионов человека.

Эмбрионы человека в условиях *in vitro* развиваются на протяжении 5 дней после оплодотворения. Разработаны методы криоконсервирования доимплантационных эмбрионов человека для всех стадий развития: зиготы (оплодотворенная яйцеклетка), 2-х, 4-х, 8-ми клеточной, морулы и бластоцисты (рис. 27.5).

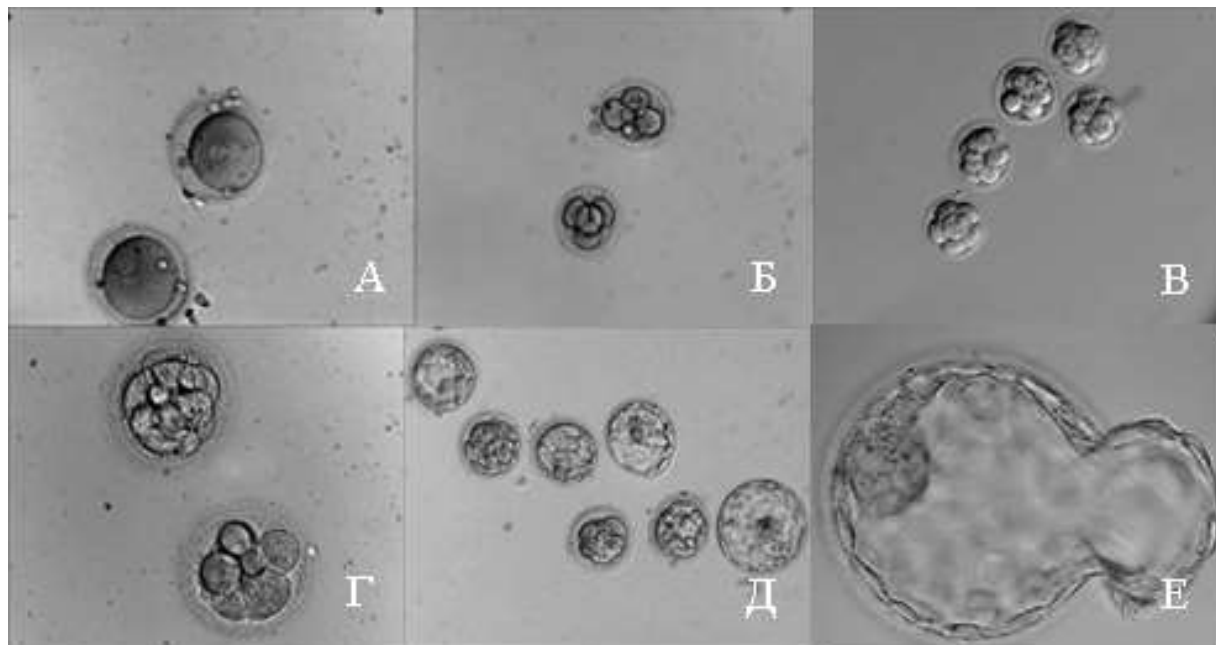


Рис.27.5 . Эмбрионы человека на ранних стадиях развития *in vitro*: А – зигота, $\times 400$; Б – 4-клеточная, $\times 200$); В – 8-клеточная, $\times 200$; Г – морула, $\times 400$, Д – бластоциста, $\times 200$; Е – бластоциста в стадии «вылупления» $\times 600$.

27.2.2. Показания для криоконсервирования эмбрионов

Показаниями криоконсервирования эмбрионов в циклах лечения бесплодия методами ВРТ являются:

- Наличие «избыточных» эмбрионов хорошего качества в циклах лечения бесплодия методом ВРТ. В том случае, если пациентка захочет позже родить еще одного ребенка, или предыдущая попытка переноса оказалась неудачной, то можно будет использовать криоконсервированные эмбрионы.
- При низком размере эндометрия или нарушенном гормональном фоне у женщины, когда шансы на успешную имплантацию эмбриона в цикле стимуляции невелики.
- Нестабильные клинические состояния пациентки (риск развития синдрома гиперстимуляции яичников, инфекция и т.д.).

27.2.3. Методы криоконсервирования эмбрионов человека

Существуют различные методы криоконсервирования, которые отличаются друг от друга типом и концентрацией используемых

криопротекторов, временем инкубации и скоростями охлаждения. В настоящее время применяется два основных подхода к криоконсервированию эмбрионов: медленное замораживание и витрификация.

Медленное замораживание в присутствии проникающих криопротекторов позволяет обеспечить достаточную клеточную дегидратацию и минимизировать образование внутриклеточного льда (Рис.27.6).



Рис.27.6. Дегидратация и сжатие доимплантационного эмбриона на стадии бластоциста в 30% р-ре ДМСО при медленном замораживании, х600.

Перед замораживанием эмбрионы насыщают раствором проникающего криопротектора. Для этого их из культуральной среды поочередно переносят в растворы с повышающейся концентрацией раствора криопротектора: 0,5 М, 1М, 1,5М. Общее время инкубации составляет 10-20 мин. Затем эмбрионы помещают в криосоломинку, а потом в программируемый замораживатель. Сначала эмбрионы охлаждают со скоростью 2 град/мин от 22 до минус 5,5° С. После инициации кристаллизации охлаждение ведется со скоростью 0,3 град/ мин до минус 32°С, после чего соломинки погружают в жидкий азот.

Отогрев эмбрионов производят быстро, путем выдерживания соломинок в течение 30 сек при комнатной температуре и последующим их погружением в водяную баню (37°С). После исчезновения кристаллов льда образец выдерживают при комнатной температуре 5 мин. Эмбрионы высвобождают из соломинки и осуществляют их перенос в среды с убывающей концентрацией растворов криопротекторов. Далее проводят морфологическую оценку эмбрионов при помощи световой микроскопии. Затем эмбрионы культивируют *in vitro*. Оценку жизнеспособности эмбрионов проводят через 24 ч культивирования по результатам прохождения следующего этапа дробления.

Для криоконсервирования методом *витрификации* эмбрионы помещают на 10-15 мин в раствор на основе фосфатного буфера с добавлением 15% проникающего криопротектора (ЭГ, 1-2 ПД, ДМСО) и 0,5М непроникающего криопротектора (сахароза), затем переносят на 20 сек в раствор с удвоенной концентрацией криопротектора и помещают на открытый носитель - тонкую полипропиленовую полоску, прикрепленную к пластиковой ручке (рис.27.7). Носитель с эмбрионом немедленно

погружают в жидкий азот. При этом скорость охлаждения достаточно высока – порядка 20000 град/ мин, которая обеспечивает стеклование биообъекта.



Рис. 27.7. Специальный носитель для криоконсервирования методом витрификации ооцитов и эмбрионов человека.
Объекты помещают на носитель с помощью микропипетки.

27.2.4. Криопротекторы для замораживания эмбрионов

Для криоконсервирования эмбрионов используют проникающие криопротекторы – глицерин, ДМСО, пропиленгликоль, этиленгликоль и непроникающие – изопропанол, сахароза, манноза, трегалоза, фиколл.

В некоторых случаях создаются криозащитные среды, которые могут быть одно-, дву-, трех- и многокомпонентными (по количеству применяемых криопротекторов). Концентрация криопротекторов в составе криозащитного раствора может колебаться от 5 до 40%.

27.2.5. Особенности криоконсервирования эмбрионов разных стадий развития

Дискуссионным остается вопрос относительно оптимальной стадии развития эмбриона, способной перенести условия глубокого охлаждения.

Существуют противоречивые выводы о криоконсервировании эмбрионов человека на стадии зиготы. Криоконсервирование эмбрионов второго и третьего дня развития *in vitro* имеет свои особенности. Как правило, такие эмбрионы замораживают медленно.

Эмбрионы поздних стадий развития (морула и бластоциста) криоконсервируют путем витрификации. Для бластоцисты применяют методики уменьшения бластоцеля (полости бластулы, заполненной жидкостью) на этапе подготовки к замораживанию, которые приводят к повышению частоты их выживаемости.

27.2.6. Влияние криоконсервирования на жизнеспособность эмбрионов человека

Насколько хорошо эмбрионы переживут размораживание, зависит от метода криоконсервирования и их качества перед замораживанием. Обычно частота выживаемости варьирует от 50 до 80 % при медленном замораживании, и до 100% – при витрификации. Целый спектр вопросов влияния факторов криоконсервирования на морфофункциональные

характеристики эмбрионов человека остается открытым, и пока не получено убедительных доказательств безопасности криоконсервирования для генетического аппарата клеток эмбриона.

27.3. Криоконсервирование ооцитов человека

Из-за очень низких показателей выживаемости ооцитов после замораживания экспериментальные работы в области их долгосрочного хранения развивались очень медленно. Только в 1999 году удалось впервые криоконсервировать ооциты человека и заявить о наступлении беременности после переноса эмбриона.

27.3.1. Морфологические характеристики доимплантационных ооцитов человека

Ооцитами называют женские половые клетки, которые могут находиться на разных стадиях развития (Рис.27.8), а *яйцеклетка* – это уже зрелый ооцит, готовый к овуляции.

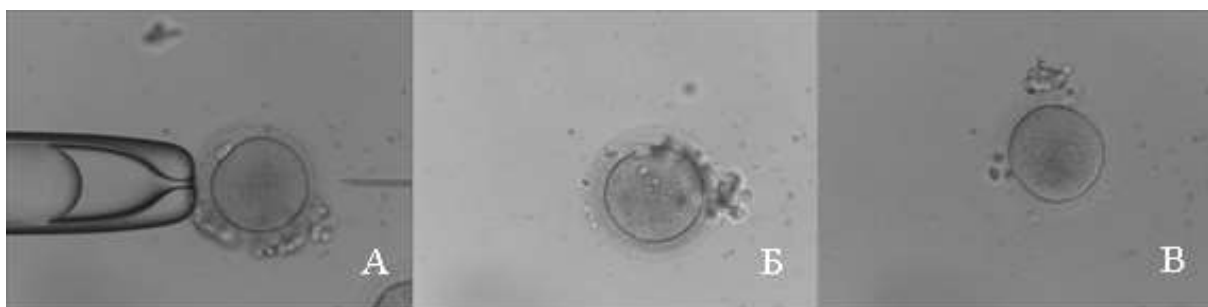


Рис. 27.8. Ооциты человека разной степени зрелости: *А - яйцеклетка - зрелый ооцит человека, Б - незрелый ооцит, В - глубоко незрелый ооцит, х 800.*

Долгое время ооциты не удавалось криоконсервировать из-за особенности их строения:

- Большие размеры. Ооцит – самая большая клетка в организме человека (130-140 мкм).
- Цитоплазма ооцита на 80% состоит из воды.
- Низкое соотношение площади поверхности клетки к ее объему.
- Мейотическое веретено деления чувствительно к перепадам температуры.

27.3.2. Показания для криоконсервирования ооцитов

- риск потери овариальной функции после радио- или химиотерапии у онкологических больных;
- экстренные ситуации в программах ВРТ, например, если в день извлечения ооцитов невозможно получить сперматозоиды мужа для оплодотворения яйцеклеток;

- создание криобанка донорских ооцитов.

27.3.3. Методы криоконсервирования ооцитов человека

Ооциты удается криоконсервировать только методом витрификации.

Ооциты, полученные после аспирации фолликулов, извлекают из фолликулярной жидкости и переносят в планшеты со средой культивирования, которые помещаются в CO₂-инкубатор на 3-4 ч. Ооциты переносят на 10-15 мин в 15% раствор проникающего и 0,25 М непроникающего криопротектора, а затем - на 20 сек в 30% раствор проникающего и 0,5 М непроникающего криопротектора для обезвоживания и насыщения раствором криопротектора (Рис.27.9).



Рис. 27.9. Ооцит человека в витрифицирующем растворе. Дегидратация (обезвоживание) ооцита, $\times 600$.

Ооциты быстро переносят в минимальном объеме витрифицирующего раствора ($<0,1$ мкл) на носитель и немедленно погружают в жидкий азот.

27.3.4. Криопротекторы для замораживания ооцитов

Для витрификации ооцитов человека используют высокие концентрации проникающих (этиленгликоль, ДМСО, пропандиол) и непроникающих (сахароза, трегалоза) криопротекторов.

Проникающие криопротекторы применяют для снижения количества свободной воды в клетке, непроникающие – для повышения проницаемости мембраны.

27.3.5. Размораживание ооцитов и удаление криопротектора

Подходы к размораживанию ооцитов аналогичны тем, которые применяются при размораживании эмбрионов.

27.3.6. Влияние криоконсервирования на жизнеспособность ооцитов

Сложность криоконсервирования ооцитов человека состоит в чувствительности их мейотического аппарата к колебаниям температур, которая нарушает процессы распределения генетического материала при делении клетки. Факторы криоконсервирования могут вызывать увеличение частоты хромосомных патологий (анеуплоидии, полиплоидии) и вызывать

структурные модификации оболочек яйцеклеток, в частности, *zona pellucida*. Сохранность ооцитов после криоконсервирования составляет более 80 %.

После размораживания ооциты оплодотворяют сперматозоидами с помощью микроманипуляций *in vitro*, так как естественное оплодотворение невозможно из-за затвердевания *zona pellucida*. При наличии оплодотворения эмбрион культивируют *in vitro* на протяжении пяти суток и по достижению стадии бластоцисты переносят в полость матки пациентки. С целью переноса в полость матки только полноценных эмбрионов, рекомендуется проведение их доимплантационной генетической диагностики.

Рекомендованная литература

1. Aragval A. Manual of Assisted Reproductive Technologies and Clinical Embryology. 2012.- Medicine & Health Science Books.- 900p.
2. Гольцев А.Н. (ред.) Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины.- Х., 2012, 767 с.
3. Дахно Ф.В. 1+1=3. Біотехнологія запліднення ін вітро (одна з методик ДРТ). К., 2014.- 311 с.
4. Katkov I. Current Frontiers in Cryopreservation.-, 2012.- InTech.- 480 p.
5. Петрушко М.П. Сучасний стан проблеми кріоконсервування репродуктивних клітин та ембріонів людини // Вісник НАН України.- 2017.- №7.- С.44-52.
6. Yurchuk T., Petrushko M. Fuller B. Science of cryopreservation in reproductive medicine – Embryos and oocytes as exemplars. Early Human Development. 2018. 126. 6-9.
<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016>.

Глава 28. Криоконсервирование клеток крови человека

28.1. Криоконсервирование эритроцитов. 28.1.1. Краткие представления о структуре и функции эритроцитов. 28.1.2. Задачи и основные подходы. 28.1.3. Основные этапы криоконсервирования эритроцитов. 28.2. Криоконсервирование эритроцитов с проникающими криопротекторами. 28.2.1. Методы криоконсервирования эритроцитов с глицерином. 28.2.2. Метод криоконсервирования эритроцитов с 1,2-ПД. 28.2.3. Метод криоконсервирования эритроцитов в комбинированном криоконсерванте на основе 1,2-ПД и ДМАЦ. 28.3. Криоконсервирование эритроцитов с непроникающими криопротекторами. 28.3.1. Метод криоконсервирования эритроцитов с ПВП. 28.3.2. Метод криоконсервирования эритроцитов с ГЭК. 28.3.3. Методы криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500. 28.4. Методы криоконсервирования тромбоцитов. 28.4.1. Структура и функции тромбоцитов. 28.4.2. Криоконсервирование тромбоцитов под защитой ДМСО. 28.4.3. Криоконсервирование тромбоцитов под защитой глицерина. 28.4.4. Криоконсервирование тромбоцитов под защитой ДМАЦ. 28.5. Методы криоконсервирования лейкоцитов. 28.5.1. Краткая характеристика лейкоцитов. 28.5.2. Криоконсервирование лейкоцитов с глицерином. 28.5.3. Метод криоконсервирования лейкоцитов с ДМСО. 28.5.4. Метод криоконсервирования лейкоцитов с ДМАЦ. 28.5.5. Метод криоконсервирования лейкоцитов с ПЭО-400. 28.6. Применение криоконсервированных клеток. 28.6.1. Компонентная гемотерапия. 28.6.2. Применение криоконсервированных эритроцитов. 28.6.3. Применение криоконсервированных тромбоцитов. 28.6.4. Применение криоконсервированных лейкоцитов.

Клетки крови человека.

В крови человека обнаруживается три разновидности клеток (Рис.28.1): эритроциты – $4,3\text{—}5,5 \times 10^{12}$ кл/л, 2 – тромбоциты – $150\text{—}400 \times 10^9$ кл/л, лейкоциты – $4\text{—}9 \times 10^9$ кл/л.

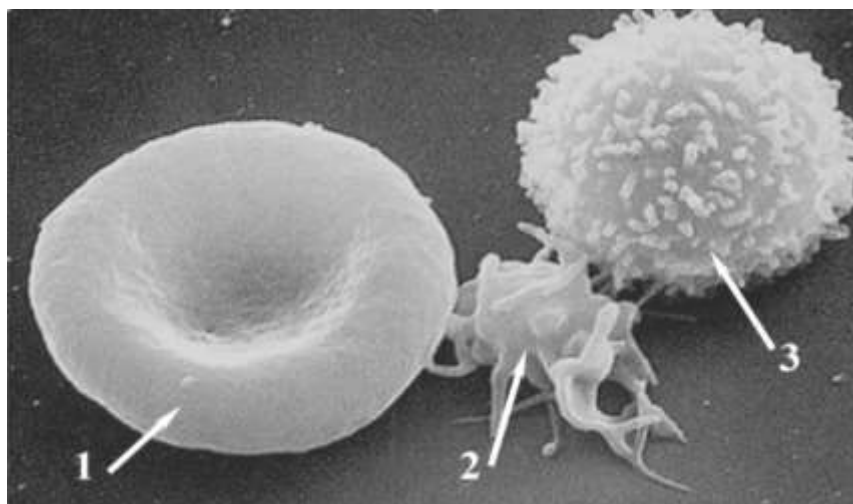


Рис. 28.1. Клетки крови человека под сканирующим электронным микроскопом. 1 – эритроцит, 2 – тромбоцит, 3 – лейкоцит.

28.1. Криоконсервирование эритроцитов

28.1.1. Краткие представления о структуре и функции эритроцитов

Зрелые эритроциты человека не имеют ядра и цитоплазматических органелл. Тем не менее, это клетки, обладающие строго ограниченной и специфической активностью. Эритроциты осуществляют транспорт кислорода из легких в ткани и углекислого газа из тканей в легкие.

Кроме того, эритроциты принимают участие в регулировании кислотно-основного баланса и водно-электролитного обмена, тромбообразовании, иммунных реакциях, в связывании и переносе аминокислот, липидов, вирусов, лекарств и т.д.

Эритроциты имеют форму двояковогнутого диска (Рис.11.1, 28.1). Такая форма позволяет им эффективно участвовать в газообмене. Размеры эритроцитов изменчивы, но в норме их диаметр равен 7,5-8,3 мкм, толщина – 2,1 мкм, площадь поверхности – 145 мкм², объем – 86 мкм³.

Благодаря своей форме эритроциты обладают способностью к обратимой деформации при прохождении через узкие капилляры, что обеспечивает текучесть крови по кровеносной системе организма млекопитающих. В обеспечении этих свойств важную роль играет цитоскелет эритроцитов (Рис.11.2, 11.3).

Выполнение основной функции эритроцитов обусловлено наличием в их составе белка гемоглобина. Его основное назначение — транспорт O₂ и CO₂. Кроме того, гемоглобин обладает буферными свойствами, а также способностью связывать некоторые токсичные вещества.

28.1.2. Задачи и основные подходы

Криоконсервирование эритроцитов является оптимальным способом для их длительного хранения в функционально полноценном состоянии. Замороженные эритроциты могут быть использованы для создания стратегических запасов эритроцитсодержащих гемокомпонентов, организации банков крови с редким фенотипом, а также аутологических гемокомпонентов.

Для долгосрочного хранения эритроцитов в замороженном состоянии были разработаны методы их криоконсервирования на основе проникающих (глицерин, 1,2-пропандиол (1,2-ПД)) и непроникающих криопротекторов (гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), полиэтиленоксид-1500 (ПЭО-1500), поливинилпирролидон (ПВП)). В зависимости от режима охлаждения и дальнейшего хранения эритроцитов эти методы были разделены на две группы:

- методы быстрого замораживания эритроцитов при ультранизкой температуре минус 196°C;
- методы медленного замораживания эритроцитов при умеренно низких температурах (минус 80 и минус 40°C).

В мировой практике большинство исследователей и практикующих специалистов отдают предпочтение методам криоконсервирования эритроцитов с глицерином с использованием аппарата «Haemonetics ACP-215».

В нашей стране регламентированы к использованию методы криоконсервирования эритроцитов под защитой криоконсервантов на основе проникающих криопротекторов глицерина (ЦНДИГПК11₅, ЦНДИГПК11₅₍₅₅₎) и 1,2-ПД («Пропандиосахароль»). Методы криоконсервирования эритроцитов с непроникающими криопротекторами практически не используются.

28.1.3. Основные этапы криоконсервирования эритроцитов

Технологический процесс криоконсервирования эритроцитов – это цепь последовательных этапов, включающих подготовку к замораживанию, куда относится регистрация, отбор крови, выделение эритроцитарного концентрата, распределение по криоконтейнерам и введение криоконсерванта, замораживание и последующее долгосрочное хранение, размораживание, отмывание (в случае использования проникающих криопротекторов) и ресуспендирование в плазмозамещающем растворе перед трансфузией.

Для криоконсервирования используют эритроцитарную массу, которая выделяется из цельной крови методом центрифугирования. Следующим этапом является введение криоконсерванта в клетки. Существует два способа введения: капельное и одномоментное. Большинство криоконсервантов вводится в клетки капельным путем, это позволяет эритроцитам избежать гипертонического гемолиза, вызванного перепадом осмотического давления в клеточной суспензии.

Важным и наиболее сложным этапом в технологическом процессе криоконсервирования эритроцитов является удаление криоконсерванта из размороженных клеток. Отмывание эритроцитов от проникающих криопротекторов основано на принципе постепенного разведения содержащих криоконсервант эритроцитов отмывающими растворами. Эти растворы готовят на основе непроникающих в клетку соединений – маннита, сахарозы, хлористого натрия. Они имеют различное осмотическое давление и гипертоничны по отношению к клеточной суспензии. Благодаря этому криоконсервант можно удалить из клеток и избежать их лизиса при перенесении в физиологические условия.

Ресуспендирование эритроцитов в плазмозамещающих растворах после размораживания используется как для клеток, замороженных под защитой проникающих, так и непроникающих криопротекторов. Это обусловлено тем, что клетки необходимо развести до определенной концентрации перед использованием, а также поддержать их функциональную активность. Для этих целей разработаны различные растворы ЦНИИГПК 8₆, 8_в, SAGM, AS-5 и др.

Замораживание и долгосрочное хранение эритроцитов осуществляют в одноразовых стерильных пластиковых криоконтейнерах. Для исключения перекрестной контаминации замороженных доз эритроцитов (при нарушении целостности криоконтейнера) применяют герметичные оберточные контейнеры. Эти контейнеры сделанные из того же материала, что и криоконтейнер. Выбор криоконтейнера для замораживания обусловлен типом используемого криогенного оборудования, объемом клеточной суспензии.

Для защиты пластиковых криоконтейнеров от механических повреждений, которые могут возникнуть при хранении, применяют специально разработанные криокассеты.

Замораживание эритроцитомассы проводят путем погружения в жидкий азот или помещают в рефрижераторы.

Хранение эритроцитов, замороженных при температуре минус 196°C, осуществляют в специально разработанных жидкоазотных криохранилищах, а клетки, замороженные при температуре минус 40 – минус 80°C, хранят в рефрижераторах.

Отогрев клеточной суспензии осуществляют с помощью электрической водяной бани при температуре 40-45°C, в которую вмонтирована рамка для покачивания контейнера в процессе отогрева.

28.2. Криоконсервирование эритроцитов с проникающими криопротекторами

28.2.1. Методы криоконсервирования эритроцитов с глицерином

До настоящего времени для долгосрочного хранения эритроцитов используются методы криоконсервирования эритроцитов под защитой глицерина с использованием жидкого азота (минус 196°C) или электрических рефрижераторов (минус 80°C).

Для быстрого замораживания эритроцитов при температуре минус 196°C используют криоконсерванты (ЦНИИГПК 11₄, ЦНИИГПК 11₅ и др.), содержащие глицерин в 30-40% концентрации. Для медленного замораживания эритроцитов при минус 40 и минус 80°C разработаны криоконсерванты на основе 57 и 79% глицерина соответственно (табл. 28.1).

При соблюдении соответствующих режимов охлаждения-отогрева сохранность размороженных эритроцитов при использовании любого из этих методов оказывается практически одинаковой, примерно 80%. Однако чем выше концентрация глицерина, тем больше времени требуется для удаления клеток из клеточной взвеси.

Таблица 28.1. Методы криоконсервирования эритроцитов с глицерином

Условия замораживания	Концентрация глицерина	
	Высокая	Низкая
Концентрация глицерина	79%/57%	30 или 40%
Температура охлаждения	-40 или -80°C	-196°C
Скорость охлаждения	Медленная	Быстрая
Тип охлаждения	Рефрижератор	Жидкий азот
Тип криоконтейнера для хранения	Пластикатный	Пластикатный
Транспортировка	Сухой лед	Жидкий азот
Срок хранения	До 10 лет	Более 10 лет

К общим недостаткам методов криоконсервирования эритроцитов с глицерином относят трудоемкий и дорогостоящий процесс отмывания эритроцитов, предусматривающий повторные циклы отмывания (от 3-х до 5-ти), большие потери эритроцитов (до 20% от исходного объема), а также короткий срок хранения (24 ч) размороженных и отмывших эритроцитов.

28.2.2. Метод криоконсервирования эритроцитов с 1,2-ПД

В ИПКиК НАН Украины разработан высокоэффективный метод криоконсервирования эритроцитов под защитой криоконсерванта «Пропандиосахароль» (Рис. 28.2). По сравнению с методами на основе

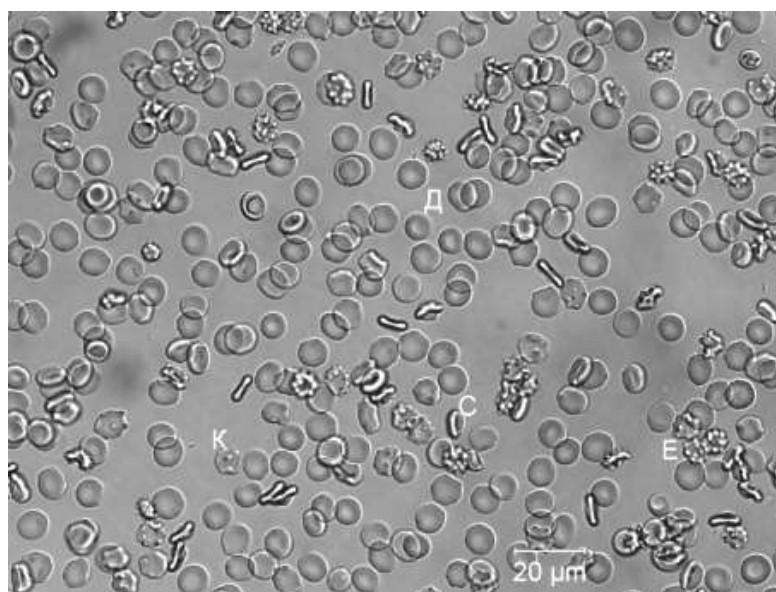


Рис. 28.2. Позитивное структурное состояние эритроцитов донорской крови человека после криоконсервирования под защитой криоконсерванта «Пропандиосахароль». Несмотря на действие неблагоприятных факторов замораживания-отогрева-отмывания, сохраняется до 80% полноценных клеток. Д – нормальные дискоциты; Е – эхиноциты – сфероциты с выпячиванием мембраны; К – кренированные – сфероциты с измененной поверхностью; С – стоматоциты – выпуклые эритроциты.

глицерина этот метод криоконсервирования эритроцитов имеет ряд преимуществ: допускает одно- или двухэтапное удаление криопротектора из размороженных клеток, снижает в два раза потери клеток в цикле криоконсервирования, увеличивает срок их гипотермического хранения до 48 часов. Кроме того, размороженные клетки могут сохраняться без удаления криоконсерванта более суток, что невозможно в случае использования глицерина.

Апробация клинического применения эритроцитов, криоконсервированных под защитой «Пропандиосахароля», выявила высокую функциональную полноценность и клиническую эффективность размороженных клеток.

28.2.3. Метод криоконсервирования эритроцитов в комбинированном криоконсерванте на основе 1,2-ПД и ДМАЦ

Апробирован метод криоконсервирования эритроцитов под защитой комбинированного криоконсерванта, содержащего два проникающих криопротектора 1,2-ПД и ДМАЦ в концентрации 37 и 5% соответственно. Метод обеспечивает до 93% сохраненных эритроцитов, что свидетельствует о некотором преимуществе этого метода перед криоконсервированием эритроцитов с глицерином.

28.3. Методы криоконсервирования эритроцитов на основе непроникающих криопротекторов

Значительное внимание при низкотемпературном консервировании красных клеток крови было уделено разработке методов на основе непроникающих криопротекторов – ПВП м.м. 12 600, ПЭО-1500, ГЭК 200 кДа. Технологический процесс криоконсервирования эритроцитов с использованием непроникающих криопротекторов является простым, так как не требует удаления криоконсерванта из клеточной взвеси перед трансфузией. Однако ни один из разработанных способов низкотемпературного хранения эритроцитов с непроникающими криопротекторами не используется в клинической практике. Основной причиной этого является низкая осмотическая устойчивость клеток после замораживания-отогрева и перенесения их в физиологические условия. Также непроникающие криопротекторы могут накапливаться в ретикулоэндотелиальной системе человека и провоцировать различные функциональные нарушения в организме человека.

28.3.1. Метод криоконсервирования эритроцитов с ПВП

В 1960 годы был разработан довольно эффективный метод криоконсервирования эритроцитов под защитой ПВП, который позволил сохранить высокий уровень функционально-полноценных клеток. В дальнейшем было установлено, что эти клетки не пригодны для трансфузий,

поскольку криоконсерванты на основе ПВП обладают канцерогенными свойствами.

28.3.2. Метод криоконсервирования эритроцитов с ГЭК

На основе ГЭК было разработано два метода криоконсервирования эритроцитов:

1. метод замораживания с 40% ГЭК м.м. 250 кДа при минус 196°С;
2. метод замораживания эритроцитов с 23,5% ГЭК м.м. 200 кДа при той же температуре.

Несмотря на высокую сохранность клеток после размораживания, существенным недостатком данных способов криоконсервирования эритроцитов является способность ГЭК депонироваться в ретикулоэндотелиальной системе человеческого организма, вызывать нарушения в свертывающей системе крови при переливании эритроцитной массы в количестве более 4 доз. Кроме того, криоконсерванты на основе ГЭК могут провоцировать аллергические и анафилактические реакции у пациентов после трансфузий.

28.3.3. Методы криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500

На основе ПЭО-1500 разработано два метода криоконсервирования эритроцитов:

1. метод замораживания с 40% ПЭО-1500 в сочетании с холин хлоридом погружением в жидкий азот;
2. метод замораживания в жидком азоте с 30% ПЭО-1500, включающий предварительную холодовую адаптацию клеток при температуре 0-4°С.

Сохранность эритроцитов после размораживания составляет 85-90%. Благодаря тому, что криоконсервант на основе ПЭО-1500 вводят в условиях гипотермии (0-4°С), он оказывает меньшее повреждающее действие на мембраны эритроцитов.

Таким образом, для практики разработаны различные подходы к решению проблемы долгосрочного хранения эритроцитов. Выбор метода замораживания во многом зависит от наличия соответствующего оборудования, цели криоконсервирования (кратко- или долгосрочное хранение), места использования (научные исследования, клиники, полевые госпитали).

28.4. Методы криоконсервирования тромбоцитов

28.4.1. Структура и функции тромбоцитов

Тромбоциты (кровяные пластинки) – безъядерные форменные элементы крови, осуществляющие важнейшую функцию – предохраняют организм от потери крови. Тромбоциты (Рис. 28.4) представляют собой пластинки округлой или овальной формы с диаметром 2-5 мкм, которые

фактически являются фрагментами цитоплазмы самых больших клеток костного мозга – мегакариоцитов. Количество тромбоцитов в крови здорового человека колеблется от 180 000 до 300 000 в 1 мкл, срок их циркуляции (время жизни) – 8-11 дней. В кровотоке взрослого человека циркулирует примерно 10^{12} тромбоцитов. Часть циркулирующих тромбоцитов находится в пристеночных резервуарах, расположенных в конечных сосудах селезенки, печени, легких и др. органов.

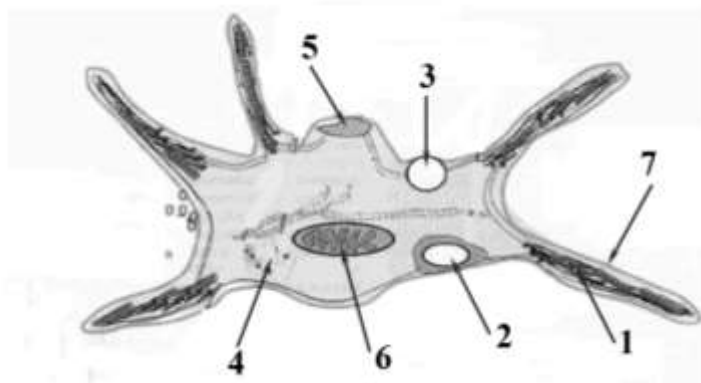


Рис. 28.3. Тромбоцит. 1 - микротрубочки, 2 - альфа-гранулы, 3 - плотные гранулы, 4 - гликоген, 5 - лизосомы, 6 - митохондрии, 7 - псевдоподии.

Мембрана тромбоцитов толщиной 7-9 нм состоит из двух белковых и одного липидного (бимолекулярного) слоя. На внешней стороне мембраны расположен аморфный слой толщиной около 50 нм, состоящий из кислых мукополисахаридов: хондроитинсульфата В, гепаринсульфата. На поверхности тромбоцитов адсорбированы факторы свертывания плазмы – фибриноген, факторы V, VII, VIII, IX, X, XI и XII. В тромбоцитах содержатся многочисленные ферменты и осуществляются разнообразные процессы: окислительное фосфорилирование, гликолиз, процессы биосинтеза белков, в том числе и белка (тромбостенина) и др.

С помощью электронной микроскопии установлено, что кровяные пластинки обладают сложной морфологической структурой. По периферии клетки расположена гиалоплазма (гиаломер), состоящая из гомогенного вещества и содержащая тонко-сетчатые структуры, вакуоли, небольшие гранулы (ферритин), а также включения гликогена. Центральная часть тромбоцита – грануломер – состоит из α -; β -; γ - и δ -гранул. Их роль в физиологии и функции тромбоцитов окончательно не установлена, однако, по имеющимся данным, α -гранулы, составляющие большую часть грануломера, содержат фактор свертывания III; β -гранулы идентичны митохондриям других клеток, содержат ферменты цикла трикарбоновых кислот и дыхательной цепи. γ -Гранулы связывают с сегментарным аппаратом пластинчатого компонента, они морфологически неоднородны (большие пузырьки, вакуоли, тубулы).

Тромбоциты крайне лабильны и чувствительны к малейшим изменениям окружающей среды (температура, pH, осмотичность, физические, химические, механические факторы). Через поверхностные рецепторы тромбоциты воспринимают различные раздражения и отвечают на них серией сложных биохимических и физических изменений, поэтому они неустойчивы к различным воздействиям, в том числе процедурам выделения, хранения и особенно – криоконсервирования.

Вместе с тем, их уникальные свойства - причина постоянно возрастающей потребности лечебных учреждений во всем мире в трансфузиях тромбоцитов, что стимулирует разработку эффективных методов выделения, консервирования и криоконсервирования этих компонентов крови.

Для криоконсервирования используют **концентраты тромбоцитов (КТ)**, которые могут быть получены методом дифференцированного центрифугирования отдельных доз свежезаготовленной цельной крови, методом автоматического цитафереза с помощью автоматических сепараторов клеток крови.

Создание в низкотемпературных банках запасов концентратов тромбоцитов, в том числе аутологичных, а также типированных по антигенам систем HLA (“human leukocyte antigens”) и HPA (“human platelet antigens”), во многом способствовало бы решению сложной проблемы их клинического применения.

Основным лимитирующим фактором эффективного криоконсервирования тромбоцитов является токсичность криопротекторов, что в сочетании с крайне низкой устойчивостью кровяных пластинок к действию химических веществ значительно ограничивает как спектр криопротекторов, так и диапазон их концентраций.

Вместе с тем, ряд методов криоконсервирования тромбоцитов при умеренно низких (минус 70-80°C) и низких (минус 150-196°C) температурах прошли широкую клиническую апробацию и могут использоваться в практической медицине.

28.4.2. Криоконсервирование тромбоцитов под защитой ДМСО.

ДМСО применяется в качестве криопротектора для замораживания и хранения тромбоцитов как в морозильной камере, при умеренно низких температурах (минус 70-80°C), так и в жидком азоте или его парах (минус 150-196°C).

Методы криоконсервирования тромбоцитов с ДМСО, разработанные разными авторами, имеют целый ряд сходных технологических моментов: ДМСО применяется в 5%-ной (реже 4 или 6%-ной) конечной концентрации; ограждающий раствор добавляется и удаляется медленно, что уменьшает осмотические повреждения кровяных пластинок; режим замораживания – программное охлаждение преимущественно с низкой скоростью, 1 град/мин

или 2-3 град/мин; иногда 8-10 град/мин или неконтролируемое охлаждение в парах азота; отогрев производится в водяной бане при 37°C.

Сохранность тромбоцитов после замораживания с ДМСО составляет от 70 до 95%. Использование ДМСО позволяет сохранять часть тромбоцитов в функционально полноценном состоянии, обеспечивает их длительное хранение. Однако ни один из разработанных методов не предупреждает полностью развитие целого комплекса повреждений пластинок. Под действием процессов замораживания-отогрева-отмывания значительно повреждается ультраструктура кровяных пластинок, уменьшается содержание дисковидных форм, снижается их агрегационная активность, реакция на гипотонический шок и способность к активному накоплению серотонина, отмечается угнетение гликолиза, уменьшается содержание внутриклеточного АТФ, гликогена, нарушается реакция освобождения (секреция) содержимого гранул. После отогрева-отмывания наблюдается резкая активация лизосомальных ферментов, обусловленная повреждением лизосом. Срок хранения криоконсервированных с ДМСО тромбоцитов ограничен несколькими часами: после 6 часов хранения при 22°C развиваются значительные повреждения структуры, снижается функциональная активность размороженных клеток.

В то же время, по данным клинических наблюдений и исследований с помощью радиоизотопных методов, криоконсервированные с ДМСО тромбоциты характеризуются определенным уровнем гемостатической активности и способны циркулировать в кровеносном русле реципиента: их трансфузии больным с тромбоцитопенической кровоточивостью способствовали прекращению или уменьшению геморрагических явлений, повышению числа циркулирующих тромбоцитов. Показатели посттрансфузионной выживаемости тромбоцитов *in vivo* через 1-2 часа после трансфузии составляют 30-50%.

Метод криоконсервирования тромбоцитов с ДМСО называют одним из наиболее эффективных. Однако у криоконсервированных с ДМСО тромбоцитов есть существенный недостаток – развитие у реципиентов реакций и осложнений при переливании. Это связано с химической нестабильностью ДМСО и токсическим действием на больных продуктов распада этого криопротектора. Поэтому ДМСО необходимо полностью удалять из клеточной суспензии, предназначенной для трансфузий. С этой целью после отогрева проводится отмывание размороженных тромбоцитов, приводящее к дополнительным количественным потерям пластинок.

28.4.3. Криоконсервирование тромбоцитов под защитой глицерина

Глицерин – первый криопротектор, который применили при замораживании тромбоцитов. Один из первых разработанных методов криоконсервирования тромбоцитов с глицерином основывался на применении 14-15%-ной конечной концентрации криопротектора, скорости охлаждения 7-8 град/мин и хранении при минус 80°C. Показатель

восстановления криоконсервированных тромбоцитов в крови у больных с тромбоцитопенической кровоточивостью после переливания был низким – около 3%, однако их применение способствовало прекращению геморрагических явлений в первые 15-20 мин после трансфузии.

Позднее были разработаны методы криоконсервирования тромбоцитов с глицерином в 5%-ной конечной концентрации при разной скорости замораживания (1-5 град/мин; 30 град/мин и более) и температуре хранения минус 80°C; минус 196°C. В составе ограждающих растворов использовались глюкоза, плазма крови или маннитол. Замораживание тромбоцитов под защитой 5%-ного глицерина при медленных и средних скоростях охлаждения способствовало сохранению 70-80% кровяных пластинок, однако показатели их посттрансфузионной циркуляции были на низком уровне. Трансфузии криоконсервированных тромбоцитов выявили сохранность их гемостатической функции.

Недостатком глицерина в качестве криопротектора для тромбоцитов является развитие при отогреве спонтанной необратимой агрегации криоконсервированных пластинок, ухудшающей результаты криоконсервирования и приводящей к снижению количества жизнеспособных клеток.

28.4.4. Криоконсервирование тромбоцитов под защитой ДМАЦ

ДМАЦ по своим криозащитным свойствам соответствует или даже несколько превышает действие ДМСО и является перспективным криопротектором для тромбоцитов.

Исследование влияния растворов ДМАЦ на функциональные свойства тромбоцитов в период их инкубации показало, что этот криопротектор угнетает специфические функции кровяных пластинок, уменьшает реакцию на гипотонический шок, воздействует на липидные компоненты мембран. Однако эти изменения носят обратимый характер, и после удаления криопротектора функциональная активность тромбоцитов восстанавливается. Подобное влияние криозащитных веществ на функции клеток различного типа известно как «латентно-токсический эффект» криопротекторов.

ДМАЦ проявляет защитные свойства при использовании более низких концентраций в криозащитной среде в сравнении с ДМСО. На основе ДМАЦ разработан криоконсервирующий раствор для тромбоцитов – «Тромбокриодмац», содержащий 5%-ную концентрацию ДМАЦ в 5% глюкозе.

После криоконсервирования тромбоцитов в растворе «Тромбокриодмац» при скорости охлаждения 3-10 град/мин до минус 196°C сохранность тромбоцитов составляла 93-96%, но большинство тромбоцитов утрачивало нормальную дисковидную форму. Трансфузии криоконсервированных с ДМАЦ тромбоцитов пациентам с тромбоцитопенией продемонстрировали существенное уменьшение у больных явлений кровоточивости, уменьшение или нормализацию времени

кровотечения, увеличение числа циркулирующих тромбоцитов. ДМАЦ является менее токсичным, химически стабильным, не вызывает реакций и осложнений у реципиента. Поэтому переливать концентрат тромбоцитов, замороженных с консервантом «Тромбокриодмац» можно без отмывания.

28.5. Методы криоконсервирования лейкоцитов

28.5.1. Краткая характеристика лейкоцитов

Лейкоциты периферической крови по своей структуре и функциональным свойствам являются разнообразными сложно устроенными ядерными клетками (Рис. 28.1, 28.4). Количество лейкоцитов в крови взрослых людей составляет $4\text{—}9 \times 10^9$ кл/л. Это клетки иммунной системы человека, отвечающие за защиту организма. Их главная задача – защита от вирусов, бактерий, токсинов, инородных тел, отработанных шлаков. Каждый тип клеток лейкоцитарного ряда выполняет свою работу: так, одни настроены на обнаружение чужеродных элементов в организме, другие отвечают за распознавание «свой–чужой», а третьи передают полученную информацию молодым клеткам, то есть отвечают за иммунную память. Особая роль отведена клеткам, уничтожающим вредоносные для организма элементы: в их задачи входит, например, окружение опасных бактерий для последующего их растворения внутри клетки. Всего насчитывается пять подгрупп лейкоцитов. Нейтрофилы - уничтожают бактериальную инфекцию. Лимфоциты - отвечают за иммунитет в целом и иммунную память. Моноциты - поглощают частицы чужеродных агентов в крови. Эозинофилы - отвечают за борьбу с частицами-разносчиками аллергенов. Базофилы - помогают другим лейкоцитам обнаружить чужеродные частицы.

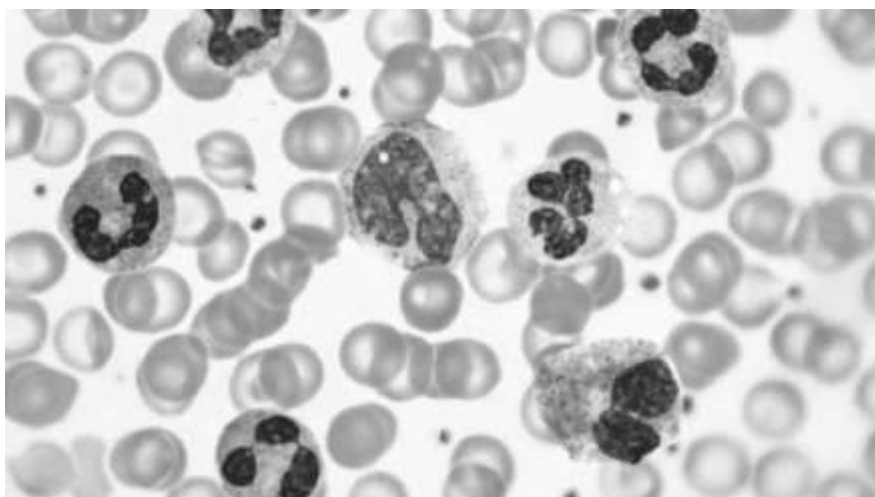


Рис. 28.4. Лейкоциты в крови среди эритроцитов

Основная функция полиморфноядерных гранулоцитов (нейтрофильные, базофильные, эозинофильные формы) – фагоцитоз. Они являются клеточными факторами защиты организма от чужеродного

материала. Базофилы и эозинофилы участвуют также в аллергических реакциях организма, базофилы – обмену гистамина и гепарина. Гранулоциты и моноциты склонны к адгезии и агрегации, что представляет определенные трудности для их выделения из цельной крови и консервирования.

Лейкоциты применяются в клинической практике в виде их концентрата (КЛ) – суспензия лейкоцитов в растворе для трансфузии с концентрацией в 4-8 раз больше, чем в периферической крови, с примесью эритроцитов, тромбоцитов и плазмы.

Наиболее оптимальным и перспективным методом получения лейкоцитов является метод лейкофереза с помощью автоматических сепараторов непрерывного действия. *In vitro* они являются очень лабильными, хрупкими, покрытыми чувствительной однослойной мембраной. Полученный концентрат лейкоцитов не подлежит хранению, поэтому он должен использоваться для трансфузий в ближайшие часы после заготовки.

Для практического применения были разработаны методы криоконсервирования ядродержащих клеток крови на основе использования в ограджающем растворе криопротекторов глицерина, ДМСО, ДМАЦ или ПЭО-400.

28.5.2. Метод криоконсервирования лейкоцитов с глицерином

Для замораживания лейкоцитов используется глицерин в 10-15% конечной концентрации, в состав ограджающего раствора вводят сахарозу, глюкозу, ЭДТА- Na_2 . Замораживание проводят со скоростью 1-3 град/мин до минус 196°C или ступенчатым охлаждением (1-3 град/мин) до минус 15-18°C, с последующим погружением в азот. Отогрев – в водяной бане при 40°C. Криопротектор из клеточной взвеси удаляют путем медленного разбавления её изотоничным углеводно-солевым раствором, с последующим центрифугированием и удалением надосадочной жидкости.

Количество сохранных клеток после криоконсервирования в суспензиях составило от 58 до 70% общей популяции, однако сохранность гранулоцитов составляла менее 50%.

28.5.3. Метод криоконсервирования лейкоцитов с ДМСО

ДМСО применяется в 10–15% конечной концентрации. В ограджающий раствор вводят сахарозу и ЭДТА- Na_2 . Замораживают со скоростью 1-3 град/мин до точки кристаллизации. Затем погружают в жидкий азот или охлаждают со скоростью 1-3 град/мин до температуры хранения - минус 80 или минус 196°C. Отогрев производят на водяной бане при 40°C. Удаляют ДМСО из клеточной суспензии путем медленного её разведения изотоническим углеводно-солевым раствором, центрифугированием с последующим удалением надосадочной жидкости.

После замораживания суммарной популяции лейкоцитов с ДМСО количество сохранных клеток составляла 74-85% клеток, их фагоцитарная активность варьировала в пределах 12-33%.

28.5.4. Метод криоконсервирования лейкоцитов с ДМАЦ

Метод криоконсервирования лейкоцитов с ДМАЦ основан на использовании криоконсерванта «Лейкокриодмац» (20% ДМАЦ и 20% глюкоза). Криоконсервант вводится в концентрат лейкоцитов в соотношении 1:3. Замораживание проводится по двухступенчатой программе: охлаждение со скоростью 1-3град/мин до точки кристаллизации, а затем 10 град/мин до минус 196°C. Отогрев проводят на водяной бане при температуре 40°C.

После криоконсервирования лейкоцитов с ДМАЦ количество сохранных клеток составляло 84%, способность к фагоцитозу сохранялась у 33-57% криоконсервированных клеток.

Концентрат лейкоцитов, замороженный с ДМАЦ, имеет ряд преимуществ по сравнению с ДМСО: низкие концентрации криопротектора, не требующие его удаления, отсутствие у больных реакций и осложнений.

28.5.5. Метод криоконсервирования лейкоцитов с ПЭО-400

Криопротектор смешанного действия ПЭО-400 использовали для разработки метода криоконсервирования лейкоцитов, не требующего удаления из клеточной суспензии перед трансфузией.

Криоконсервант, содержащий 50% раствор ПЭ-400 на 0,1М растворе фосфатного буфера, медленно добавляют к концентрату лейкоцитов в соотношении 1:4. Конечная концентрация ПЭО-400 в суспензии клеток составляет 10%. Охлаждение клеток ведется по специальной ступенчатой программе до минус 196°C. Отогрев проводят на водяной бане при 40°C, быстро, при постоянном покачивании контейнера с клетками. После замораживания-отогрева сохраняется 80% лейкоцитов. Трансфузии гранулоцитов имеют лечебное значение в борьбе с септическими осложнениями у больных с лейкопенией и ослабленной фагоцитарной активностью.

28.6. Применение криоконсервированных клеток

28.6.1. Компонентная гемотерапия

Достижения в области заготовки и фракционирования крови на компоненты, разработки эффективных методов их криоконсервирования, создание криобанков способствовали развитию трансфузионной тактики, получившей название **компонентная гемотерапия**.

Главный принцип компонентной гемотерапии состоит в замещении недостающих компонентов крови у реципиента соответствующим компонентом крови донора. Дифференцированное использование клеточных компонентов крови и белков плазмы в зависимости от их дефицита при

различной патологии дает возможность не только повысить эффективность гемотерапии, но и расширяет сферу использования донорской крови в качестве многокомпонентного полифункционального лечебного средства.

Для осуществления адекватной гемотерапии необходимо иметь четкое представление о характере патологического процесса у реципиента, о наличии и степени дефицита в объеме циркулирующей крови, ее клеточном, белковом и/или электролитном составе. Целенаправленность трансфузионной компонентной терапии состоит *в купировании опасного дефицита компонента крови*, который стал причиной нарушения стабильного состояния больного, с соответствующими клиническими проявлениями. Трансфузии отдельных клеточных и белковых компонентов крови, в том числе – криоконсервированных, явились важным достижением трансфузионной медицины.

28.6.2. Применение криоконсервированных эритроцитов

Трансфузии эритроцитов заняли доминирующее место в лечении анемических состояний различного генеза, в том числе острой кровопотери, геморрагического шока.

Криоконсервированные эритроциты являются полноценной гемотрансфузионной средой. В клинической практике преимущественно применяются эритроциты, замороженные с проникающими в клетку криопротекторами (глицерин, 1,2-пропандиол), которые предварительно проходят процедуру отмывания после отогрева.

Трансфузии размороженных эритроцитов применяются в лечебной практике в тех же дозах и по тем же показаниям, что и эритроцитарная масса, хранившиеся при положительной температуре.

Наряду с этим имеются специальные показания, основанные на особых преимуществах криоконсервированных эритроцитов:

- эритроциты, консервированные методом замораживания, после длительного хранения почти не отличаются по физиологическим свойствам (жизнеспособность и кислородтранспортная функция) от свежезаготовленной эритроцитной массы со сроком хранения 1-3 дня.
- в эритроцитсодержащей среде не содержится лимоннокислого натрия, большого количества калия, элементов метаболизма, накапливающихся в крови при гипотермическом хранении;
- во взвеси размороженных-отмытых эритроцитов имеется минимальное количество микроагрегатов, поэтому ее трансфузии способствуют профилактике посттрансфузионной легочной недостаточности;
- трансфузии (в том числе повторные) размороженных и отмытых эритроцитов, как правило, не сопровождаются посттрансфузионными реакциями благодаря тому, что при отмывании удаляются лейкоциты, тромбоциты и плазма. Они безопасны для применения у IgA-дефицитных

пациентов, имеющих клинически значимые IgA-антитела или у пациентов с тяжелыми иммунными реакциями на белки перелитой плазмы;

- при переливании размороженных-отмытых эритроцитов уменьшается частота возвратных фебрильных негемолитических реакций.

Криоконсервирование эритроцитов способствует решению проблемы заблаговременного накопления и длительного хранения аутологичных эритроцитов пациентов для проведения им аутогемотрансфузий при предстоящем оперативном лечении, а также больных с редкими групповыми факторами крови или у реципиентов опасных профессий. Создание запасов замороженных фенотипированных эритроцитов позволяет обеспечивать кровью реципиентов с редкой группой крови или множественными антителами.

28.6.3. Применение криоконсервированных тромбоцитов

Трансфузии концентратов тромбоцитов (КТ) имеют важное значение в клинической практике как эффективный метод лечения и профилактики геморрагических осложнений, обусловленных снижением числа тромбоцитов в периферической крови (тромбоцитопения) или их дисфункцией (тромбоцитопатия).

Трансфузии тромбоцитов позволили снизить летальность у больных с заболеваниями системы крови, среди которых 60-70% погибали ранее от кровотечений. Тромбоцитотерапия способствовала увеличению продолжительности жизни больных, сделала возможным проведение в полном объеме жестких интенсивных протоколов противоопухолевой химио- и лучевой терапии, в том числе в период выраженной депрессии кроветворения, способствовала совершенствованию интенсивных лечебных программ. Под «защитой» трансфузий тромбоцитов проводят операции трансплантации костного мозга и стволовых клеток, оперативные вмешательства с применением экстракорпорального кровообращения.

Главная проблема использованная тромбоцитов – развитие аллоиммунизации и рефрактерности. *Рефрактерность* – невосприимчивость к трансфузии КТ, отсутствие клинически выраженного лечебного эффекта от переливания.

Многолетний клинический и лабораторный мониторинг показал, что каждая трансфузия тромбоцитов может оказывать потенциально отрицательное действие на результаты последующих переливаний, вызывая образование антител к антигенам систем HLA и PI (специфические тромбоцитарные антигены) и формируя у больных состояние рефрактерности к трансфузиям КТ. При трансфузиях тромбоцитов могут передаваться возбудители опасных инфекционных заболеваний (вирус сывороточного гепатита, ВИЧ, цитомегаловирус и др.), а также развиваться реакции и осложнения, среди которых наиболее грозное – трансфузионно обусловленная болезнь «трансплантат-против-хозяина».

В мировой лечебной практике метод криоконсервирования используется в основном для трансфузий пациентам их собственных - аутологичных тромбоцитов:

- трансфузии криоконсервированных аутологичных тромбоцитов, заготовленных в период ремиссии пациентам, получающим химио- , лучевую терапию;
- трансфузии криоконсервированных аутологичных тромбоцитов при трансплантации костного мозга.

28.6.4. Применение криоконсервированных лейкоцитов

Основными показаниями к переливанию концентратов лейкоцитов (гранулоцитов) в соответствии с имеющимися *стандартами трансфузий* являются: неонатальный сепсис, гранулоцитопения (нейтропения) менее 500/мкл и гранулоцитопения при миелоидной гипоплазии у больных лейкозом, апластической анемией с наличием септицемии, резистентной к антибиотикотерапии; инфекция (легочный инфильтрат, абсцесс), некротические язвы. Для достижения клинического эффекта средней оптимальной дозой трансфузии считается 5×10^{10} лейкоцитов на 1 м² поверхности тела реципиента.

Клиническое применение *криоконсервированных лейкоцитов* находится на стадии эксперимента.

Рекомендуемая литература:

1. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы.- Киев: Наукова думка, 1978, 204 с.
2. Криоконсервирование клеточных суспензий. Под ред. А.А.Цуцаевой. – Киев: Наукова думка, 1983 - с.
3. Техническое руководство ААБК, 12-е издание, 1996, перевод под редакцией проф. Токарева Ю.Н. – 2000. 1055 с.
4. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Под ред. академика Гольцева А. – Харьков: 2012, 767 с.
5. Руководство по приготовлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови. – Рекомендации R (95) 15, 16-е издание, Совет Европы, - 2011 г. -490 с.
6. Life in the Frozen State /edited by Barry J. Fuller, Nick Lane, Erica E. Benson/, -. CRC Press LLC: 2004, 662 p
7. Бабийчук Л.А. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 / Л.А. Бабийчук, Н.Г. Землянских // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 1. – С. 35-41.
8. Sputtek A. Cryopreservation of human erythrocytes with hydroxyethyl starch (HES). Part 2. Post-haw viability / A. Sputtek, C. Bacher, R.

- Langer // Infusionsther. Transfusionsmed. – 1992. – Vol. 19, № 6. – P. 276-282.
9. Valery C.R. Cryopreservation of human blood products / C.R.Valery, G. Ragno // Transfusion Apheresis Science. – 2006. – Vol. 34, №3. – P. 271-287.
10. Воротилин А.М. Криоконсервирование эритроцитов человека под защитой криопротекторов на основе низкомолекулярных диолов: Автореф: дис. докт биол. наук. – Харьков, 1987. – 32 с.
11. Калеко С. П., Сидоркевич С. В., Петренко Г. И., Вильянинов В. Н., Багаутдинов Ш. М. Замораживание эритроцитов до –800С под защитой пропиленгликоля и диметилацетонида.// Трансфузиология. 2001. № 3.

Глава 29. Криоконсервирование стволовых клеток

29.1.Классификация и характеристика стволовых клеток. 29.1.1.Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). 29.1.2.Индукцированные плюрипотентные клетки (ИПК). 29.1.3.Взрослые стволовые клетки. 29.2.Криоконсервирование мезенхимальных клеток. 29.3.Криоконсервирование перепрограммированных и эмбриональных стволовых клеток. 29.4.Применение стволовых клеток. 29.4.1.Эмбриональные стволовые клетки. 29.4.2.Индукцированные плюрипотентные клетки. 29.4.3.Взрослые стволовые клетки. 29.5.Заключение.

29.1.Классификация и характеристика стволовых клеток

Существует несколько подходов к классификации стволовых клеток. В данном разделе мы будем придерживаться классификации на основе источника получения клеток. Согласно этой классификации, основными типами стволовых клеток являются эмбриональные стволовые клетки, взрослые стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные клетки (Табл.29.1).

Таблица 29.1. Сравнительная характеристика различных типов стволовых клеток

	Эмбриональные стволовые клетки	Индукцирован- ные плюрипотентные стволовые клетки	Взрослые стволовые клетки
Дифференцировоч- ный потенциал	Плюрипотентный	Плюрипотентный	Мультипотентный или унипотентный
Способность к росту в культуре	Практически неограниченный рост	Практически неограниченный рост	Определенное количество пассажей (от нескольких пассажей до нескольких десятков пассажей)
Экспрессия генов плюрипотентности	Высокая	Высокая	Слабая или совсем отсутствует
Риск возникновения мутаций	Средний	Высокий	Низкий
Риск формирования опухолей <i>in vivo</i>	Высокий	Высокий	Отсутствует
Ядерно- цитоплазматическое отношение	Высокое	Высокое	Низкое

29.1.1. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)

Человеческие ЭСК получают из бластоцисты на сроке около одной недели после оплодотворения. Источником служат неиспользованные бластоцисты из репродуктивных клиник. Проводятся работы и с ЭСК различных видов животных. В этом случае срок получения бластоцист зависит от временных рамок эмбрионального развития конкретного вида. Бластоциста разрушается механически и/или с помощью растворов ферментов, далее полученная внутренняя клеточная масса ресуспендируется и переносится в питательную среду. ЭСК имеют практически неограниченный пролиферативный потенциал, их можно растить в культуре более 200 пассажей в недифференцированном состоянии, что может соответствовать нескольким годам культивирования (Рис.29.1).

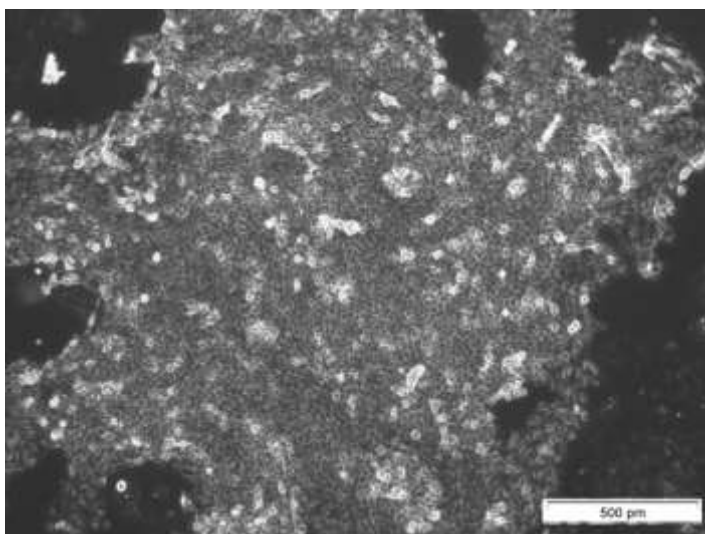


Рис. 29.1. Эмбриональные стволовые клетки мармозетки обыкновенной *Callithrix jacchus*. На фото представлена одна крупная колония на подложке из матригеля. Культура на 112 пассаже спустя 2 суток после размораживания. По мере пассажирования данная линия клеток подвергалась неоднократным циклам замораживания, низкотемпературного хранения и оттаивания без потери исходных характеристик.

По потентности или способности к дифференцировке ЭСК являются плюрипотентными. Они могут быть дифференцированы в клеточные типы эктодермального, мезодермального и энтодермального эмбриональных листков. Плюрипотентность ЭСК обусловлена высокими уровнями экспрессии так называемых генов плюрипотентности. К ним относятся следующие гены: Oct4, Sox2, Nanog, Lin28, Klf4, Sall4, Essrb, c-Мyc и некоторые другие. В поддержание плюрипотентного состояния клеток вовлечено более полутора тысяч генов, также очень важную роль играет эпигенетический статус клетки, т.е. метилирование цитозиновых оснований ДНК ферментами ДНК-метилтрансферазами, модификация гистонов (фосфорилирование, убиквитинирование, ацетилирование) и изменение состояния хроматина (активный или неактивный статус) путем его

ремоделирования, а именно - изменением расположения и плотности нуклеосом на нити ДНК.

29.1.2. Индуцированные плюрипотентные клетки (ИПК)

ИПК – искусственно созданный тип клеток, которые сходны по своим характеристикам с ЭСК (Рис.29.2). Их можно получить с помощью различных методов генной инженерии практически из любой ядродержащей клетки путем введения в нее нескольких генов, кодирующих транскрипционные факторы, ответственные за плюрипотентное состояние. Классическим примером этих факторов являются Oct4, Klf4, Sox2, с-Мус (OKSM касета). Именно применение этой комбинации транскрипционных факторов позволило впервые получить индуцированные плюрипотентные клетки из взрослых дифференцированных клеток. Транскрипционные факторы – это белки или белковый комплекс, непосредственно не участвующие в каталитическом акте образования РНК, но необходимые для прохождения основных этапов транскрипции и ее регуляции.

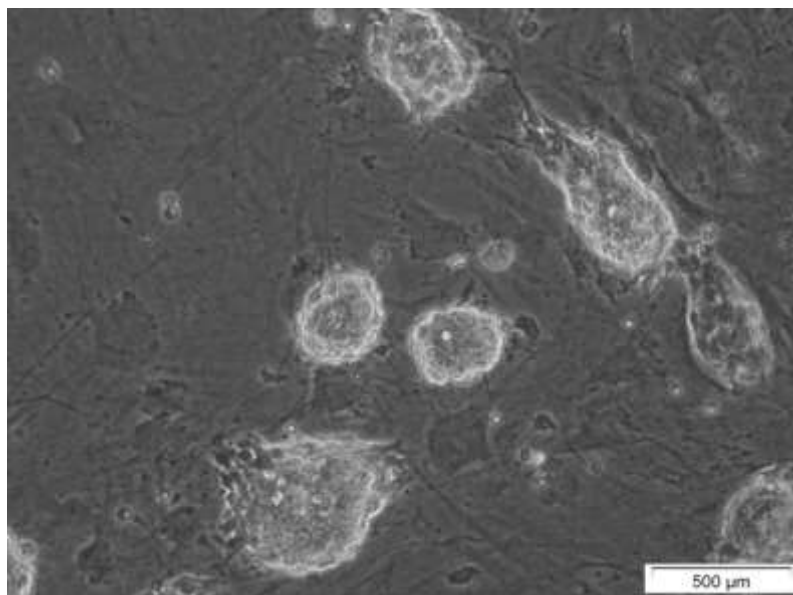


Рис.29.2. Индуцированные стволовые клетки мармозетки обыкновенной *Callithrix jacchus*. На фото хорошо видны несколько отдельных колоний ИПК, которые растут на фидерном слое мышечных эмбриональных фибробластов. Колонии имеют более конденсированную структуру по сравнению с ЭСК (Рис.29.1). Это обусловлено использованием различных подложек для культивации. Данная линия ИПК была получена путем трансдукции МСК из амниотической оболочки с помощью лентивируса, несущего конструкцию OKSM. Культура на 70 пассаже спустя 2 суток после размораживания. Морфология, скорость роста и экспрессия генов плюрипотентности остается неизменной после процесса криоконсервирования.

Для перепрограммирования клеток необходимо использовать так называемые векторы (средства переноса генетического материала, в данном случае, транскрипционных факторов ОКSM). К наиболее часто используемым векторам относятся ретровирусы, лентивирусы и аденовирусы. Среди них наибольшей эффективностью обладают лентивирусы, так как они способны поражать как делящиеся, так и не делящиеся клетки, что значительно повышает эффективность вирусной трансдукции. Помимо вирусов в качестве векторов также могут быть использованы плазмиды, эписомы, транспозоны, белки, РНК.

Огромную роль в индукции плюрипотентности и в ее поддержании играют низкомолекулярные соединения, так называемые «малые молекулы» (small molecules). Известно, что эффективность перепрограммирования в среднем составляет от 0,001 до 2% максимум. Малые молекулы способствуют повышению эффективности процесса перепрограммирования. В качестве примера можно привести VPA (вальпроевая кислота), CHIR-99021, SB431542, PD0325901, форксолин, тиазовивин и многие другие. Воздействуя на разные звенья молекулярных каскадов в клетке, эти молекулы влияют на организацию хроматина, структуру гистонов и включение/инактивацию метаболических путей.

Во время процесса перепрограммирования происходят изменения на всех уровнях организации и жизнедеятельности клетки. Происходит изменение в морфологии (уменьшение размеров клетки, увеличение ядерно-цитоплазматического отношения) и физиологии клеток (например, скорости деления, что обусловлено в первую очередь, изменением экспрессии генов). Также происходят радикальные эпигенетические перестройки.

29.1.3. Взрослые стволовые клетки

Это незрелые, способные к дифференцировке клетки, которые присутствуют во всех тканях организма. Они выполняют функции замещения высокодифференцированных клеток в тканях по мере их старения и отмирания или восстановительную функцию при повреждениях. Важнейшими популяциями стволовых клеток взрослого организма являются *мезенхимальные стволовые клетки (МСК)*, *гематopoэтические стволовые клетки (ГСК)* и *тканеспецифические стволовые клетки (ТСК)*.

МСК являются мультипотентными стволовыми клетками, они присутствуют практически во всех тканях организма (Рис. 29.3). МСК осуществляют регуляцию самоподдержания и дифференцировки тканеспецифических прогениторных клеток, участвуют в репаративных процессах в тканях, регулируя рост нервов и кровеносных сосудов, выполняют нейрогуморальную регуляцию путем секреции различных цитокинов и факторов роста, а также непосредственно взаимодействуя с иммунными клетками. МСК не имеют специфических маркеров, характерных только для этого типа клеток, но их можно фенотипировать и идентифицировать по совокупности следующих параметров: 1) экспрессия

поверхностных белковых маркеров CD29, CD73, CD90, CD105, CD106; 2) отсутствие экспрессии CD34, CD45, CD14, CD11b, MHC-DR; 3) способность к дифференцировке в остециты, хондроциты и адипоциты *in vitro*; 4) способность прикрепляться и расти на культуральном пластике в виде монослоя 5) фибробластоподобная морфология.

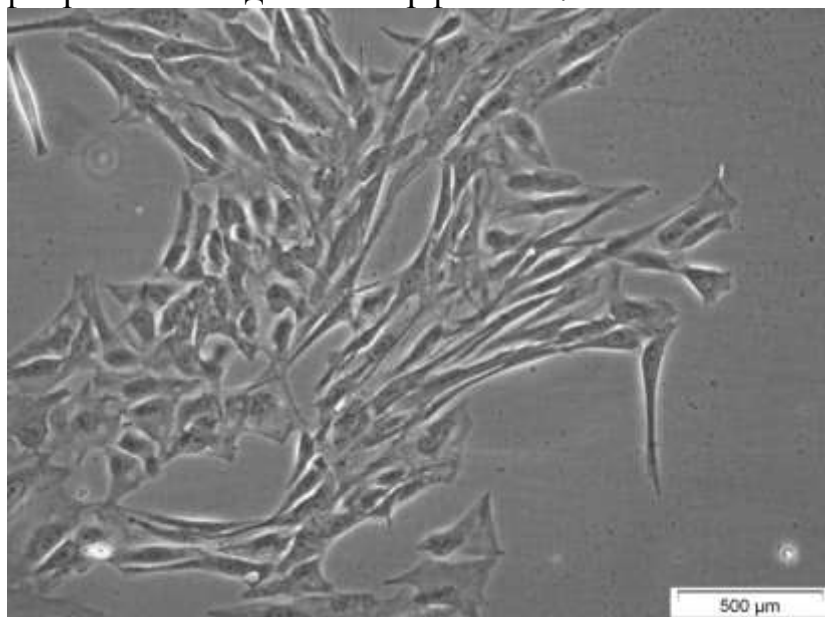


Рис. 29.3. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), выделенные из амниотической оболочки плаценты мармозетки обыкновенной *Callithrix jacchus*. Культура клеток на 7 пассаже. Морфология клеток спустя 24 часа после замораживания-оттаивания остается без изменений.

ГСК являются мультипотентными стволовыми клетками, дают начало как миелоидного, так и лимфоидного ростков. Основными источниками получения ГСК являются костный мозг, пуповинная кровь, периферическая кровь после мобилизации колониестимулирующими факторами. Именно ГСК исторически получили наиболее широкое использование в медицине. Фундаментальные исследования и успешное применение с середины XX века привели к значительному усовершенствованию методов выделения, культивирования и хранения этого типа клеток (см. главу 30).

Также на протяжении всей жизни организма практически во всех тканях содержится пул *тканеспецифических стволовых клеток* (ТСК), необходимый для регенерации, поддержания и возобновления клеточного состава тканей и органов. Кроме того, тканеспецифичные стволовые клетки необходимы для восстановления тканей взрослого организма после различных повреждений. В тканях ТСК располагаются в так называемых нишах – специальном микроокружении, которое состоит из клеток и внеклеточного матрикса.

Взрослые стволовые клетки можно поделить на группы в зависимости от этапа онтогенеза организма, на котором они были получены. Так называемые *фетальные стволовые клетки* получают из абортивного материала на сроке от 4 до 12 недель беременности. На данном этапе клетки

зародыша уже начали дифференцировку и не имеют плюрипотентного потенциала, сопоставимого с потенциалом недифференцированных эмбриональных стволовых клеток. Как отдельную группу стволовых клеток можно выделить *постнатальные стволовые клетки*, которые возможно получить сразу после рождения индивидуума. Их источниками служат экстраэмбриональные ткани – плацента, амниотическая и хориальная оболочки, пуповинный канат и пуповинная кровь.

29.2. Криоконсервирование мезенхимальных клеток

Методики криоконсервации мезенхимальных стволовых клеток являются неотъемлемой составляющей целого ряда исследований и развития перспективных направлений регенеративной медицины. Применение субнулевых температур позволяет успешно осуществлять временное и долгосрочное хранение таких клеток, а также производить транспортировку без потерь их уникальных свойств и качества. Подобные мероприятия имеют ключевое значение в работе банков биологических объектов, создают условия и возможности для накопления необходимого количества биологического материала, предоставляют требуемое количество времени для проведения всестороннего анализа и исследований, позволяют осуществлять доставку этого материала в лаборатории и медицинские учреждения. Создаются и уже существуют целые системы аутобанков, где мезенхимальные стволовые клетки, взятые, например, из плацентарного материала пациента при рождении и выделенные в лабораторных условиях, могут храниться десятилетиями до наступления необходимости применения с использованием высокоэффективных методов клеточной терапии. При этом пациенту не обязательно находится в пределах расположения самого биобанка. Клеточный материал может быть доставлен в замороженном состоянии в любую клинику, где имеются условия и специалисты для их применения, вне зависимости от местоположения. Создание обширных коллекций криоконсервированных стволовых клеток, современные методы диагностики и иммуномодуляции наряду с низкой иммуногенностью, характерной для целого ряда мезенхимальных стволовых клеток (например, плацентарного происхождения), также позволяют применять аутологичный материал в качестве донорского.

Исследования в области криобиологии клетки привели к разработке протоколов замораживания, позволяющих обеспечить сохранность мезенхимальных стволовых клеток после оттаивания на уровне 90% и выше. Такой уровень сохранности клеток подтверждается как результатами классического окрашивания трипановым синим, свидетельствующими, в первую очередь, о целостности клеточных мембран, так и более информативными методами с использованием проточной цитофлуориметрии и флуоресцентного витального окрашивания.

Для криоконсервации суспензии мезенхимальных стволовых клеток наиболее часто используется, считающаяся классической для этого типа

клеток на сегодняшний день, среда замораживания, включающая в себя 10%-ю объёмную концентрацию диметилсульфоксида (ДМСО) в стандартной среде культивирования. Наличие ДМСО в криозащитной среде в незамороженном состоянии является токсичным для клеток. В связи с этим ДМСО стараются добавлять непосредственно перед замораживанием. Цитотоксичность ДМСО также обуславливает необходимость его отмывки после оттаивания. Отмывка, как правило, проводится с помощью повторного центрифугирования в стандартной среде культивирования либо в натрий-фосфатном буфере. Ведутся работы по созданию криозащитных сред с пониженным содержанием ДМСО или с использованием альтернативных криопротекторов. Тем не менее, ДМСО в объёмной концентрации 10% является стандартом для криоконсервации мезенхимальных стволовых клеток на сегодняшний день, позволяющим получать стабильные результаты высокой сохранности при относительной простоте применения.

Как известно, помимо состава криозащитных сред, ключевое значение для выживаемости биологических объектов после криоконсервации играет скорость замораживания. Для мезенхимальных стволовых клеток оптимальным является замораживание со скоростью 1 град/мин. В лабораторных условиях такую скорость охлаждения можно получить с использованием программных замораживателей. Однако на практике наиболее часто применяют контейнеры с изопропиловым спиртом. Такие контейнеры являются более целесообразными по сравнению с программными замораживателями с экономической точки зрения, а также просты в использовании и обслуживании. Как правило, подготовленная суспензия клеток в криопробирках объемом 1-2 мл помещается в такой контейнер, и далее контейнер с образцами переносится в стандартный механический рефрижератор с конечной температурой минус 80°C. В этих условиях теплопроводность контейнера и криопробирок позволяет охлаждать образцы со скоростью, приблизительно равной 1град/мин. После заморозки с использованием изопропилового контейнера образцы, в большинстве случаев, перемещают в азотное хранилище, обеспечивающее необходимые температурные условия для долгосрочного хранения (рис. 29.4).

В температурных режимах цепочки криоконсервации, помимо скорости замораживания, для сохранности клеток важно соблюдать оптимальные параметры при оттаивании образцов. Лучшие результаты выживаемости мезенхимальных стволовых клеток после криоконсервации получают при использовании быстрых скоростей оттаивания. Как правило, образцы оттаивают на водяной бане при температуре 37-42°C.



Рис. 29.4. Замораживание стволовых клеток. *Перемещение образцов, замороженных со скоростью 1 град/мин, из изопропилового контейнера в хранилище с жидким азотом.*

Таким образом, стандартный протокол криоконсервации мезенхимальных стволовых клеток включает в себя следующие основные параметры: криозащитная среда, включающая в себя 10% ДМСО (по объему); скорость замораживания 1 град/мин; быстрое оттаивание. Данный протокол получил широкое применение в лабораториях и клиниках по всему миру, что обусловлено его высокой эффективностью, а также относительной экономичностью и простотой исполнения. Иногда используют такие вариации этого протокола, как добавление дополнительного количества фетальной бычьей сыворотки (ФБС) в количестве 10% по объему к среде замораживания с ДМСО, либо вообще проводят заморозку в ФБС с ДМСО без среды культивирования, но при этом количество ДМСО остается неизменным во всех случаях и составляет 10% по объему.

29.3. Криоконсервирование перепрограммированных и эмбриональных стволовых клеток

Применение низкотемпературного хранения клеток является неизбежным практически в каждой научно-исследовательской медико-биологической лаборатории. Криоконсервация позволяет остановить культивирование клеток в любой момент с дальнейшей возможностью неограниченно долгого хранения замороженных образцов в условиях низкотемпературного банка. При этом культура клеток может быть восстановлена после криоконсервации без потери и/или изменения исходных свойств.

Эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные клетки имеют довольно характерную морфологию – это относительно небольшие клетки размером около 10 мкм, с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, растут они в виде колоний, где клетки

плотно связаны между собой. ЭСК и ИПК весьма чувствительны к традиционным методам криоконсервации и оттаивания, что в значительной степени вызвано нарушением их сложной организации – дезагрегацией колоний. Помимо этого, проникновение криопротекторов в клетки может быть неравномерным в разных участках колоний, что тоже сказывается на количестве выживших клеток после оттаивания. Интенсивное ресуспендирование крупных колоний с целью получения отдельных клеток в суспензии перед процедурой криоконсервирования также, зачастую, снижает количество жизнеспособных клеток. В связи с этим исследователю приходится выбирать между замораживанием крупных колоний, в которые проникновение криопротектора может быть неравномерным, или криоконсервированием суспензии единичных клеток, в которые хорошо проникает криопротектор, но количество выживших клеток резко снижается из-за предварительной дезагрегации колоний. Тем не менее, обладая высоким пролиферативным потенциалом, эти клетки достаточно быстро восстанавливают популяцию в культуре.

Для криоконсервирования ЭСК и ИПК может применяться витрификация и медленное замораживание. Витрификация позволяет консервировать крупные колонии ЭСК и ИПК, не нарушая их структуру и межклеточные контакты. Стандартные среды, используемые для витрификации ЭСК и ИПК, содержат 20% ДМСО, 20% этиленгликоль, сахарозу, человеческий сывороточный альбумин или фетальную бычью сыворотку. Криоконсервирование ЭСК и ИПК с помощью витрификации достаточно эффективно, но оно не получило широкого практического распространения в связи с повышенной сложностью процесса и ограничениями при заморозке большого количества образцов одновременно.

На практике медленное замораживание является основным методом заморозки ЭСК и ИПК на сегодняшний день. Состав криозащитных сред включает в себя 5-10% ДМСО, 10-90% фетальную бычью сыворотку или человеческий сывороточный альбумин. Заморозка производится с помощью программного замораживателя или в изопропиловом контейнере со скоростью 1 град/мин, по аналогии с протоколами заморозки МСК. Для оттаивания образцов ЭСК и ИПК характерно использование быстрых скоростей отогрева с применением водяной бани при температуре 37-42°C.

29.4. Применение стволовых клеток

Стволовые клетки всех типов несут в себе огромный потенциал для развития широкого спектра направлений фундаментальной биологии, а также для применения в перспективных областях регенеративной медицины и биоинженерии. Это обусловлено, прежде всего, их выраженной способностью как к симметричному, так и к ассиметрическому делению, т.е. возможностью при делении давать начало как идентичным себе клеткам, так и дифференцироваться в специфические клетки соматических тканей.

Культуры стволовых клеток используют для исследования таких фундаментальных вопросов биологии, как выяснение механизмов пролиферации и дифференцировки, взаимодействия клеток друг с другом и со средой, адаптация, старение, подвижность, злокачественные трансформации и многих других. Стволовые клетки используют в биотехнологическом производстве вакцин и биологически активных веществ. Культуры клеток применяются для диагностики и лечения наследственных заболеваний, на них тестируются фармакологические препараты. В области тканевой биоинженерии проводятся работы по созданию искусственных скаффолдов в сочетании со стволовыми клетками. Перспективные направления клеточной терапии и регенеративной медицины подразумевают выделение, культивирование и использование в терапевтических целях аутологичных или донорских стволовых клеток и их производных.

Конкретная область применения, прежде всего, зависит от того, к какому типу относятся стволовые клетки: к эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК), индуцированным плюрипотентным клеткам (ИПК) или взрослым стволовым клеткам. Различие в областях применения стволовых клеток обусловлено наличием ограничений и преимуществ каждого типа. Главным образом это связано с отличиями в уровне дифференцировочного потенциала, доступностью исходного биоматериала, способами и сложностью выделения, культивирования и хранения. Одними из немаловажных факторов, ограничивающих применение некоторых типов стволовых клеток, являются потенциальные проблемы биобезопасности и этические вопросы.

Рассмотрим существующие и перспективные области применения, а также преимущества, недостатки и ограничения для каждого типа стволовых клеток.

29.4.1. Эмбриональные стволовые клетки

Эмбриональные стволовые клетки обладают наибольшим дифференцировочным потенциалом и способны давать начало практически любыми типам клеток всех трех зародышевых листов (энтодерма, мезодерма и эктодерма), как во время эмбрионального развития организма, так и в условиях *in vitro*. В связи с этим потенциал их применения в терапевтических направлениях регенеративной медицины колоссален. Тем не менее, этические вопросы, связанные с получением этого типа клеток из человеческих эмбрионов, представляют собой существенную преграду к реализации такого потенциала. Законодательная база большинства стран, обладающих технологиями по работе с таким материалом, запрещает работу, связанную с разработкой и применением терапевтических подходов с использованием ЭСК. Однако научно-исследовательские работы с зарегистрированными и сертифицированными линиями ЭСК допускаются и продолжаются. Благодаря этому ЭСК представляют большой интерес для

фундаментальных исследований в области биологии развития. Также этот тип клеток используется для изучения эмбриотоксичности различных веществ, для моделирования на клеточном уровне широкого ряда заболеваний, для разработки новых фармакологических препаратов.

29.4.2. Индуцированные плюрипотентные клетки

Исследования Шинья Яманаки и Джона Гердона позволили искусственно создать тип клеток, максимально приближенный по свойствам к эмбриональным стволовым клеткам. Это новаторское открытие изменило представление о клеточном развитии и клеточной специализации, сыграв огромное значение в современной клеточной биологии, что было отмечено Нобелевской премией в 2012 году. ИПК имеют много общего с ЭСК с точки зрения их морфологии, экспрессии различных маркеров плюрипотентности, способности к дифференцировке в ткани трех эмбриональных листков. ИПК обладают сопоставимой способностью к дифференцировке, в связи с чем представляют собой перспективную альтернативу ЭСК в области биомедицинских исследований. Более того, концепция получения ИПК позволяет обходить стороной этические вопросы, а также создавать пациентоспецифический материал, что, в свою очередь, позволит в перспективе преодолевать иммунологические осложнения при клеточной терапии, зачастую возникающие при трансплантации аллогенного материала. На сегодняшний день ИПК получили практическое применение в таких областях, как фундаментальные исследования стволовых клеток, моделирование заболеваний, регенеративная медицина, скрининг фармакологических препаратов, проверки токсичности различных веществ. ИПК также перспективны для ряда биологических направлений, таких как создание трансгенных животных, повышение эффективности клонирования и т. д. Большие надежды возлагаются на широкомасштабное использование ИПК в клеточной терапии и тканевой биоинженерии. Тем не менее, в настоящий момент клиническое применение ИПК на практике пока остается под вопросом. Это связано, прежде всего, со склонностью ИПК к формированию опухолей, а также с методами получения этого типа клеток, заключающимися в генетической модификации и интеграции генов, так или иначе ассоциированных с новообразованиями. В связи с последним аспектом ведутся работы по репрограммированию без генетических модификаций, однако на сегодняшний день эффективность данных подходов все еще находится на низком уровне.

29.4.3. Взрослые стволовые клетки.

В отличие от ИПК, обладающих огромным терапевтическим потенциалом, но требующих преодоления ряда недостатков для клинического использования, а так же от ЭСК, ограниченных этическими и законодательными рамками, взрослые стволовые клетки применяются в

медицине относительно давно и весьма успешно. Миллионы пациентов во всем мире воспользовались процедурой трансплантации костного мозга при лечении лейкозов, анемий или иммунодефицитов. Стволовые клетки кожи используются для лечения серьезных ожогов, в то время как лимбальные стволовые клетки способствуют регенерации поврежденной роговицы. Также успешно применяют трансплантацию клеток кордовой крови. Более того, отдельного внимания заслуживают исследования, показывающие наличие плюрипотентных свойств у некоторых линий мезенхимальных стволовых клеток, выделенных, например, из фетоплацентарного комплекса. Существуют и создаются биологические низкотемпературные банки стволовых клеток, в которых хранится материал пациентов, готовый к клиническому применению в любой момент в течение десятилетий. Таким образом, в настоящее время использование взрослых стволовых клеток является наиболее приоритетной стратегией клинической медицины.

29.5. Заключение

Современные методы молекулярной и клеточной биологии привели к интенсивному развитию научно-исследовательских направлений, связанных с изучением фундаментальных свойств и клинического потенциала стволовых клеток. На сегодняшний день наиболее широкое практическое применение в медицине получили взрослые стволовые клетки, в частности МСК и ГСК, что обусловлено их относительной доступностью и простотой получения, достаточной биобезопасностью, отсутствием или незначительностью этических ограничений и большим количеством исследовательских работ. В то время как ЭСК могли бы иметь наибольшие перспективы в клиническом применении среди всех основных типов стволовых клеток, связанные с их высокой пластичностью и пролиферативным потенциалом, их применение ограничено этическими и законодательными нормами и сводится, в настоящий момент, к узкому ряду фундаментальных исследований. Создание технологий получения ИПК позволило приблизиться к ЭСК по основным показателям и, в то же время, избавило от ограничений, связанных с эмбриональным происхождением последних. Однако ИПК-технологии нуждаются в дальнейшей оптимизации и глубоком изучении.

Независимо от типа стволовых клеток, применение технологий криоконсервирования является неотъемлемой частью как в исследовательской деятельности, так и при применении в клинике и в тканевой инженерии. Использование субнулевых температур позволяет накапливать необходимый материал, создавать биобанки, дает возможность и время провести тестирование материала перед использованием, обеспечить транспортировку и доставку. При этом применение эффективных протоколов криоконсервирования позволяет восстанавливать жизнеспособность стволовых клеток на высоком уровне и без потери ключевых свойств, а также

обеспечивает условия для сохранения этих параметров практически неограниченное время. В последние годы большой интерес проявляется к влиянию криоконсервирования на эпигенетические изменения в клетках после отогрева. Несмотря на то, что показано некоторое влияние замораживания на паттерн метилирования ДНК и модификацию гистонов, тот факт, что из замороженной зиготы можно получить полноценный здоровый и способный к размножению многоклеточный организм, указывает на то, что такие эпигенетические изменения носят незначительный характер, либо являются адаптивными и/или обратимыми.

Рекомендуемая литература:

1. Жегунов Г.Ф., Д.В. Леонтьев, Е.В. Щербак, Е.Г. Погожих Биология клетки. Физико-химические, структурно-функциональные и информационные основы. Издательство «ЛЕНАНД», 2018. – 544с.
2. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. ББЗ Том 1 / Под ред. М. А. Пальцева.— М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2009.— 272с.
3. Петренко АЮ, Хунов ЮА Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения: монография – Луганск: ООО «Пресс-Экспресс» , 2011. – 368с.
4. Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells.Methods and Protocols. Edited by K Turksen Humana Press, 2016. – 496p.
5. Embryonic stem cells – differentiation and pluripotent alternatives. Edited by M.S. Kallos, INTECH, 2011. – 506p.
6. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and Placental Derivatives in Regenerative Therapies: Experimental Studies, History, and Prospects. Stem Cells Int. 2018; 2018:4837930.

Глава 30. Криоконсервирование костного мозга

30.1. Характеристика ткани. 30.2. Технологический процесс криоконсервирования костного мозга. 30.3. Основные методы криоконсервирования. 30.3.1. Методы криоконсервирования костного мозга на основе проникающих криопротекторов. 30.3.2. Методы криоконсервирования ККМ на основе непроникающих криопротекторов.

30.1. Характеристика ткани

Костный мозг человека – основной орган кроветворной системы, место гемопоэза – производства новых клеток крови. В связи с этим костный мозг также является одним из ключевых органов иммунной системы.

Красный, или кроветворный, костный мозг снабжен разветвленной сетью капилляров и состоит из плотно упакованных гемопоэтических и лимфоидных кроветворных клеток, жировой ткани костного мозга и поддерживающих стромальных клеток. У взрослого человека костный мозг находится в костях рёбер, позвонках, грудины, костях таза, черепа, а также внутри губчатого вещества эпифизов трубчатых костей. Состав костного мозга динамичен в течение жизни, так как соотношение клеточных и неклеточных компонентов (соединительной ткани) изменяется как с возрастом, так и в ответ на системные факторы.

Костный мозг служит основным источником стволовых кроветворных элементов как для миелоидного, так и для лимфоидного ростков (Рис. 30.1). Развитие клеточных элементов костного мозга начинается от мультипотентной гемопоэтической стволовой клетки (ГСК). Миелоидный росток способен к дифференцировке в моноциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакариоциты и тромбоциты. Лимфоидный росток способен образовывать В-клетки, предшественники Т-клеток и естественные клетки-киллеры (NK-клетки). При этом обе линии – и миелоидная, и лимфоидная участвуют в формировании дендритных клеток.

Нарушения дифференцировки или уменьшение количества стволовых клеток костного мозга приводят к иммунодефицитам и различным патологиям.

Трансплантация (трансфузия) костного мозга применяется для коррекции функций кроветворной и иммунной системы. Такая процедура способствует восстановлению эритропоэза, тромбоцитопоэза и миелопоэза у больных с апластической анемией и гуморального иммунитета у больных с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью. При остром лейкозе и других злокачественных новообразованиях трансфузию костного мозга применяют с целью восстановления кроветворения после комбинированной терапии цитостатиками и тотальным облучением, при которой наряду с опухолевыми гибнут и нормальные гемопоэтические клетки.

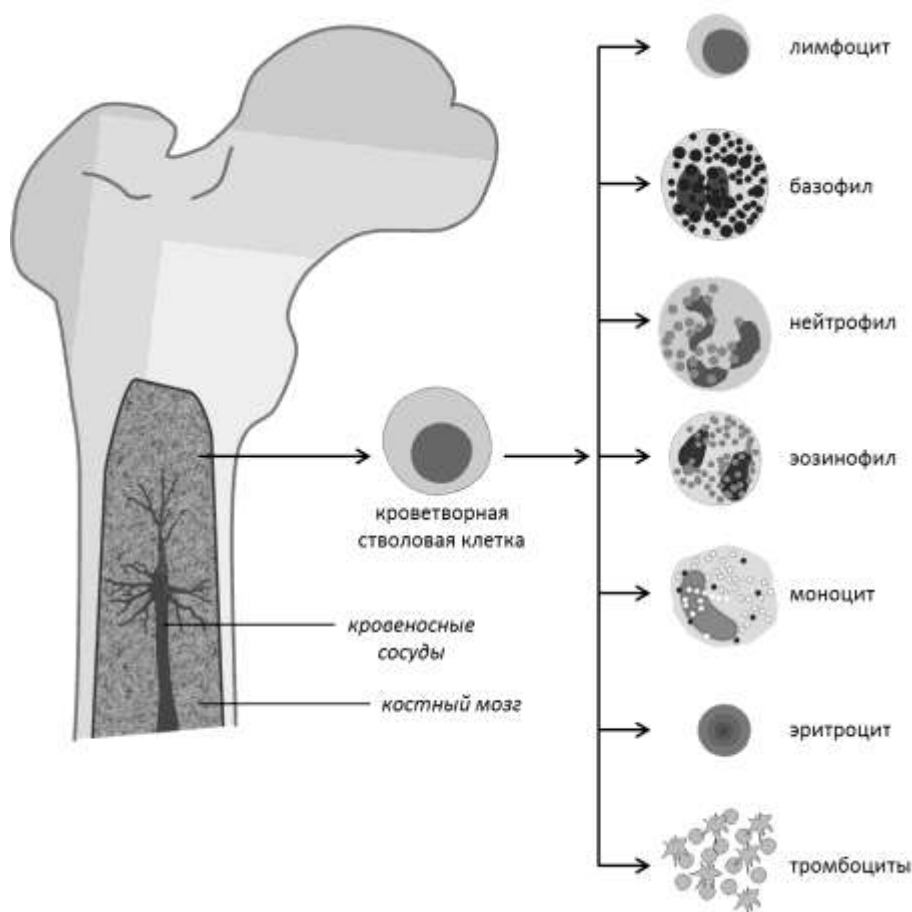


Рис. 30.1. Костный мозг – центр кроветворения у человека. На рисунке изображен эпифиз трубчатой бедренной кости, где локализуется красный костный мозг. Обозначены разновидности образующихся клеток.

Трансплантация костного мозга представляет собой многоэтапную процедуру, которая включает сбор ГСК, предназначенных для трансплантации, кондиционирование пациента (разрушение собственного костного мозга) с последующей инфузией здоровых ГСК, что в конечном итоге должно привести к развитию обновленной гемопоэтической и иммунной системы.

Можно выделить две основные формы трансплантации ГСК костного мозга: аутологичную и аллогенную. При трансплантации аутологичных ГСК материал выделяют у самого реципиента и реинфузируют при необходимости через некоторое время. При аллогенной трансплантации ГСК берут от другого человека-донора, который может как состоять, так и не состоять в родственных связях с реципиентом. Аутологичная трансплантация ГСК приводит к продолжительной ремиссии либо полностью излечивает целый ряд заболеваний, при этом имея низкий уровень летальности, связанной с трансплантатом. Аллогенная трансплантация ГСК приводит к успешной коррекции многих, иначе не излечимых состояний, однако риски осложнений и смертности существенно выше из-за возможной иммунной реакции. В связи с этим HLA-типирование (подбор пары донор-реципиент по совпадению аллелей главного комплекса гистосовместимости), является

важным шагом для определения оптимального донора, подходящего для сбора стволовых клеток. Теоретически, совместимые родственные доноры являются лучшими кандидатами, за ними следуют совместимые неродственные доноры. Типирование HLA проводится либо способом со средним уровнем точности, где выявляется ограниченное количество совпавших аллелей между сывороткой донора и реципиента, либо способом с повышенным уровнем точности с определением конкретных полиморфных аллелей с применением методов ПЦР и секвенирования следующего поколения. В случае способа повышенной точности, результаты типирования HLA представлены в виде оценки, коррелирующей с соответствием двух аллелей для конкретного типа HLA. Разные клинические центры и учреждения применяют отличающиеся подходы, используя различное количество подтипов HLA для определения совместимости доноров, однако, согласно последним исследованиям, соответствие по HLA-A, B, C и DRB1, выявленное способом высокой точности, на уровне высокого разрешения, значительно повышает уровень выживаемости и благоприятный прогноз терапии.

В любом случае, в связи с высокой потребностью в костном мозге как при аутологичной, так и при аллогенной трансплантации, актуально создание банков криоконсервированного костного мозга. Несмотря на то, что во многих центрах аллогенной трансплантации используются свежие гемопоэтические стволовые клетки, где сбор клеток донора и кондиционирование пациента происходят одновременно, применение технологий замораживания и низкотемпературного хранения ГСК является неотъемлемой значимой частью данного вида терапии. Криоконсервирование костного мозга облегчает решение проблем иммунологического подбора пар донор – реципиент, позволяет создавать запасы и транспортировать клеточный материал при экстренных ситуациях.

30.2. Технологический процесс криоконсервирования костного мозга

Технологический процесс криоконсервирования костного мозга включает в себя следующие этапы:

1. Заготовка. Заготовка костного мозга у доноров и скоропостижно скончавшихся лиц осуществляется в специальных операционных с соблюдением правил асептики. Операции забора костного мозга у доноров проводятся под общим наркозом или с применением местной анестезии. Костный мозг получают из грудины или подвздошной кости с помощью специальных игл путем аспирации. Для получения дозы 150-220 мл, по данным разных авторов, требуется провести от 8-13 до 28 пункций. Безопасность операций обеспечивается специальной конструкцией игл, исключающей пробой кости насквозь и травмирование внутренних органов. Заготовка полноценного костного мозга требует применения

антикоагулянтов. Современные методики также позволяют получать периферические кроветворные стволовые клетки малоинвазивным, не требующим анестезии, безоперационным способом с помощью афереза. Поскольку в норме содержание периферических стволовых клеток в циркулирующей крови невелико, за несколько дней до афереза подкожно вводится препарат GCSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), являющийся фактором роста, стимулирующим выход большего количества стволовых клеток крови из костного мозга в кровоток. Через несколько дней, когда в крови накапливается достаточное количество стволовых клеток, кровь берется из вены на одной руке и поступает в специальную центрифугу, в которой стволовые клетки отделяются от крови. Затем кровь возвращается в организм через вену в другой руке. Процедура удаления стволовых клеток крови обычно проводится в амбулаторных условиях и занимает около двух-трех часов.

2. *Добавление криозащитной среды.* К клеткам костного мозга криоконсервант добавляется постепенно при постоянном перемешивании. В качестве криопротекторов при криоконсервировании костного мозга наиболее часто применяются ДМСО, глицерин, ПЭО-400. Комбинированные криозащитные среды могут содержать различные добавки, например: ПВП, сыворотку, альбумин. Препарат, подготовленный для замораживания, представляет собой концентрированную суспензию клеток.

3. *Криоконсервирование.* Замораживание костного мозга осуществляется в контейнерах с соблюдением специально разработанных регламентов охлаждения в устройствах программного замораживания. Режимы охлаждения включают в себя, как правило, 2-3 этапа. Скорость охлаждения на первом этапе 1—2 град/мин. Температура, до которой проводится охлаждение на первом этапе, зависит от вида применяемого криопротектора. В присутствии ПЭО-400 медленное охлаждение заканчивается при минус 15°C, а в присутствии ДМСО – при минус 40°C. В некоторых случаях вместо медленного программного замораживания применяют быстрое двухступенчатое охлаждение, не требующее применения сложного дорогостоящего оборудования.

4. *Отогрев.* Размораживание костного мозга осуществляется на электрической водяной бане при температуре 39-40°C при равномерном покачивании до полного исчезновения кристаллов льда.

5. *Отмывка криопротектора.* Этапы отмывания костного мозга от криопротектора включают в себя поэтапное разбавление и последующее центрифугирование суспензии для максимально полного удаления криопротекторов.

5. Трансфузия суспензии костного мозга проводится внутривенно в амбулаторных условиях.

30.3. Основные методы криоконсервирования

В клинической практике костный мозг широко используют при комплексном лечении заболеваний, сопровождающихся нарушением кроветворения.

Низкотемпературное консервирование костного мозга является необходимым этапом для создания полноценных запасов этого материала.

Для низкотемпературного хранения клеток костного мозга (ККМ) разработаны методы криоконсервирования:

- при низких температурах (минус 70°C) с последующим хранением в электрических рефрижераторах. Срок хранения ККМ в этих условиях ограничен несколькими месяцами;
- при ультранизких температурах (минус 196°C) с использованием жидкого азота. Данный метод позволяет хранить замороженный материал практически неограниченно долго.

Для эффективного криоконсервирования ККМ большое значение имеет не только состав криозащитной среды, но и режим охлаждения. Поэтому для криоконсервирования костного мозга используют контролируемое охлаждение, которое ведут по двух- или трехэтапной программе в программном замораживателе.

Для криоконсервирования и долгосрочного хранения ККМ используют одноразовые стерильные пластикатные криоконтейнеры типа “Nemofreeze”, “Origen” и др.

Хранение клеток костного мозга, замороженных при температуре минус 196°C осуществляют в жидкоазотных криохранилищах, а клетки, замороженные при температуре минус 70°C, хранят в электрических рефрижераторах.

30.3.1. Методы криоконсервирования костного мозга на основе проникающих криопротекторов

Технологический процесс криоконсервирования костного мозга на основе проникающих криопротекторов включает подготовку к замораживанию, куда относится регистрация, заготовка костного мозга, фракционирование костного мозга, распределение по криоконтейнерам, добавление криозащитной среды, замораживание и последующее долгосрочное хранение, размораживание, отмывание.

Методы криоконсервирования костного мозга с глицерином

Первые разработки по использованию криозащитных сред для суспензии ККМ с применением глицерина проводились еще в 50-е годы XX века. Впоследствии был разработан метод криоконсервирования ККМ с использованием 15% раствора глицерина. Охлаждение ККМ производится в два этапа. Сначала клетки помещают в рефрижератор с температурой минус 20°C и охлаждают до минус 9°C (до полной кристаллизации раствора), а

затем переносят в рефрижератор с температурой минус 70°C. При данных условиях срок хранения ККМ ограничен 2 месяцами.

Также существует метод долгосрочного хранения ККМ под защитой глицерина при температуре минус 196°C.

Для криоконсервирования клеток в присутствии 15% глицерина их замораживают в программном замораживателе с применением двухэтапного режима: на первом этапе до минус 13°C со скоростью 1 град/мин и на втором этапе – до минус 196°C со скоростью 10 град/мин.

Общим недостатком этих методов является необходимость отмывания клеточной взвеси от криопротектора, что приводит к частичной потере клеток. Лучшими растворами для отмывания клеток от криопротекторов признаны глюкозо-сахарозные растворы, потому что они позволяют получить высокий процент жизнеспособных клеток после отмывания.

Методы криоконсервирования костного мозга с ДМСО

На сегодняшний день криоконсервирование суспензии ККМ в средах на основе 10% ДМСО является наиболее распространенным стандартным методом в клинической практике. Замораживают клетки с ДМСО по двухэтапной программе (на первом этапе со скоростью 1 град/мин до минус 80°C, на втором - перенос в жидкоазотное хранилище). Для того чтобы сохранить высокий уровень жизнеспособности (порядка 80% - 90%), необходимо быстро проводить процедуру отогрева и отмывания криопротектора перед трансфузией пациенту. Необходимость этапа отмывки ДМСО из клеточной суспензии перед трансфузией обусловлена его цитотоксичностью, которая при данных концентрациях может вызывать различные побочные эффекты: энцефалопатию, рвоту, спазм сосудов и др. Тем не менее, некоторые клинические центры проводят трансфузию безотмывочным способом. В этом случае делается упор на сохранение максимального количества клеток, которое иначе может уменьшаться на этапах отмывки. Таким способом, как правило, переливают небольшое количество трансфузата, необходимость терапевтического эффекта которого превышает риски побочных эффектов криопротектора. В связи с этим также предпринимаются попытки по разработке протоколов с пониженной концентрацией ДМСО в криозащитных средах.

30.3.2. Методы криоконсервирования ККМ на основе непроникающих криопротекторов

Проблему отмывания проникающих криопротекторов из размороженных ККМ пытались решить, используя непроникающие криопротекторы ПЭО и ПВП различных молекулярных масс.

Как известно, непроникающие криопротекторы не требуют удаления из размороженной клеточной взвеси и, благодаря этому свойству, существенно упрощают технологический процесс низкотемпературного консервирования и дальнейшего применения.

Метод криоконсервирования ККМ на основе ПЭО-400

В ИПКиК был разработан эффективный метод криоконсервирования ККМ при ультранизких температурах с криопротектором полиэтиленоксидом (ПЭО-400).

Метод криоконсервирования заключается в замораживании суспензии клеток костного мозга под защитой ПЭО-400 в 15% концентрации по трехэтапной программе (на первом этапе со скоростью 1 град/мин до минус 12°C, на втором – со скоростью 30 град/мин до минус 140°C, а от минус 140°C до минус 196°C – путем погружения в жидкий азот). Затем клетки переносят в жидкоазотное хранилище.

Метод позволяет сохранить после замораживания-отогрева не менее 60% жизнеспособных клеток и не требует отмывания от криопротектора.

Заключение

Процесс трансплантации костного мозга (трансплантация ГСК) заключается во введении здоровых ГСК пациентам с дисфункциональным или истощенным костным мозгом. Данная процедура позволяет существенно улучшить функцию костного мозга пациента, что дает возможность организму как разрушать клетки злокачественных новообразований, так и генерировать функциональные клетки, которые могут заменить дисфункциональные в таких случаях, как синдромы иммунодефицита, гемоглобинопатии и ряда других патологий.

Трансплантация костного мозга позволяет успешно лечить патологии и клинические состояния, еще недавно считавшиеся неизлечимыми. На сегодняшний день это наиболее широко и эффективно используемый вид клеточной иммунотерапии. Миллионы пациентов в год по всему миру получают лечение с применением этого подхода.

Технологии криоконсервирования являются неотъемлемой составляющей комплекса мероприятий, связанных с заготовкой ГСК и клиническим применением трансплантации костного мозга. Такие технологии позволяют создавать надежную базу для дальнейшего развития этого перспективного направления регенеративной и заместительной терапии.

Криоконсервирование суспензии ККМ с применением ДМСО является наиболее распространенной на практике методикой на сегодняшний день. Тем не менее, актуальны исследования по разработке альтернативных протоколов с целью повышения выживаемости клеток и исключения необходимости отмывки криопротектора перед трансфузией.

Рекомендуемая литература:

1. Мезен, Н. И. Стволовые клетки : учеб.-метод. пособие / Н. И. Мезен, З. Б. Квачева, Л. М. Сычик. – 2-е изд., доп. – Минск : БГМУ, 2014. – 62 с.

2. Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций \ под ред. Шумакова В.И., Онищенко В.А.. – Москва: Лавр 2009. – 308с.
3. Balassa K, Danby R, Rocha V. Haematopoietic stem cell transplants: principles and indications. Br J Hosp Med. 2019;80(1):33-39.
4. Сведенцов Е.П. Получение и криоконсервирование костного мозга для клинического применения: Автореф: дисс. док. мед. наук. – Л., 1987. – 45 с.
5. Тюрин Р.В. Криоконсервирование костного мозга под защитой 3 % раствора диметилацетамида: Автореф. дис.... канд. мед. наук. – СПб., 1996. – 25 с.
6. Федотенков А.Г., Шишкина И.Д., Данилова Л.А., и др. Ограждающие растворы для криоконсервирования костного мозга // Гематология и трансфузиология. – 1992. – Т.37, № 7–8. – С. 13–15.
7. Pegg D.E. Storage of human bone marrow low temperatures and it`s clinical application// Int. Surg. – 1967. – Vol.48, №3. – P. 214–220.
8. Carnevale G, Pisciotta A, Riccio M et al. Optimized Cryopreservation and Banking of Human Bone-Marrow Fragments and Stem Cells // Biopreserv. Biobank. – 2016. – Vol. 14, № 2. – P. 138-48



Основы криобиологии и криомедицины



Криобиология – область биологии, изучающая действия низких температур и сопутствующих этому процессу факторов на биологические объекты. Она является фундаментальной основой многих биологических и медицинских технологий.

Криомедицина – область медицины, изучающая действие низких температур на человека и использующая их в лечебных целях.



Интерес к низким температурам в биологии и медицине связан с несколькими аспектами действия холода на объекты живой материи.

- Холод может выступать в роли экстремального, опасного для жизни фактора.
- Замораживание и гипотермия могут использоваться для криоконсервирования и длительного хранения биообъектов.
- Холодовое воздействие может использоваться как лечебный фактор.
- Низкие температуры могут обеспечивать обратимую остановку жизни.

