

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

КУЛЕШОВА Лариса Георгиевна

УДК 57.043:532.785:577.352.4:576.3/7

**МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО
ЛЬДООБРАЗОВАНИЯ И СВЯЗАННЫХ С НИМ ЯВЛЕНИЙ НА
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ**

03.00.19 – криобиология

Диссертация
на соискание ученой степени доктора
биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор
Евгений Александрович Гордиенко

Харьков – 2011

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ И КРИОЗАЩИТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ.....	16
1.1. Основные факторы повреждения клеток в условиях фазовых переходов при замораживании и отогреве.....	17
1.1.1. Физико-химические факторы повреждения клеток в области дозвтектических температур.....	18
1.1.2. Механизм распространения кристаллов льда в системах контактирующих клеток.....	38
1.1.3. Роль морфологической структуры внеклеточного льда в повреждении клеток.....	45
1.1.4. Факторы повреждения клеток в области эвтектических и субэвтектических температур.....	48
1.1.5. Девитрификация как фактор повреждения клеток на этапе отогрева.....	57
1.1.6. Морфологические проявления повреждений биологических объектов после цикла замораживание-отогрев.....	71
1.2. Термодинамические модели и экспериментальные методы определения транспортных характеристик плазматических мембран клеток в условиях внеклеточного льдообразования.....	72
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Материалы исследований.....	85
2.2. Методы исследований.....	87
2.2.1. Криомикроскопия.....	87
2.2.2. Криомикроскопия объемных образцов.....	91
2.2.3. Физико-химическая модель для изучения механизма	

зародышеобразования в биологических растворах.....	93
2.2.4. Низкотемпературная рентгенография.....	96
2.2.5. Осмометрия.....	101
2.2.6. Микроскопический метод определения транспортных характеристик плазматических мембран клеток.....	101
2.2.7. Оптическая микроскопия.....	103
2.2.8. Определение коэффициента перераспределения веществ в системе "клетка-среда" методом ¹ H-ЯМР-спектроскопии.....	104
2.2.9. Спектрофотометрия.....	106
2.2.10. Оценка состояния внешних примембранных слоев эритроцитов человека (гликокаликса) методом прижизненной окраски альциановым синим.....	106
2.2.11. Охлаждение образцов больших объемов.....	109
2.3. Химические реагенты.....	109
2.4. Методы анализа и статистической обработки результатов.....	110
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
РАЗДЕЛ 3. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАРОДЫШЕОБРАЗОВАНИЯ И РОСТА КРИСТАЛЛОВ ЛЬДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ РАСТВОРАХ.....	111
3.1. Механизм внеклеточной нуклеации льда.....	111
3.2. Механизм роста внеклеточных кристаллов льда.....	121
3.3. Механизм формирования кристаллической структуры льда различной дисперсности.....	137
3.4. Сравнительный анализ влияния основных факторов на кинетические характеристики внеклеточного льдообразования.....	153
3.5. Влияние режимов замораживания на структурные особенности льдообразования в водных растворах криопротекторов.....	156
3.6. Выводы.....	169
РАЗДЕЛ 4. КРИОМИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ЛЬДООБРАЗОВАНИЯ НА СОХРАННОСТЬ	

БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ.....	172
4.1. Рекристаллизационные явления как один из факторов повреждения клеток в зоне фазовых превращений.....	173
4.2. Влияние предварительной дегидратации и насыщения клеток проникающим криопротектором на их устойчивость к замораживанию.....	182
4.3. Выводы.....	196
РАЗДЕЛ 5. ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В РАСТВОРАХ НЕЭЛЕКТРОЛИТОВ РЯДА Н-СПИРТОВ КАК ИНДИКАТОР ТРАНСМЕМБРАННОГО МАССОПЕРЕНОСА ВЕЩЕСТВ В СИСТЕМЕ “КЛЕТКА–СРЕДА”.....	197
5.1. Трансформация эритроцитов человека в присутствии различных классов амфифильных соединений.....	199
5.2. Морфологические изменения эритроцитов человека в растворах не электролитов ряда Н-спиртов при их трансмембранном перераспределении.....	208
5.3. Выводы.....	217
РАЗДЕЛ 6. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИПЕРТОНИЧНОСТИ СРЕДЫ И ОХЛАЖДЕНИЯ НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА.....	219
6.1. Гипертоническая устойчивость эритроцитов пуповинной крови человека в электролитной среде NaCl.....	220
6.2. Гипертонический криогемолиз эритроцитов пуповинной крови человека в электролитной среде NaCl	227
6.3. Трансформация эритроцитов человека в гипертонических растворах электролита NaCl.....	232
6.4. Состояние внешних примембранных слоев эритроцитов человека – гликокаликса – при действии электролита NaCl умеренной гипертонии.....	238
6.5. Гипотермическая устойчивость формы эритроцитов человека как диагностический тест.....	243
6.6. Выводы.....	248

РАЗДЕЛ 7. ТРАНСПОРТНЫЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС.....	250
7.1. Механизм постгипертонического лизиса гепатоцитов крыс при регидратации.....	251
7.2. Оценка упругих свойств плазматических мембран гепатоцитов крыс.....	268
7.3. Проницаемость плазматических мембран гепатоцитов крыс для молекул воды и диметилсульфоксида.....	275
7.4. Осмотически зависимые деформации плазматических мембран гепатоцитов крыс.....	289
7.5. Выводы.....	302
РАЗДЕЛ 8. ТРАНСПОРТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ НЕПРЕРЫВНОЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ.....	304
8.1. Экспериментальная проверка адекватности физико-математической модели для определения транспортных характеристик плазматических мембран клеток при непрерывной внеклеточной кристаллизации.....	305
8.2. Теоретическое прогнозирование оптимальных скоростей охлаждения клеток почек сирийского хомячка.....	320
8.3. Выводы.....	323
ВЫВОДЫ.....	325
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	329

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЭГ	этиленгликоль
1,2-ПД	1,2-пропандиол
ДМСО	диметилсульфоксид
ПВП	поливинилпирролидон
ПЭО, ПЭГ	полиэтиленоксиды, полиэтиленгликоли
ОЭГ _{n=5}	оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации n=5
ПАВ	поверхностно-активные вещества
L_p, L_{pg}	гидравлическая проницаемость или коэффициент фильтрации при положительных и субнулевых температурах
k_p, k_{pg}	коэффициенты проницаемости веществ при положительных и субнулевых температурах
σ_i	коэффициент отражения клеточной мембраны для i-го вещества
π^{in}, π^{out}	осмотическое давление вещества во внутриклеточной и внеклеточной среде
K_p	коэффициент распределения веществ между гидрофобной и гидрофильной фазами
Q	коэффициент распределения веществ между клеткой и внеклеточной средой
hkl	миллеровские индексы плоскостей отражения рентгеновских лучей
v	линейная скорость роста кристалла
ℓ	средний размер кристалла
I_k	частота гетерогенного зародышеобразования
I_v	частота флуктуационного зародышеобразования
I_s	частота гетерофазного зародышеобразования
АС	альциановый синий
ВПМС	внешние примембранные слои
Γ	модуль изотропного растяжения клеточной мембраны

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

В настоящее время целесообразность и эффективность долгосрочного консервирования биологических объектов с использованием низких температур не вызывает сомнения.

Однако, несмотря на накопленный опыт, значительный экспериментальный материал и всестороннее его теоретическое обобщение, успехи, достигнутые в понимании возможных механизмов криповреждения клеток и путей их криозащиты [1–5] подход к разработке методов криоконсервирования различных биологических объектов по-прежнему носит в основном эмпирический характер. Это обусловлено, прежде всего, многообразием и сложностью физико-химических явлений, сопровождающих этапы технологического процесса криоконсервирования, и невозможностью однозначного прогнозирования их взаимного влияния на клетки.

Как известно, основные факторы, вызывающие повреждения клеток при низкотемпературном консервировании, непосредственно или косвенно связаны с изменением агрегатного состояния криобиологической системы. В зависимости от условий охлаждения клеточной суспензии при фазовом переходе в ней формируются кристаллы внеклеточного льда различной морфологии, что обуславливает определенный характер распределения клеток в кристаллической структуре. Это в свою очередь влияет на особенности массообмена между клеткой и средой при нарушении термодинамического равновесия в системе, и, в конечном счете, – на результат криоконсервирования.

Фазовый переход “вода-лед” представляет собой взаимосвязанный многостадийный процесс. Имеющиеся в литературе довольно обширные данные о возникновении первичных кристаллических структур, о влиянии на них условий теплоотвода, криопротекторов, различных модификаторов носят в основном описательный характер [6]. В криобиологии отсутствует исчерпывающий теоретический анализ, а также достаточно надежные

количественные экспериментальные данные о механизмах зарождения и роста внеклеточных кристаллов льда в сложных криобиологических системах. Исследование этих механизмов является принципиальной задачей, поскольку их раскрытие позволит более адекватно регулировать процессы зародышеобразования, роста, и, как, следствие, размеры и форму кристаллов льда, а, следовательно, и характер взаимодействия клеток с кристаллической структурой.

Способность клеток адаптироваться к стрессовым воздействиям на различных этапах криоконсервирования зависит от транспортных и механических характеристик их плазматических мембран, поскольку именно мембраны являются первичной мишенью таких воздействий. В связи с этим, исследование устойчивости клеток в стрессовых условиях, моделирующих различные криобиологические ситуации, а также определение комплекса биофизических параметров клеточных мембран, является принципиально необходимым для успешной оптимизации методов криоконсервирования. Сложность получения таких данных требует привлечения специальных методических подходов, сочетающих в себе физико-математическое и экспериментальное моделирование поведения клеток в неизотонических средах при различных температурах.

Таким образом, дальнейшее количественное изучение физико-химических явлений, сопровождающих низкотемпературное консервирование на этапе фазового перехода и особенностей температурно-осмотических реакций клеток, а также поиск эффективных путей управления этими процессами являются актуальными.

Связь работы с научными программами, планами, темами

Диссертация выполнена в рамках бюджетных НИР Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины: “Изучение роли физико-химических факторов в развитии криоповреждений и криозащиты биологических объектов. Оптимизация этапов технологического процесса криоконсервирования

клеток и тканей” (1986-1990 гг.), № государственной регистрации 01870065544; “Изучение механизмов криоповреждения и криозащиты биообъектов на основе синтеза мембранной и фазовой теорий строения клеток” (1991-1995 гг.), № государственной регистрации 01944005303; “Построение и экспериментальная проверка количественной теории криоконсервирования биологических объектов” (1996-2000 гг.), № государственной регистрации 0100U004235; “Экспериментальное изучение и количественное моделирование процессов, происходящих в мембранах клеток при криоконсервировании биологических объектов” (2001-2005 гг.), № государственной регистрации 0100U003479; “Теоретический анализ и экспериментальное исследование специфических механизмов криоповреждения и криозащиты клеток, обусловленных особенностями их функционирования” (2006-2010 гг.), № государственной регистрации 0106U002164.

Цели и задачи исследования

Цель работы – установить механизмы зарождения и роста внеклеточных кристаллов льда в криоконсервируемых биологических системах и механизмы действия на клетки физико-химических факторов, связанных с фазовым переходом “жидкость-кристалл”.

Задачи исследования:

1. Выяснить механизм образования зародышей кристаллов льда в переохлажденных растворах лиофилизированной плазмы крови человека.
2. Выяснить механизмы роста внеклеточных кристаллов льда и формирования морфологической структуры различной дисперсности в модельных растворах криопротекторов (этиленгликоль, диметилсульфоксид, полиэтиленгликоль с м.м. 1500, поливинилпирролидон с м.м. 12000) в зависимости от их переохлаждения и концентрации.
3. Оценить эффективность влияния начального переохлаждения, исходной концентрации криопротекторов и поверхностно-активных веществ на кинетические характеристики льдообразования в модельных биологических

растворах.

4. Изучить влияние внеклеточного льдообразования на сохранность сперматозоидов человека и эмбрионов мышей ранних стадий развития и выявить возможные способы предотвращения или снижения криповреждающего действия этого фактора.

5. Установить взаимосвязь между особенностями трансформации эритроцитов человека в растворах ряда насыщенных Н-спиртов и коэффициентом распределения этих неэлектролитов между клеткой и окружающей ее средой.

6. Определить осмотическую устойчивость и криорезистентность эритроцитов пуповинной крови человека к действию гипертонических растворов хлорида натрия.

7. Оценить состояние гликокаликса эритроцитов человека в растворах хлорида натрия умеренной гипертонии.

8. Выяснить механизм постгипертонической регуляции клеточного объема гепатоцитов крыс при их регидратации и оценить деформационные (модуль упругости) и транспортные (коэффициенты проницаемости для молекул воды и диметилсульфоксида) характеристики плазматических мембран этих клеток.

9. Обосновать адекватность физико-математической модели для определения биофизических параметров клеток при непрерывном внеклеточном льдообразовании.

10. Разработать алгоритм теоретического прогнозирования оптимальных скоростей охлаждения при замораживании-оттаивании ядерных клеток.

Объект исследования – процесс внеклеточного льдообразования и реакции клеток человека (эритроциты взрослых доноров, эритроциты пуповинной крови, сперматозоиды) и животных (гепатоциты крыс, эмбрионы мышей, перевиваемая культура клеток почек сирийского хомячка) на действие физико-химических факторов, которые возникают вследствие фазового перехода при криоконсервировании.

Предмет исследования – механизмы образования и роста внеклеточных кристаллов льда и механизмы повреждения биологических объектов явлениями,

которые сопровождают изменение агрегатного состояния среды на этапе замораживания и отогрева.

Методы исследований. В работе использованы экспериментальные и теоретические методы исследований: криомикроскопия, низкотемпературная рентгенография, осмометрия, световая и фазовоконтрастная микроскопия, волнометрия, спектрофотометрия, ^1H -ЯМР-спектроскопия, метод мелких капель, физико-математическое моделирование с использованием уравнений неравновесной термодинамики, математический аппарат теории упругости тонких оболочек, математические методы планирования и статистической обработки экспериментальных результатов многофакторных экспериментов.

Научная новизна полученных результатов

Впервые количественно изучен процесс первичного зародышеобразования кристаллов льда в модельных биологических растворах и доказано, что основным механизмом возникновения твердой фазы является гетерогенная нуклеация. Впервые получены аналитические зависимости линейной скорости роста кристаллов льда в биологических растворах от их переохлаждения и установлено, что в механизмы роста внеклеточных кристаллов льда и формирования его морфологической структуры различной дисперсности одновременно вносят вклад как нормальная, так и дислокационная составляющие роста кристаллов. В сравнительном аспекте изучено влияние переохлаждения, криопротекторов и поверхностно-активных веществ (ПАВ) на кинетические характеристики внеклеточного льдообразования и установлено, что наиболее эффективным способом управления скоростью роста и размером образующихся кристаллов льда является интенсивность теплоотвода. Показано, что криозащитная среда на основе 5,37 М этиленгликоля и 0,7 М сахарозы ингибирует вне- и внутриклеточное льдообразование при медленных скоростях замораживания ($5^\circ\text{C}/\text{мин}$) эмбрионов мышей ранних стадий развития. Впервые изучены особенности трансформации эритроцитов человека в различных криозащитных средах и установлена взаимосвязь между морфологическим ответом клеток и

характером перераспределения проникающих и непроникающих веществ в системе “клетка–окружающая среда”. Впервые изучена чувствительность эритроцитов пуповинной крови человека к гипертоническому воздействию NaCl и охлаждению и определены пределы устойчивости этих клеток к указанным факторам. Оценено состояние гликокаликса эритроцитов человека в умеренно гипертонических растворах NaCl и установлено, что одним из пусковых механизмов криогемолиза может быть частичная деструкция примембранных слоев. Впервые количественно оценены коэффициенты проницаемости плазматических мембран гепатоцитов крыс для молекул воды и диметилсульфоксида, численное значение модуля изотропного растяжения мембран и установлен механизм постгипертонического лизиса этих клеток в условиях регидратации. Впервые определены транспортные характеристики плазматических мембран клеток почек сирийского хомячка для молекул воды и глицерина в условиях непрерывного внеклеточного льдообразования и на примере этих клеток разработан алгоритм прогнозирования оптимальных скоростей замораживания клеточных суспензий.

Практическая значимость

Теоретически обоснован новый метод определения модуля изотропного растяжения мембран гепатоцитов крыс. Аномально низкое значение модуля упругости мембран гепатоцитов крыс, свидетельствующее о высокой резистентности этих клеток к постгипертоническому лизису, позволяет рекомендовать использовать в технологии их криоконсервирования медленные режимы замораживания. Для криоконсервирования эмбрионов мышей ранних стадий развития обоснована эффективность использования высокоосмотичной этиленгликоль-сахарозной среды на основе 5,37 М этиленгликоля и 0,7 М сахарозы. Разработаны алгоритм определения транспортных характеристик мембран клеток в условиях внеклеточного льдообразования и алгоритм прогнозирования оптимальных скоростей замораживания, которые могут быть использованы при экспресс поиске оптимальных условий криоконсервирования

различных клеточных суспензий. Предложен способ ранней диагностики стадий вибрационной болезни по кинетике накопления предгемолитических форм эритроцитов в условиях гипотермии.

Личный вклад соискателя

Диссертация является самостоятельным исследованием. Автору диссертационной работы принадлежит выбор темы, определение цели и задач исследований. Предложены идеи и методические подходы для постановки и проведения экспериментов. Соискателем самостоятельно получены экспериментальные данные во всех разделах исследований, проведены их статистическая обработка, обобщение, аналитический анализ и сформулированы основные выводы.

В совместных научных публикациях соавторы принимали участие в подготовке биологического материала к исследованиям, постановке отдельных экспериментов и обсуждении результатов. Алгоритмы аналитических расчетов биофизических характеристик плазматических мембран клеток на основе полученных экспериментальных данных были разработаны при непосредственном участии научного консультанта доктора биологических наук, профессора Гордиенко Е. А. и кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Коваленко И. Ф. В опубликованных с соавторами публикациях личный вклад соискателя состоит в следующем:

- в работе [225] – в разработке и испытаниях устройства для криомикроскопических исследований;
- в работах [295, 296, 313, 322–329] – в постановке экспериментов, непосредственном проведении криомикроскопических и низкотемпературных рентгенографических исследований, обработке, анализе, интерпретации и обобщении экспериментальных результатов;
- в работах [330–333, 338, 346] – в постановке экспериментов, непосредственном проведении криомикроскопических исследований, обработке, анализе, интерпретации и обобщении экспериментальных результатов;

- в работах [361, 370, 371, 373, 374, 396, 397] – в разработке методологического подхода и непосредственном проведении микроскопических исследований, обработке, анализе и обобщении экспериментальных результатов;
- в работах [419, 446–449] – в методологии постановки экспериментов, непосредственном проведении микроскопических исследований, обработке, анализе, интерпретации и обобщении экспериментальных результатов;
- в работах [466, 474, 475, 477, 479, 480, 490, 492, 537] – в идее и методологии постановки экспериментов, непосредственном проведении микроскопических исследований, обработке, анализе и обобщении экспериментальных результатов;
- в работах [538, 539] – в идее и методологии постановки экспериментов, непосредственном проведении криомикроскопических исследований, обработке, анализе, интерпретации и обобщении экспериментальных результатов.

Апробация результатов диссертации

Материалы диссертационной работы были представлены на: II Всесоюзной конференции по теоретическим и прикладным вопросам криобиологии “Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов” (Харьков, 1984); Международной конференции “Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины” (Харьков, 1988); Научно-практической конференции “Новые приложения морфометрии и математическое моделирование в медико-биологических исследованиях” (Харьков, 1990); Научно-практической конференции “Структурно-функциональные единицы и их компоненты в органах висцеральных систем в норме и патологии” (Харьков, 1991); II Международной конференции ЮНЕСКО “Успехи современной криобиологии” (Харьков, 1992); 29, 31, 33th Annual Meeting of Society for Cryobiology (Ithaca, New York, USA, 1992; Kyoto, Japan, 1994; Indianapolis, Indiana, USA, 1996); I, III, IV Съездах Украинского биофизического общества (Киев, 1994; Львов, 2002, Донецк, 2006); Meeting of the Society for Low Temp Biology (Leuven, Belgium, 1994); I Съезде Украинского общества криобиологии и

криомедицины (Харьков, 1995); II Съезде биофизиков (Москва, Россия, 1999); Cryobiomol-2003 (Coimbra, Portugal, 2003); IV Международном симпозиуме “Актуальные проблемы биофизической медицины” (Киев, 2004); I Украинской научной конференции “Проблемы биологической и медицинской физики” (Харьков, 2004); Международной конференции “Сохранение генетических ресурсов” (Санкт-Петербург, Россия, 2004); Конференции с международным участием “Актуальные проблемы и достижения криобиологии и криомедицины. Структурная и функциональная организация стволовых клеток в условиях действия низких температур” (Харьков, 2005); Всеукраинской научно-технической конференции “Актуальные вопросы теоретической и прикладной физики и биофизики “Физика. Биофизика-2006”(Севастополь, 2006); II International Conference Electronics and Applied Physics (Kyiv, 2006); 14, 16th Meeting of the European Association for Red Cell Research (Roscoff, France, 2003; Oxford, 2007); Конференції “Фізика низьких температур” (КМУ-ФТН-2007) (Харків, 2007); Міжнародній науковій конференції “Біофізичні механізми функціонування живих систем” (Львів, 2008); Конференции “Криоконсервация как способ сохранения генетических ресурсов” (Пущино, Россия, 2008); 4th International Conference “Physics of liquid matter: Modern problems”(Kyiv, 2008); International Conference “Structure and Dynamics of Hydrogen-Bonded Systems” (Miramare, Trieste, Italy, 2009).

Публикации. Результаты диссертации отражены в 61 публикации: 25 статей в научных профильных журналах (из них 8 без соавторов), 4 – в зарубежных научных журналах, 4 статьи в сборниках трудов (из них 1 без соавторов) 2 патента, 26 тезисов докладов на конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из вступления, 8 разделов оригинальных исследований, выводов, списка использованных источников. Она содержит 385 страниц, из них 304 страницы основного текста, 27 рис., 51 фото, 24 табл., 4 схемы, из которых 11 рис., 9 фото, 8 табл., 1 схема на отдельных 24 страницах, список использованных источников из 543 наименований на 57 страницах.

РАЗДЕЛ 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ И КРИОЗАЩИТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Случайное открытие в 1949 году С. Polge, А. U. Smith и А. S. Parkes защитного действия глицерина при замораживании сперматозоидов птиц до температуры -70°C положило начало активному развитию исследований в области сохранения жизни холодом. С тех пор криобиология продвинулась далеко вперед в понимании основных механизмов, контролирующих сохранность клеток в процессе криоконсервирования. Это обусловило определенные успехи в области криохирургии и репродуктивной медицины человека, в животноводстве, создании низкотемпературных банков генофонда редких и исчезающих видов животных и растений [2, 3, 7]. Однако современный этап развития криобиологии требует глубоких фундаментальных исследований, позволивших заменить рутинный эмпирический поиск оптимальных протоколов криоконсервирования биологических объектов теоретическим прогнозированием криобиологических ситуаций, минимизирующих повреждение клеток на всех этапах технологического процесса. Жизнеспособность клеток может быть обеспечена только тогда, когда разрабатываемые технологии криоконсервирования будут в комплексе защищать все взаимосвязанные процессы в клетке, обеспечивающие их полноценное функционирование, поскольку существенный сдвиг химического равновесия в клетке может привести к ее гибели [3]. Охлаждение до гипотермических температур (вплоть до 0°C) не останавливает биохимические реакции и потому эффективно при поддержании жизнеспособности только в течение определенного периода времени в зависимости от функциональной принадлежности и сложности строения клеток. Ингибирование

межмолекулярных взаимодействий субнулевыми температурами обеспечивает долгосрочное хранение, но в этом случае основной проблемой являются физико-химические явления, обусловленные фазовым переходом воды в лед, и связанные с ними процессы массопереноса “клетка – внеклеточная среда”.

1.1. Основные факторы криповреждения клеток в условиях фазовых переходов при замораживании и отогреве

Известно, что вода обладает многообразием кристаллических фаз – полиморфных льдов. Обычный гексагональный лед Ih, в который вода кристаллизуется при $T = 0^{\circ}\text{C}$ и нормальном давлении, является одним из представителей, по крайней мере, 13 видов льдов, в которые кристаллизуется вода в зависимости от температуры и давления. Однако, все фазы льдов, полученные в условиях высоких давлений и низких температур, являются нестабильными. В частности, кубический лед Ic, который образуется при конденсации водяных паров на металлической поверхности при температуре ниже -110°C , в области -90°C переходит в гексагональный лед. Переход к кубическому льду Ic возможен из аморфной фазы в интервале температур от -160 до -120°C . Таким образом, при криоконсервировании биологических объектов практически всегда имеет место образование льда I в гексагональной модификации Ih. В кристалле льда I молекулы воды посредством водородных связей соединяются с группой из четырех других молекул воды. Атомы кислорода в этой структуре располагаются в вершинах тетраэдра. Атомы водорода обычно находятся на расстоянии $\sim 1 \text{ \AA}$ от одного из концов связи O – O и энергия их одинакова в любом положении [8]. В твердой фазе взаимодействие растворителя (воды) с другими растворенными в исходном растворе веществами не происходит из-за несоответствия параметров их кристаллических решеток, т.е. твердый раствор не образуется. Поэтому лед кристаллизуется в виде чистой фазы, вытесняя ионы и другие растворенные вещества в остаточный маточный раствор, увеличивая его концентрацию при температуре -25°C до 5 М. Клетки,

как макрочастицы, также оттесняются растущим фронтом льда в раствор с непрерывно повышающейся концентрацией, где и развиваются основные физико-химические явления, определяющие последующую их судьбу. Важнейшие факторы, от которых зависит, как именно определенный тип клеток будет отвечать на охлаждение при субнулевых температурах, включают характеристики, описывающие осмотические параметры клетки, такие как проницаемость клеточной мембраны для молекул воды и поверхностно-объемное соотношение, изменение водной проницаемости мембраны при охлаждении, время и конечную температуру охлаждения, а также изменение давления пара и содержания растворенных веществ, как во внутриклеточном, так и внеклеточном растворах по мере увеличения фракции льда. Именно условия охлаждения клеточных суспензий являются тем внешним фактором, который определяет скорость фазового превращения, а, следовательно, и соответствующую клеточную реакцию.

1.1.1. Физико-химические факторы повреждения клеток в области доэвтектических температур

Криоповреждения биологических объектов в зоне фазового превращения “вода–лед” общепринято делятся на два четких механизма, являющихся основой классической двухфакторной гипотезы [9], обусловленные скоростью охлаждения системы: при медленных скоростях повреждения связаны непосредственно с возникновением кристаллической структуры и “эффектами раствора”, при быстрых – с образованием внутриклеточных кристаллов льда. И если образование внутриклеточного льда, как правило, считается смертельным для клеток, механизмы клеточного повреждения при низких скоростях охлаждения многообразны и менее хорошо понятны.

“Эффекты раствора” включают в себя целый комплекс возможных механизмов повреждения. Во-первых, это токсическое действие раствора, вызванное длительным пребыванием клеток в гипертонической криозащитной

среде. Однако данный механизм остается еще недостаточно изученным, но важность его особенно очевидна при разработке технологий криоконсервирования биологических объектов с использованием метода витрификации. Во-вторых, это так называемая “солевая нагрузка” клеток [10], которая, согласно недавно высказанной гипотезе [11], может происходить в течение замерзания благодаря открытию солевых мостиков в цитоплазматических протеинах. Авторами данной гипотезы предложена упрощенная модель постгипертонического лизиса клеток вследствие воздействия высоких концентраций соли NaCl при медленном замораживании. В этой модели внутриклеточная среда моделируется смесью KCl и протеиноподобным компонентом, который в норме формирует многочисленные солевые мостики между аминокислотами с фиксированными зарядами. При повышении внутриклеточной концентрации соли белки высаливаются (хорошо известный биохимический феномен, когда солевые мостики замещаются ионными взаимодействиями), следствием чего является уменьшение внутриклеточной концентрации катионов. В результате экспонирования клеток в высокой концентрации соли (или внутри, или за пределами клетки) катионные каналы в плазматической мембране открываются, позволяя внеклеточному Na^+ замещать внутриклеточный K^+ , который взаимодействует с анионактивными группами протеинов. Снижение концентрации внеклеточной среды, обусловленное оттаиванием льда при отогреве, является причиной входа воды в клетку и понижения концентрации внутриклеточного раствора. Это в свою очередь приводит к высвобождению связанных протеинами ионов во внутриклеточный раствор. Как следствие в клетке возникает избыток ионов, что вызывает последующий поток воды в клетку, ее значительное набухание и в конечном итоге лизис. Правомочность своей гипотезы авторы проиллюстрировали, изучая изменение клеточного объема фибробластов хомяка V79-W, выращенных в культуре, при перенесении их в изотонические условия после экспозиции в растворах NaCl различной концентрации. Было показано, что после экспозиции клеток при 22°C в солевых растворах с концентрацией выше 2 М постгипертонический объем клеток

существенно превосходил изотонический, и отмечалось падение жизнеспособности. Этот ответ качественно хорошо предсказывается предложенной моделью, однако ее проверка требует количественного уточнения ряда экспериментальных параметров. В-третьих, повреждения “эффектами раствора”, согласно теории минимального объема [12], могут быть обусловлены значительным осмотическим сжатием клеток, вследствие чего объем клетки может оказаться меньше критического.

Чтобы облегчить анализ механизмов повреждения клеток “эффектами раствора”, были разработаны эмпирические уравнения фазовой диаграммы, которые описывают, в частности, изменение композиционного состава тройных систем NaCl – ДМСО – H₂O и NaCl – глицерин – H₂O, происходящее при внеклеточном льдообразовании [13]. Уравнения позволяют точно вычислять композиционные значения составляющих среды в зависимости от данного начального состава и конечных температур замораживания, а также определять температуры, в которых при замораживании реализуется интересующий специфический концентрационный состав в зависимости от исходного состава среды. Несмотря на некоторые ограничения (равновесные условия охлаждения в области температур выше $\sim -50^{\circ}\text{C}$, т.е. до эвтектической зоны) уравнения облегчают теоретически спрогнозировать взаимосвязь между сохранностью клеток и значениями композиционного состава в ряду температур, при которых возможно наибольшее повреждение “эффектами раствора”.

Кроме того, при медленном охлаждении возникает так называемое реологическое повреждение [14], связанное с оттеснением массы клеток в узкие каналы, что приводит к плотной упаковке клеток и их тесному контакту со льдом. Повреждение в данном случае может наступить в результате механического сдавливания клеток кристаллами льда и деформации клеток. Как показали Т. Nei [15] и D. E. Pegg [16], замораживание суспензии эритроцитов с гематокритом выше 30% действительно характеризуется увеличением количества поврежденных клеток. Падение жизнеспособности и метаболической активности клеток наблюдается также при увеличении концентрации криоконсервируемых

гепатоцитов [17]. Р. Mazur [14, 18, 19] показал, что сохранность эритроцитов при замораживании суспензии клеток с гематокритом до 8% больше зависит от величины незамороженной фракции, чем от концентрации соли в ней, указав тем самым на роль размеров незамерзающих межкристаллических каналов. В то же время при высоком гематокрите (40–60%) сохранность клеток зависит как от величины незамерзающей фракции, так и от концентрации соли в этой фракции. Существенную роль в данном случае играет также контакт клеток между собой и их значительное обезвоживание.

Криомикроскопические исследования убедительно иллюстрируют, что при понижении температуры по мере сужения каналов клетки подвергаются как дегидратации, так и механическому сдавливанию кристаллами льда [20, 21]. Как полагает автор работы [20], изменение формы клеток может быть связано как с механическим давлением на клетку льда, так и с эффектом более выраженного обезвоживания частей клетки, контактирующих со льдом. Ранее нами [21] была проанализирована зависимость ширины канала от исходной концентрации глицерина в клеточной суспензии при постоянной скорости вымораживания воды (1°C/мин) и формировании идентичной внеклеточной структуры льда. Исследования показали, что при любой заданной отрицательной температуре канал был тем уже, чем меньше исходное содержание криопротектора в среде замораживания. Согласно фазовой диаграмме состояния, независимо от исходной концентрации криопротектора при каждой определенной отрицательной температуре в канале должна достигаться примерно одна и та же его концентрация. Размер же канала при этом определяется исходным содержанием криопротектора, поскольку для достижения заданной концентрации в канале необходимо вымораживание соответствующего количества воды, которое тем меньше, чем больше исходная концентрация криопротектора в растворе, и, следовательно, тем шире при данной температуре будет канал. Корреляция между сохранностью клеток и соотношением ширины канала и размера обезвоженной клетки была нами установлена в работе [21]. При изучении взаимодействия клеток растений с кристаллами льда было отмечено, что

клеточная стенка во время охлаждения вдавлируется массой растущего внеклеточного льда [22]. Как следствие непосредственного физического действия растущих внеклеточных кристаллов льда убедительно иллюстрирует искажение zona pellucida ооцитов мыши, которая имеет низкую механическую жесткость, является абсолютно проницаемой и, следовательно, не проявляет осмотической реакции (размер пор zona pellucida составляет $\geq 1000 \text{ \AA}$), и искажение плазматической мембраны ооцитов мыши в узких незамерзших каналах [23]. Авторам удалось показать, что искажения формы ооцитов мыши, обусловленные только осмотическим сжатием в гипертонических растворах 1,0 М этиленгликоля и 1,0 М глицерина, морфологически отличаются от деформаций, вызванных давлением внеклеточных кристаллов льда. Так, если имела место деформация внеклеточными кристаллами, то в процессе плавления льда и zona pellucida, и ооциты в течение 3-4 мин возвращались к нормальной форме. Осмотически сморщенные ооциты в гипертонических растворах глицерина не восстанавливались сразу после завершения плавления. Формирование внутриклеточных кристаллов льда в ооцитах мыши при температурах существенно ниже температуры внеклеточного льдообразования свидетельствовало о том, что в присутствии криопротекторов деформация ооцитов внеклеточным льдом не приводит к потере целостности плазматической мембраны, критерием чего является сохранение способности клеток к переохлаждению. В то же время замораживание ооцитов в растворе Дюльбекко сопровождалось более выраженными деформационными искажениями плазматической мембраны, вызывающими в ней локальные дефекты, способствующие проникновению внеклеточных кристаллов льда [23]. Искражение плазматической мембраны при взаимодействии с кристаллами внеклеточного льда наблюдалось также при замораживании ооцитов лягушки *Xenopus laevis* [24]. Исследования подвижности спермиев мыши после замораживания до промежуточных температур в интервале между $0^{\circ}\text{C} \dots -10^{\circ}\text{C}$ и $-30^{\circ}\text{C} \dots -70^{\circ}\text{C}$ со скоростью $21^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в среде, содержащей 10% раффинозы и 0,8 М глицерина в фосфатном буфере, показали, что основная потеря подвижности до 42% была

связана с замораживанием до -10°C [25]. Поскольку проницаемость спермиев мыши для молекул воды достаточно высока и спермии имеют высокое поверхностно-объемное отношение, авторы считают, что, в данных условиях замораживания термодинамическое равновесие с частично замерзшим внеклеточным раствором поддерживается дегидратацией клеток и внутриклеточная кристаллизация маловероятна, а, следовательно, потеря активности может быть результатом прямого физического давления возникающего при образовании внеклеточных кристаллов льда. Локальные разрывы клеточных мембран при возникновении внутриклеточных кристаллов льда в яйцеклетках и инфузориях, а также при направленном движении фронта кристаллизации в липосомах, свидетельствуют о том, что их причиной может быть кристаллизационное давление [26]. Теоретические и экспериментальные работы оценивают кристаллизационное давление $\sim 10 \text{ кг/см}^2$ и связывают его с энергией фазового перехода. Если не учитывать анизотропию растущего кристалла и среды, то кристаллизационное давление $P_{\text{кр.}}$ при росте из расплава может быть рассчитано из уравнения

$$P_{\text{кр.}} = \Delta T \frac{\Delta H}{T_0 V_0},$$

где ΔH – теплота плавления, ΔT – переохлаждение, T_0 – абсолютная температура плавления. В частности, при кристаллизации раствора NaCl при переохлаждении $\Delta T = 0,7^{\circ}\text{C}$ кристаллизационное давление достигает порядка 8 кг/см^2 [27]. В работе [28] была предложена оригинальная методика, моделирующая различную степень сдавливания клеток между кристаллами льда. Клетки аденокарциномы простаты человека линии ND-1, размер которых составляет в среднем $20 \pm 2,0 \text{ мкм}$, подвергались давлению между двумя покровными стеклами, создаваемому изменением зазора между ними внесением в суспензию клеток стеклянных шариков известного диаметра. Микроскопические исследования показали, что большинство клеток выдерживало деформацию при зазоре между стеклами $11,4 \text{ мкм}$. Снижение сохранности отмечалось при зазоре $8,8 \text{ мкм}$. 50% клеток погибало при

уменьшении зазора до 5,9 мкм, т.е. при уменьшении диаметра клеток до 30% от исходного размера ($0,3 d_0$). Поврежденные клетки имели нерегулярные контуры плазматической мембраны и прокрашивались трипановым синим. Авторы [28] получили аналитическое выражение, описывающее растяжение мембраны γ при идеальной деформации клеток в зависимости от величины зазора между пластинами h и диаметра клетки d_0 :

$$\gamma = \frac{A}{A_0} = \left(-\frac{\pi^2}{16} + \frac{2}{3} \right) \left(\frac{h}{d_0} \right)^2 + \frac{1}{3} \left(\frac{d_0}{h} \right) + \frac{\pi}{4} \left(\frac{h}{d_0} \right)^2 \sqrt{\left\{ \frac{\pi^2}{16} + \frac{2}{3} \left[\left(\frac{d_0}{h} \right)^3 - 1 \right] \right\}},$$

где A – площадь поверхности деформированной клетки, A_0 – площадь поверхности исходной сферической клетки. Исходя из условия, что сохранность индивидуальной клетки $\eta(\gamma) = 1$ при $\gamma < \gamma_{\text{крит.}}$ и $\eta(\gamma) = 0$ при $\gamma \geq \gamma_{\text{крит.}}$, и учитывая, что экспериментальный разброс диаметров клеток $f(d_0)$ отвечает распределению Гаусса, суммарная сохранность клеток ξ представляется ими в виде:

$$\xi = \int_{d_{\min}}^{d_{\max}} f(d_0) \eta(\gamma) dd_0 \quad (1.1)$$

Численное интегрирование уравнения (1.1) позволило авторам получить значения сохранности ξ в зависимости от высоты зазора h и определить критическое растяжение мембраны $\gamma_{\text{крит}} = 1,5$, соответствующее при величине зазора 6 мкм повреждению 50% клеток. Обсуждая возможный механизм повреждения клеток кристаллами льда, авторы [28] предложили упрощенную математическую модель их деформации между кристаллами льда, нарастающими в виде плоских пластин, в зависимости от диаметра клетки и расстояния между кристаллами. В этой модели замораживаемый объем суспензии представляется в виде куба, в середине которого расположены клетки. Кристаллы льда параллельным фронтом произрастают внутрь куба. Размеры куба V_0 выражаются в единицах n числа диаметров клетки d ($V_0 = n \times d$). В своих рассуждениях авторы использовали известную зависимость температуры фазового превращения от осмолярности водного раствора $T = -1,86 O$, где T – это температура фазового перехода $^{\circ}\text{C}$, O – осмолярность водного раствора в осмолях. Исходя из этого, при замораживании

постоянного объема раствора осмолярностью 0,3 Осм соотношение между начальным объемом V_0 и объемом незамороженной фракции при данной субнулевой температуре $V(T)$, коррелирует с температурой следующим образом:

$$T = -0,558 V_0 / V(T) \quad (1.2)$$

Уравнение (1.2) позволило авторам, используя полученные при изучении деформации клеток аденокарциномы простаты человека линии ND-1 экспериментальные данные, установить простое соотношение между температурой, при которой в рассматриваемой кубической модели растущие кристаллы льда вызывают деформационное повреждение 50% клеток и числом диаметров клеток исходного контрольного объема:

$$T(50\%) = -1,86 n \quad (1.3)$$

Из соотношения (1.3) следует, что температура, при которой возможно повреждение клеток в результате деформации кристаллами льда связана с расстоянием между кристаллами. Когда кристаллы льда небольшие и находятся на расстоянии, сравнимом с диаметром клеток ($n = 1$) повреждение давлением возможно при температуре $-1,8^\circ\text{C}$. Если кристаллы льда в 5 раз больше ($n = 5$) диаметра клетки, такое повреждение возможно при температуре $-9,3^\circ\text{C}$. Эти выводы качественно хорошо коррелируют с результатами замораживания клеток ND-1 [29] и эритроцитов человека [30] в отсутствии и присутствии антифризных белков, влияющих на морфологию образующихся кристаллов льда. При замораживании клеточных суспензий без антифризных белков расстояние между кристаллами льда соответствовало нескольким диаметрам клеток. Клетки находились в межкристаллических каналах и не повреждались. В присутствии антифризных белков размер кристаллов льда оказывался сравнимым с размерами клеток, клетки деформировались и повреждались в результате образования внутриклеточного льда. Авторы считают, что в этом случае внутриклеточный лед был сформирован вследствие повреждения мембраны давлением внеклеточных кристаллов. Таким образом, при медленном охлаждении механический фактор может вносить вклад в повреждение при несоответствии размера обезвоженных клеток и ширины формирующихся каналов [21]. Криопротекторы, приводя к

увеличению ширины каналов, снижают уровень деформации клеток льдом. Однако выделить повреждение, вызванное исключительно непосредственным физическим действием внеклеточных кристаллов льда, весьма сложно в связи с тем, что сдавливание клеток в каналах сопровождается их дегидратацией, а также действием на клетки возрастающей внеклеточной концентрации раствора.

Попытку изучить вклад в повреждение механического взаимодействия между льдом и клетками была предпринята Р. Mazur с соавт. [31, 32]. Варьируя исходную концентрацию соли NaCl в суспензии эритроцитов, они количественно показали, что сохранность клеток ниже в незамороженных фракциях небольшого размера. На основании полученных данных ими была предложена так называемая “модель незамороженной фракции”, согласно которой эффект механического давления проявляется сильнее при более низких температурах, где формируется больший объем льда. Однако позднее D. Pegg и M. Diaper [33] было указано, что результаты сохранности клеток, представленные Р. Mazur с соавт. [31, 32], по существу включали сочетанное повреждающее воздействие как эффекта льда, так и концентрации раствора. Вопрос долевого вклада в повреждение клеток непосредственно механического давления льда и “эффектов раствора” оставался открытым. Интерес к исследованию данной проблемы возобновился в последнее время благодаря уникальным техническим возможностям разработанного перфузионного микроскопа, позволяющего синхронизировать изменение температуры и концентрации различных веществ в суспензии, в частности NaCl, и таким образом моделировать процесс замораживания [34, 35, 36]. Сравнивая экспериментальные результаты экспозиции клеток при 23°C, охлаждении до 0°C, “псевдо-замораживания” и замораживания клеток РС-3 аденокарциномы простаты человека в растворах NaCl, Н. Takamatsu с соавт. [36] удалось отдифференцировать вклад в суммарное повреждение клеток “эффектов раствора” и механического давления внеклеточного льда и показать, что приоритетность того или иного фактора повреждения зависит от условий замораживания. Суспензию клеток РС-3 охлаждали в криомикроскопе до 0°C и выдерживали при этой температуре в течение 4 мин. Дальнейшее охлаждение

проводили с постоянной скоростью 1°C/мин или 5°C/мин до –10°C или –20°C, в которых образцы выдерживали в течение 10 мин и затем отогревали со скоростью 5°C/мин до 0°C. Специфичность экспериментов “псевдо-замораживания” состояла в том, что в перфузионной камере микроскопа одновременно осуществляли изменение внеклеточной концентрации NaCl и температуры со скоростями аналогичными экспериментам по замораживанию клеток, но фактическое уменьшение температуры в центре камеры поддерживали на 2°C выше линии ликвидуса, что позволяло избегать образования внеклеточного льда. Непрерывное повышение концентрации соли в перфузионной камере проводили до 2,5 М или 4,5 М, при которых в условиях медленного замораживания термодинамическое равновесие маточного раствора со льдом достигается соответственно при температурах –10°C и –20°C. Средняя скорость возрастания концентрации в суспензии клеток соответствовала скоростям охлаждения 1°C/мин и 5°C/мин и составляла 0,25 М/мин и 1,2 М/мин соответственно. После выдержки клеток в конечных концентрациях NaCl (2,5 М или 4,5 М) процесс плавления моделировали снижением концентрации в суспензии со скоростью 1,2 М/мин, которая соответствовала отогреву со скоростью 5°C/мин. Во всех экспериментах жизнеспособность оценивали в 0°C по включению пропидиума йодида, который содержался в исходном растворе NaCl. Как показали исследования, большинство клеток выдержало экспозицию в 2,5 М растворе NaCl, как после “псевдо-замораживания”, так и после охлаждения до 0°C независимо от скорости нарастания концентрации в суспензии. В то же время сохранность в 4,5 М растворе NaCl падала в обоих случаях, причем значительно после “псевдо-замораживания”. Существенная разница в сохранности клеток была обнаружена при всех экспериментальных вариантах после замораживания и “псевдо-замораживания”. Так, независимо от скоростей охлаждения при замораживании суспензии клеток до температуры –10°C повреждалось около 30% клеток, в то время как в условиях “псевдо-замораживания” более 95% клеток сохранялось при этой температуре в 2,5 М растворе NaCl. Исходя из этого, авторы считают очевидным, что повреждение

клеток в температурном диапазоне до -10°C обусловлено механическим давлением льда. После замораживания клеток со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры -20°C падение сохранности составляло 90%, в то время как после “псевдо-замораживания” при возрастании концентрации соли в суспензии при -20°C до 4,5 М повреждалось 60% клеток. Следовательно, при замораживании до -20°C вклад в повреждение клеток механического давления льда составляет 30%, а “эффектов раствора” – 60%. При сравнении данных о сохранности клеток после замораживания со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры -20°C и “псевдо-замораживания” наблюдалась такая же тенденция, но в этом случае вклад “эффектов раствора” увеличивался до 80%, а вклад механического давления льда снижался до 10%. Таким образом, при медленном замораживании “эффекты раствора” являются доминирующими при более низких температурах, в то время как эффект механического давления льда может быть значительным в ограниченном, более высоком, субнулевом температурном диапазоне. Тем не менее, несмотря на убедительность полученных результатов, следует обратить внимание на следующее. Разницу в сохранности клеток между экспериментами замораживания и “псевдо-замораживания” авторы относят только за счет образования внеклеточного льда, однако нельзя исключать вероятность того, что повышение концентрации NaCl в растворе при замораживании может проявлять дополнительный эффект, связанный с возрастанием чувствительности клеток к механической деформации, что было показано в работе [37].

Транспорт воды через плазматическую мембрану в течение замораживания и таяния является наиболее важным фактором, определяющим сохранность клеток. Это движение воды управляется скоростью фазовых изменений как внутри, так и вне клетки и ограничивается гидравлической проницаемостью клеточных мембран, а также вязкостными свойствами вне – и внутриклеточной среды. Р. Mazur теоретически показал [38], что обезвоживание клеток вследствие замораживания зависит от скорости роста внеклеточных кристаллов льда. В условиях высокого теплоотвода, а следовательно высоких скоростей роста внеклеточных кристаллов льда, осмотический ответ клеток становится

термодинамически неравновесным, цитоплазма клеток переохлаждается и вероятность внутриклеточного кристаллообразования становится неизбежной. Вопрос о том, является ли образование внутриклеточного льда причиной повреждения мембраны или же следствием ее повреждения, по-прежнему остается открытым [23, 39]. Согласно гипотезе Р. Mazur [40] внеклеточный лед при критической температуре может прорасти внутрь переохлажденной цитоплазмы без повреждения мембраны, если радиус устойчивого зародыша будет соответствовать радиусу водных пор в плазматической мембране. Для анализа изменения равновесного радиуса кристалла льда в зависимости от температуры при условии, что по обе стороны поры имеется только чистая вода, Р. Mazur, используя уравнение Кельвина, получил следующее выражение:

$$\Delta T = \frac{2V_1^L T_{fp}^0 \sigma_{SL} \cos \theta}{aL_f}, \quad (1.4)$$

где ΔT – разница между температурой замерзания воды в поре радиуса a и температурой замерзания плоской границы лед–вода (T_{fp}^0); σ_{SL} – поверхностное натяжение на межфазной границе между льдом и жидкой водой; V_1^L – молярный объем чистой жидкой воды; θ – контактный угол между межфазной границей лед – вода и стенкой поры; L_f – скрытая молярная теплота плавления. Расчеты показали, что равновесный радиус кристалла льда при температурах ниже -10°C довольно мал, и внеклеточный лед способен пройти через пору размером в $8 \text{ \AA}$, если контактный угол θ составляет порядка 75° . Однако из-за отсутствия точных данных о физическом взаимодействии льда и поры доказать или опровергнуть “теорию поры” Р. Mazur не представлялось возможным. Кримиоэлектронные наблюдения за развитием процесса инициирования кристаллообразования в контактирующих липосомах, проведенные нами [26], убедительно доказали участие в нем бислойного контакта. В связи с этим в основу предполагаемого нами механизма инициирования внутриклеточного льдообразования было положено представление о наличии в плазматической мембране гидрофильных каналов [41]. Рассматривая процесс зародышеобразования льда как процесс структурной

перестройки метастабильной фазы внутриклеточной воды, внеклеточный лед может ускорить ее перестройку. При этом время латентного периода инициирования внутриклеточной кристаллизации будет зависеть от скорости молекулярной перестройки, которая возрастает с понижением температуры. Полученные нами данные [26] свидетельствуют в пользу гетерогенного механизма внутриклеточного льдообразования. Катализатором процесса является внеклеточный лед, а проводящим звеном гидрофильный канал мембраны, вода в котором чрезвычайно структурирована, и “кристаллизационная активность” которого возрастает с понижением температуры. Предложенный механизм также исключает первичное повреждение мембраны. Недавнее открытие в плазматических мембранах клеток некоторых млекопитающих белковых “водных пор” или аквапоринов свидетельствует в пользу вероятности существования вышеуказанных механизмов [42]. Архитектура такой селективной водной поры (AQP1), образованной белком CHIP28, впервые обнаруженным в мембранах эритроцитов человека, была реконструирована в модельной системе с использованием метода электронной кристаллографии [43, 44]. Согласно полученным данным такая пора имеет диаметр $4,0 \pm 0,5 \text{ \AA}$, длину $18 \text{ \AA}$ и изгибается под углом 25° , так как структура бислоя представляет собой препятствие. Эта узкая пора сопряжена с внеклеточным пространством и цитоплазмой широкими воронкообразными отверстиями и устлана главным образом гидрофобными остатками, чередующимися с короткими отрезками полярных аминокислот, в результате чего возникает относительно инертный путь, способствующий диффузионно-ограниченному потоку воды. М. Toner с соавт. [45] считают, что внутриклеточное кристаллообразование происходит в результате нуклеации льда в пределах клетки, катализатором которой выступает плазматическая мембрана, взаимодействующая с внеклеточным льдом. Согласно их представлениям в сильно обезвоженных клетках ультраструктурные изменения в мембранах могут служить потенциальными участками зародышеобразования. Таким образом, приведенные гипотезы предполагают, что необходимым условием для внутриклеточного льдообразования является тесный

контакт внеклеточных кристаллов льда с внешней поверхностью мембраны клеток. Экспериментально было показано [23, 46], что в ооцитах мыши при температурах выше -40°C внутриклеточный лед всегда возникал вследствие именно такого контакта, когда во внеклеточной среде оставалось менее 10% незамороженного раствора. Это значение (10% незамороженной фракции) было всегда постоянно независимо от исследованных криопротекторов глицерина и этиленгликоля, их исходной концентрации в растворе, и даже в том случае, если при температуре образования внутриклеточного льда (в интервале от -14°C до -40°C) концентрации криопротекторов и NaCl во внеклеточной среде значительно отличались. Уточненный расчет, проведенный по фазовым диаграммам тройных систем глицерин (этиленгликоль) – NaCl – вода, показал, что внутриклеточный лед, как правило, возникает в условиях, когда замерзает 92–94% внеклеточной воды [47]. Однако, Р. Mazur с соавт. [46] считают, что невозможно дать однозначный ответ на вопрос, как и почему тесный контакт между внеклеточным льдом и поверхностью клетки должен инициировать внутриклеточный лед. По их мнению, возможно, в этом случае увеличивается вероятность того, что внеклеточные кристаллы могут войти в контакт с заранее существующей порой или дефектом в плазматической мембране. Или же, возможно, тесный контакт со льдом является причиной, как уже упоминалось [23, 24], деформационного искажения поверхности клетки, поскольку клетка пытается изменить свою форму в небольшом жидком внеклеточном пространстве. Такое искажение может спровоцировать возникновение дефектов в мембране, которые позволяют прорасти внеклеточным кристаллам в переохлажденную цитоплазму. Однако однозначно выделить приоритетность представленных гипотез образования внутриклеточного льда не представляется возможным.

К. Muldrew и L. E. McGann [48], изучая методом криомикроскопии образование внутриклеточного льда в клетках культуры фибробластов мыши, проанализировали возможные механизмы внутриклеточного льдообразования. Экспериментально ими не была подтверждена ни гипотеза образования

внутриклеточного льда в результате критического переохлаждения цитоплазмы, ни гипотеза прорастания внеклеточного льда в цитоплазму сквозь водные поры в мембране, ни гипотеза образования внутриклеточного льда в результате повреждения мембраны электрическим импульсом, возникающим на межфазной границе при росте внеклеточного льда. Однако эти результаты носят частный характер, и отрицать, например, вероятность повреждения мембраны в результате изменения трансмембранного потенциал клеток абсолютно нельзя. Как показало компьютерное моделирование [49], в начальном периоде льдообразования (при -1°C) быстрый рост внеклеточных кристаллов приводит к резкому возрастанию потенциала мембраны ооцитов мыши в метафазе II, достигающего в течение замораживания 90 мВ. Гиперполяризация мембраны может вызвать ориентацию диполей в самой мембране. Теоретическое прогнозирование показало [49], что для белков мембраны с дипольным моментом 300 дебай процент диполей увеличивается от 16% при 0°C (отсутствие льда) до 58% при температуре -8°C (присутствие льда) вследствие возрастания потенциала мембраны при охлаждении клеток со скоростью $120^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Теоретически также установлено, что существенное изменение потенциала мембраны не зависит от скоростей охлаждения. Образование внутриклеточного льда при высоких скоростях роста внеклеточной матрицы льда K. Muldrew и L. E. McGann [48] связывают с разрывом клеточной мембраны, вызванным значительным осмотическим потоком воды. Разрыв мембраны рассматривается ими как спонтанное нарушение симметрии, вызванное локальными флуктуациями в пределе прочности мембраны. Механизм такого структурного повреждения клеточной мембраны, как считают авторы работы [48], обусловлен возникающей при движении потока воды силы трения, величина которой может превышать предел прочности плазматической мембраны, в результате чего внеклеточный лед быстро прорастает в переохлажденную цитоплазму. Известно, что движение воды через плазматические мембраны клеток осуществляется комбинацией диффузии воды непосредственно через липидный бислой и трансмембранные поры в бислой. Существуют типы клеток, которые используют белковые водные поры, как

преимущественный путь водного транспорта (эритроциты, клетки почечных каналов и др.) [50]. Однако для большинства клеток млекопитающих транспорт воды через специально существующие для этой цели поры не является типичным. Массоперенос воды может осуществляться также через ионные каналы, в том числе и в составе гидратных оболочек ионов. Тем не менее, нельзя утверждать, что ионные каналы являются основным путем для осмотического движения воды. В работе [51] высказана гипотеза о том, что в условиях вынужденного быстрого водного потока из клетки в плазматической мембране образуются осмотические поры, обеспечивающие альтернативный путь движения воды. В модельных экспериментах было показано, что чистый липидный бислой может быть сконструирован так, что будет обладать водной проницаемостью. Как оказалось, это касается плазматических мембран целого ряда клеток млекопитающих. Было обнаружено, что изменение водной проницаемости мембран клеток млекопитающих связано с вариациями в композиционном составе мембранных липидов. Это явилось основанием утверждать, что для большинства клеток млекопитающих диффузия через липидный бислой наиболее важный способ осмотического движения воды. Предполагая, что при образовании внеклеточного льда осмотическое движение воды происходит через липидный бислой плазматической мембраны, в работе [52] было получено аналитическое выражение силы трения F_f , возникающей при столкновении молекул воды с молекулами липида:

$$F_f = \frac{kT}{D_w} J_w \Delta x,$$

где k – постоянная Больцмана (Нм/К), T – абсолютная температура (К), D_w – коэффициент диффузии воды в жидком углеводороде ($\text{м}^2/\text{с}$), J_w – поток воды (число молекул воды в секунду), Δx – ширина гидрофобного региона мембраны (м), через который перемещается водный поток. Предполагая, что площадь поверхности клетки A (м^2) постоянна в течение осмотической потери внутриклеточной воды, возникающее при этом давление на мембрану P ($\text{Н}/\text{м}^2$) может быть определено из соотношения:

$$P = \frac{kT}{AD_w} J_w \Delta x \quad (1.5)$$

Экспериментальные оценки величины потока воды через плазматическую мембрану в ответ на градиент осмотического давления в условиях внеклеточного льдообразования были получены из кинетических кривых скорости изменения объема клеток культуры фибробластов китайского хомяка V79-W, извлеченных из ткани легкого. Поскольку максимальный поток воды возникает непосредственно при фазовом переходе, когда осмотический градиент наибольший, скорость потока воды авторами была определена по начальному наклону кривой изменения клеточного объема. Максимальный поток воды при -2°C составлял $30 \text{ мкм}^3/\text{с}$ и возрастал до $38 \text{ мкм}^3/\text{с}$ при -4°C – температуре, когда криомикроскопически было зафиксировано образование внутриклеточного льда в части клеток. По мнению авторов, поскольку гидравлическая проницаемость L_p плазматических мембран, а значит и водный поток, уменьшается с понижением температуры, существует критическая температура, при которой возрастание осмотического давления, обусловленное понижением температуры нуклеации внеклеточного льда, еще компенсируется водным потоком. При дальнейшем понижении температуры внеклеточного льдообразования возникающий осмотический градиент не может быть скомпенсирован потоком воды. В связи с этим экспериментально установленное возрастание водного потока при температурах, в которых начинается образование внутриклеточного льда, авторы работы [52] связывают с осмотическим разрывом плазматической мембраны. Значение критического потока воды $38 \text{ мкм}^3/\text{с}$ было ими использовано в уравнении (1.5) для оценки критического давления на мембрану, приводящего к ее разрыву. Расчеты показали, что среднее критическое давление на мембрану, обусловленное трением при осмотическом потоке воды, превышающее предел прочности плазматических мембран фибробластов хомячка составляет $\bar{P} = 75,6 \text{ Н/м}^2$. Это критическое давление было сопоставлено с величиной градиента гидростатического давления, способного привести к разрыву мембраны. Правомочность такого сравнения абсолютно корректна поскольку, если

внутриклеточное льдообразование есть результат повреждения мембраны, то в этом случае давление, возникающее при критическом осмотическом потоке воды, должно быть сравнимо с гидростатическим давлением, вызывающим разрыв мембраны. В качестве нижнего предела градиента гидростатического давления, который мог бы прорвать плазматическую мембрану млекопитающих, было взято значение 1×10^{-4} атм, вызывающее в плоском липидном бислое разрыв диаметром 1 мм. Градиент гидростатического давления в 0,1 атм, достаточный для разрыва мембраны эритроцитов при их всасывании в микропипетку диаметром 3 мкм, был взят в качестве верхнего предела. Из уравнения (1.5) были определены нижний и верхний критические водные потоки, соответственно $5,6 \times 10^{11}$ молекул/с (или $17,1 \text{ мкм}^3/\text{с}$) и $5,6 \times 10^{14}$ молекул/с (или $1,71 \times 10^4 \text{ мкм}^3/\text{с}$), при которых возникает такое же давление, как и в случае разрыва мембраны градиентами гидростатического давления. Значение критического потока воды при температуре образования внутриклеточного льда в фибробластах хомяка, равное $38 \text{ мкм}^3/\text{с}$, несколько выше нижнего предела градиента гидростатического давления, что подтверждает вероятность разрыва мембраны таким потоком. Поскольку при понижении температуры нуклеации льда увеличивается градиент осмотического давления, значение величины потока воды, естественно, будет продолжать возрастать. Экспериментально установленное в работе [52] увеличение количества клеток, в которых возникает внутриклеточный лед, коррелирует с понижением температуры, что, по мнению авторов, подтверждает правомочность гипотезы осмотического разрыва мембраны. Эффективность модели предсказания вероятности внутриклеточной кристаллизации на основании гипотезы осмотического прорыва мембраны была проиллюстрирована К. Muldrew и L. E. McGann [52] на примере быстро охлажденных ооцитов мыши и униламеллярных липосом. Теоретически предсказанные и экспериментально установленные интервалы температур и процент клеток, в которых наблюдается внутриклеточное льдообразование при различных скоростях охлаждения липосом и ооцитов мыши, находились в хорошем соответствии. При этом среднее критическое давление на мембрану, обусловленное трением при

осмотическом потоке воды, вызывающее разрыв плазматических мембран липосом и ооцитов мыши соответственно составляет $P=27,5 \text{ Н/м}^2$ и $P=9,0 \text{ Н/м}^2$. Безусловно, реализация механизма образования внутриклеточных кристаллов льда, обусловленного разрывом плазматической мембраны значительным осмотическим потоком воды из клеток, не исключена и наиболее вероятна для клеток, имеющих низкую гидравлическую проницаемость.

Из вышепредставленной гипотезы логически вытекает, что неперенным условием замораживания клеток без образования внутриклеточного льда является высокая водная проницаемость плазматических мембран, которая для разного типа клеток определяется структурными особенностями мембран. Корреляция между высокими значениями гидравлической проницаемости L_p , способностью выдерживать большие потоки воды и, следовательно, высокие скорости замораживания эволюционно обусловлена необходимостью выполнения клетками своих специфических функций. Показано, что искусственная экспрессия аквапоринов-3 в мембранах клеток дрожжей [53], ооцитов и эмбрионов мыши [23, 54, 55], повышающая их гидравлическую проницаемость, существенно улучшает способность клеток переносить замораживание. Как известно, эмбрионы рыб плохо переносят процедуры традиционных методов криоконсервирования, включающие насыщение криопротекторами и осмотическое удаление воды в течение медленного охлаждения [56], поскольку они значительно превосходят по размерам эмбрионы млекопитающих, отличаются сложной гетерогенной структурой, большим содержанием внутриклеточной воды и характеризуются очень низкой гидравлической проницаемостью. М. Hagedorn с соавт. [56, 57], исследуя особенности внутриклеточного льдообразования в аквапорин-3-модифицированных и немодифицированных эмбрионах зебрафиш (*Danio rerio*), установили, что присутствие водных каналов не изменяет характер распространения льда в эмбрионах. В обоих случаях внутриклеточный лед в них формируется при -8°C в пределах нескольких секунд (до 30 с) после появления внеклеточного льда во внешнем растворе или же перивителлиновой жидкости

при его контакте с эмбриональной поверхностью и является смертельным. Поскольку в отсутствии внеклеточного льда 88-98% эмбрионов зебрафиш способны выдерживать высокие концентрации раствора, авторы исключают как химическое повреждение мембраны, так и ее повреждение осмотическим потоком воды [52], и считают, что именно внеклеточный лед является триггером внутриклеточного льдообразования. Для обсуждения возможного механизма внутриклеточного льдообразования авторы привлекают уже упомянутые выше гипотезы. Они считают, что кристаллы льда, вступая в контакт с поверхностью эмбрионов, вызывают их физическую деформацию, в результате которой в мембране возможно формирование разрывов и фактически сквозное прорастание внеклеточного льда через эмбрионы, что наглядно проиллюстрировано ими криомикроскопически [56]. Авторы не исключают также, что контакт внеклеточного льда с внешней поверхностью мембраны, в соответствии с представлениями М. Тонер с соавт. [45], индуцирует в ней структурные изменения, в результате которых ее внутренняя поверхность становится эффективным катализатором внутриклеточного льда. Однако степень корректности такой интерпретации механизма образования внутриклеточного льда для различных разновидностей эмбрионов и различных типов клеток в настоящий момент неизвестна [46]. Внутриклеточное льдообразование в эмбрионах зебрафиш и подобных им объектах, например, ооцитах морской звезды [58], как правило, происходит при достаточно высоких температурах (выше -10°C). Вопрос, почему ответ данной разновидности ооцитов и эмбрионов на замораживание отличается, например, от ответа ооцитов мыши, остается открытым. По-видимому, важную роль в этом, прежде всего, играют размер клеток и, возможно, различная гидравлическая проницаемость их мембран. Безусловно, искусственная экспрессия аквапоринов в плазматических мембранах клеток это перспективный путь корректировки гидравлической проницаемости при оптимизации протоколов криоконсервирования. Однако, по-видимому, этот путь может быть успешным далеко не для всех биологических объектов, имеющих низкую гидравлическую проницаемость.

При внутриклеточном льдообразовании сохранность клеток зависит как от суммарного внутриклеточного объема кристаллов льда, так и от их фактического размера. Данные литературы свидетельствуют, что внутриклеточные кристаллы вызывают необратимые повреждения клеток, если объемная часть льда в клетках составляет порядка 10^{-2} (в частности, для гепатоцитов крыс такой критический объем внутриклеточного льда лежит в пределах от 2,0% до 3,7% [59]), а критический размер внутриклеточных кристаллов льда порядка 10^{-2} мкм [60]. Х. Нан и J. К. Critser [61] разработали физико-математическую модель, позволяющую рассчитать размер внутриклеточных кристаллов льда и описать их взаимосвязь с внутриклеточной концентрацией проникающих веществ и макромолекул. Модель показывает, что увеличение концентрации макромолекул в клетках путем увеличения непроникающих внеклеточных веществ позволяет существенно снизить концентрацию проникающих в клетку веществ, обеспечивающих при замораживании внутриклеточную витрификацию. Возможность сосуществования внутриклеточной витрификации и внеклеточных кристаллов льда была подтверждена экспериментально криомикроскопически при замораживании ооцитов мыши со скоростью $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в условиях, когда внеклеточный раствор содержал 5 М этиленгликоля и от 0,3 до 0,6 М NaCl [61]. Таким образом, предложенная модель дает возможность аналитически рассчитать оптимальное соотношение концентрации непроникающих и проникающих в клетку веществ, позволяющее при наличии внеклеточного льдообразования контролировать безопасный размер внутриклеточных кристаллов льда, или же перевести внутриклеточный раствор стеклообразное состояние.

1.1.2. Механизм распространения кристаллов льда в системах контактирующих клеток

В последние годы, в связи с возросшей необходимостью создания криобанков тканей для трансплантации, фундаментальные исследования в области криобиологии все активнее касаются проблем криоконсервирования

биологических систем более высокого уровня организации [7]. Ткани представляют собой многослойную, организованную в определенном порядке конфигурацию различных типов клеток, взаимодействующих между собой. Низкотемпературное поведение клеток в тканевых структурах, кластерах клеток, культуральных монослоях количественно отличается от поведения клеток в суспензии [62]. В связи с этим при разработке методов криоконсервирования таких сложных систем должны рассматриваться дополнительные биофизические феномены, связанные с взаимодействием клетка–клетка, клетка–субстрат, геометрические эффекты, ограничение тепло – массопереноса. Основное внимание в этих исследованиях сконцентрировано на изучении механизма распространения льда во взаимосвязанной структуре клеток [63–66].

Экспериментальные данные указывают на два вида образования внутриклеточного льда в таких системах: как случайный процесс без участия соседних клеток и неслучайный процесс, где лед в одной клетке запускает образование льда в соседней. Неслучайный процесс образования внутриклеточного льда в тканевых структурах убедительно подтвердила кинетика его распространения в эпидермальной ткани луковицы, зафиксированная скоростной видеосъемкой [67]. Р. J. Asker с соавт. [68], используя статистический подход, показали, что вероятность образования внутриклеточного льда в контактирующих клетках возрастает, если одна из них уже закристаллизовалась. В литературе обсуждается два механизма неслучайного распространения внутриклеточного льда между соседними клетками. Первый – это механизм нуклеации, катализируемый плазматической мембраной [45, 67]. В этом механизме лед в закристаллизовавшейся клетке рассматривается как внеклеточный по отношению к соседней, а белки плазматической мембраны, взаимодействуя с внеклеточным льдом, действуют как катализаторы ядра внутриклеточного льдообразования. И второй механизм, предложенный W. K. Berger и B. Uhrig [69], в соответствии с которым распространение льда происходит через щели в плазматических мембранах в местах соединения клеток, так называемый коннексин – коннексин комплекс. Эти щели практически

представляют собой межклеточные поры, позволяющие клеткам обмениваться небольшими молекулами. Диаметр поры является функцией структуры щелевого контакта и чрезвычайно зависит от субкомпонентов коннексина. Он специфичен для различного типа клеток и колеблется от 8 Å для коннексина 45 до 24 Å для человеческого коннексина 37 [70]. W. K. Berger и B. Uhrík [69] экспериментально показали, что распространение льда между клетками в ткани слюнной железы насекомого существенно сдерживалось, если межклеточные соединения блокировали химическими агентами динитрофенолом и гептанолом. Кроме того, они установили, что существует температура, выше которой межклеточное распространение льда не наблюдается. Таким образом, авторы проиллюстрировали правомочность теории водной поры P. Mazur и существование критического радиуса кристалла льда способного прорасти сквозь межклеточную пору, а также механизм гетерогенной нуклеации внеклеточным льдом [26] для взаимосвязанных клеточных структур. С целью проверки гипотезы распространения внутриклеточного льда с участием щели плазматической мембран в местах межклеточных соединений P. J. Asker с соавт. [63] провели теоретическое и экспериментальное исследование температурной зависимости этого процесса. Рассматривая межклеточную пору в виде тонкого капилляра, авторы скорректировали уравнение P. Mazur, учтя влияние растворенных веществ на точку замерзания воды в поре. При условии, что жидкость находится при атмосферном давлении, вода и лед несжимаемы и молярная энтропия не зависит от температуры, они получили уравнение для депрессии точки замерзания в капилляре следующего вида:

$$\Delta T = \frac{2\gamma_1^S T_{fp}^0 \cos\theta}{d_f} + \frac{v_1^L \pi^L T_{fp}^0}{L_f}, \quad (1.6)$$

где π^L – осмотическое давление раствора, v_1^S – молярный объем льда. Разница между уравнением P. Mazur (1.4) и уравнением (1.6) состоит в том, что уравнение (1.6) учитывает молярный объем льда и осмотическое давление раствора в капилляре, в связи с чем данная зависимость более точно описывает условия межклеточного распространения льда в монослойных тканевых структурах.

Определяя депрессию точки замерзания (ΔT) воды в капилляре как функцию радиуса поры для различных контактных углов θ , авторы промоделировали условия распространения льда через щели межклеточного контакта. Оценки показали, что при радиусе поры 7,5 Å и контактном угле θ более 80° лед будет распространяться через поры, если $\Delta T \geq 10^\circ\text{C}$, а при радиусе поры 12 Å и аналогичном контактном угле – при $\Delta T \sim 5^\circ\text{C}$. Это означает, что при увеличении размера межклеточной поры и контактного угла между стенкой поры и межфазной границей “лед–вода” повышается температура, при которой реализуется данный механизм распространения льда во взаимосвязанных клеточных структурах. Однако из уравнения следует также, что существует верхний предел температуры, при которой радиус равновесного кристалла может быть достаточно велик, чтобы он мог пройти через пору. В экспериментальных исследованиях Р. J. Asker с соавт. [63] сравнили кинетику распространения льда в трех системах: конфлуентных монослоях фибробластов хомяка V-79W, в которых при стандартных условиях культивирования щели в местах межклеточных соединений отсутствуют, и конфлуентных монослоях эпителиальных клеток почки собаки Madin-Darby (MDCK), в которых в стандартной среде культивирования межклеточные щели формируются и не формируются при снижении концентрации Ca^{2+} в среде культивирования до 5 мкМ/л. Монослои клеток на покровных стеклах охлаждали в криомикроскопе со скоростью 25°С/мин до различных субнулевых температур и при изотермических условиях наблюдали кинетику межклеточного распространения льда. Анализ криомикроскопических исследований показал, что в монослоях клеток MDCK, имеющих контактные щели, образование льда в клетке при температуре ниже -3°C инициировало образование льда во всех соседних клетках и его дальнейшее распространение по монослойному полю. В то же время в монослоях клеток MDCK без контактных щелей, монослоях клеток V-79W и монослоях клеток MDCK, имеющих контактные щели, но при температуре выше -3°C , клетки могли оставаться незамерзшими, даже в том случае, когда соседняя клетка уже имела лед. Отсюда следует, что лед между клетками активно распространяется

тогда, когда имеются контактные щели и температура ниже -3°C . Эта температура находится в пределах температурного ряда теоретически предсказанного на основании уравнения понижения точки замерзания в капилляре (1.6) и может рассматриваться как критическая температура, при которой равновесный радиус кристалла находится в соответствии с размером щели межклеточного контакта и, следовательно, в монослоях клеток возможно физическое распространение внутриклеточного льда. Для количественной оценки целостности плазматических мембран при межклеточном распространении льда авторы [63] использовали технику одновременного окрашивания монослоев клеток двумя флуоресцентными красителями SYTO 13 и этидиумом бромидом (EB) перед замораживанием [71]. Контроль состояния клеток в монослоях на различных стадиях процесса замораживания показал, что целостность плазматических мембран в процессе межклеточного распространения льда с участием межклеточных щелей не нарушается. Таким образом, во взаимосвязанных клеточных структурах межклеточные щели, безусловно, облегчают распространение льда. Однако характер распространения льда в системах подобных конфлуэнтным монослоям V-79W, в которых межклеточные щели отсутствуют, указывает на существование механизмов, не требующих их участия. В этом случае не исключается механизм формирования ядра льда на внутриклеточной плазматической мембране [45, 69] и, возможно, существование принципиально других механизмов.

Р. J. Asker с соавт. [63] представили механистическую модель распространения льда через межклеточные щели, которая предсказывает существование критического переохлаждения цитоплазмы, ниже которого термодинамически возможно межклеточное распространение льда. Однако значения этих критических переохлаждений, безусловно, зависят от структуры межклеточной щели и биофизических свойств коннексина, многие из которых точно неизвестны. Кроме того, Р. J. Asker с соавт. [63] проанализировали только равновесное состояние и не пытались моделировать кинетику процесса межклеточного распространения льда. D. Irimia и J. O. M. Karlsson [64]

разработали теоретическую модель замораживания ткани, которая описывает кинетику распространения льда в двухклеточной системе. Эта модель предполагает, что внутриклеточный лед в данной клетке в пределах ткани является результатом комбинации двух независимых стохастических процессов: самопроизвольного образования внутриклеточного льда (например, благодаря внутриклеточной нуклеации или прорыва мембраны) и межклеточного распространения льда. И если последний механизм зависит от присутствия льда в соседних клетках, то первый не зависит от такого взаимодействия. Для описания кинетики внутриклеточного льдообразования в ансамбле пар клеток была получена цепная модель, предсказания которой хорошо согласуются с экспериментальными данными образования внутриклеточного льда в двухклеточной микромодели культуры клеток гепатомы человека линии HepG2, которая экспрессирует коннексин 32 и формирует межклеточные щели. Для выяснения роли межклеточных контактных щелей в распространении льда был использован известный блокатор 18β -глицирретиновая кислота (GA), который, как считают, связывает коннексин межклеточных щелей, индуцируя конформационные изменения закрывающие пору. Образцы охлаждали в криомикроскопе со скоростью $130^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -60°C . Для контроля состояния клеток в процессе замораживания использовали флуоресцентный краситель SYTO 13. Экспериментально было оценено время Δt инерционности процесса распространения льда между клетками. При наличии межклеточных контактных щелей в клетках HepG2 это время указывало на существование двух механизмов распространения: быстрого ($\Delta t < 0,3 \text{ с}$) и медленного ($0,3 \text{ с} < \Delta t < 5 \text{ с}$). Блокирование межклеточных контактных щелей приводило к увеличению времени инерционности процесса до $\Delta t < 20 \text{ с}$ и было сравнимо со временем задержки процесса нуклеации в единичных клетках. Полученные данные подтвердили активное участие межклеточных контактных щелей в распространении льда, способствуя прорастанию кристаллов льда через межклеточные поры, или формированию узла гетерогенного образования зародыша льда на одной стороне соединения посредством конформационных

изменений на противоположной стороне соединения, индуцируемых внутриклеточным льдом. Характер же распространения льда в системах, где межклеточные щели были разрушены или блокированы, подтверждает гипотезу существования механизмов межклеточного распространения льда независимых от межклеточных каналов.

Для предсказания кинетики внутриклеточного льдообразования в одномерной модельной конструкции ткани, состоящей из четырех клеток, была разработана более сложная теоретическая модель [65], которая учитывает все возможные варианты состояний контактирующих клеток (заморожена – незаморожена) в линейном массиве клеток. Экстраполируя предсказания данной модели на большие тканевые системы, состоящие из любого числа клеток, авторы продемонстрировали, что для быстрозамороженных тканей межклеточное распространение льда является доминирующим механизмом внутриклеточного льдообразования. Однако чтобы полностью понять механизмы распространения льда в сложных тканевых структурах и разрабатывать модели, оптимизирующие протоколы их замораживания, требуются исследования характера зависимости скорости межклеточного распространения льда от температуры и содержания воды в клетках. Попытка решить такую задачу для тканевых структур была предпринята А. Zhang с соавт. [72]. Авторами разработана математическая модель транспорта воды в тканевой структуре раковых клеток молочной железы, которая представлена ими в виде трехмерного кластера клеток, упакованных в четыре концентрические сферические слоя. Моделируя различные температурные условия, были изучены дегидратация клеток и внутриклеточное льдообразование в такой структуре с учетом межклеточных контактов. Анализ показал, что клетки во внутренних слоях почти не обезвоживаются, в то время как удаленные от центра клетки обезвоживаются в значительной степени. Однако корректность уравнений, описывающих процесс межклеточного распространения льда полученных А. Zhang с соавт. [72], была подвергнута критике J. O. M. Karlsson [73], указавшего на ошибочность принятых авторами ряда упрощающих предположений, в частности, о мгновенном распространении межклеточного

льда в кластерах клеток. Таким образом, для комплексного понимания низкотемпературного ответа сложных неоднородных клеточных систем, какими являются тканевые структуры, необходимы дальнейшие обстоятельные, как теоретические, так и экспериментальные исследования.

1.1.3. Роль морфологической структуры внеклеточного льда в повреждении клеток

Криомикроскопические исследования убедительно иллюстрируют, что существенную роль в повреждении клеток играет морфологическая структура внеклеточного льда, обуславливая различный характер взаимодействия “лед – клетка” [20, 21, 74]. Как указывают В. Rubinsky и М. Ikeda [75], “скорость охлаждения”, тепловой параметр обычно используемый в криобиологии, коррелирующий с жизнеспособностью клеток при замораживании, состоит из двух более фундаментальных переменных: градиента температуры на межфазной границе и скорости роста межфазной границы. Используя метод криомикроскопии направленного роста, авторы [75] показали, что изменение скорости роста межфазной границы и градиента температуры позволяет замерзнуть клеткам при той же скорости охлаждения, но с различной морфологией внеклеточного льда, особенности которой влияют на жизнеспособность клеток. В серии экспериментов J. Beckman с соавт. [76] и А. Hubel с соавт. [77] были получены аналогичные результаты: при одной и той же скорости охлаждения жизнеспособность клеток изменялась в зависимости от морфологической структуры внеклеточного льда. Подтверждением вовлечения в механизм повреждения клеток взаимодействия “лед – клетка” явились исследования с использованием антифризных белков, способных изменять морфологию внеклеточного льда без существенного изменения осмолярности раствора. В. Rubinsky и А. L. DeVries [78] замораживали эритроциты человека в растворах глицерина в присутствии и в отсутствии антифризных белков. В отсутствие антифризных белков эритроциты выдерживали замораживание, в то

же время в присутствии антифризных белков наблюдалось полное разрушение клеток. Концентрация антифризных белков в экспериментах составляла всего 0,001 Осм, но ее было достаточно, чтобы изменить морфологию льда к иглоподобным структурам размером до 10 мкм в диаметре, расположенным на расстоянии около 10 мкм. Исследования Н. Ishiguro и В. Rubinsky [30, 79] подтвердили, что морфология льда действительно может быть причиной повреждения клеток при замораживании. Они показали, что при направленной кристаллизации лед физически толкает клетки в каналы, сформированные между древоподобными кристаллами льда. В присутствии антифризных белков эритроциты деформируются иглоподобными кристаллами, которые и повреждают клетки. В присутствии глицерина кристаллы льда не вытесняют клетки, а обрастают их, т.е. глицерин изменяет способ роста кристаллов льда. Дальнейшие исследования подтвердили, что антифризные белки, присутствующие в среде замораживания, изменяя морфологию кристаллической структуры льда, индуцируют повреждение клеток [80, 81]. Способность антифризных белков влиять на морфологию внеклеточных кристаллов льда нашло свое применение в криохирургии для деструкции опухолевых тканей [29, 82]. Ранее нами методом криомикроскопии [21] было показано, что при одной и той же концентрации криопротектора в среде замораживания увеличение скорости охлаждения клеточной суспензии приводит к росту внеклеточных кристаллов льда в крайне неравновесных условиях. В результате этого гладкий равновесный фронт кристаллизации теряет устойчивость, что выражается в образовании разветвленной сети осей дендритов различных порядков, обрастающих клетки. При понижении температуры вследствие вымораживания маточного раствора увеличивается вероятность захвата клеток в полости с жидкими микрофазами, где они, как правило, повреждаются. Авторы работ [74, 83] считают, что в замкнутых включениях во льду, в которые захватываются клетки, развивается гидростатическое давление, величина которого может достигать значений порядка 10^3 атм. Экспериментально этот факт был подтвержден в работе [84] при изучении совместного действия

гидростатического давления и низкой температуры на сохранность клеток молочнокислого стрептококка *S. cremoris* T18₁₅. Было показано, что после 30 мин воздействия гидростатического давления величиной 2×10^3 атм при температуре -18°C разрушение клеток значительно больше, чем при таком же давлении при 18°C . Следует указать, что давление, как физический фактор, снижает температуру замерзания воды [85], а при давлении 2×10^3 атм образование кристаллов льда в суспензии может происходить при температуре ниже -20°C . Таким образом, гибель бактерий в данном случае была, как считают авторы, обусловлена исключительно повышенным гидростатическим давлением, а вероятность его развития в замкнутых полостях рассматривается как один из существенных факторов разрушения клеток при замораживании. Авторы работ [86–88] связывают повреждение клеток в замкнутых включениях с пластической релаксацией давлений в них, происходящей в результате движения в кристаллах льда различных несовершенств их структуры, в частности дислокаций. При выходе ансамбля дислокаций на границу раздела “лед – жидкая фаза” на поверхности раздела образуются ступеньки высотой $h = n \times b$, где n – число дислокаций в ансамбле, b – вектор Бюргерса. Оценки показывают, что среднее число дислокаций в ансамбле может колебаться в пределах от 100 до 1000 [89], а вектор Бюргерса для краевых дислокаций в базисных плоскостях кристаллов льда, имеющих гексагональную решетку, составляет порядка 10^{-7} Å [90]. Поэтому высота ступенек h может достигать десятых долей микрометра. Выходя на поверхность кристалла с околосвуковой скоростью, обусловленной достаточно большим эффективным напряжением (порядка 3 МПа), такие ступеньки, по мнению авторов [86], способны “пробивать” мембраны клеток, контактирующих с границей ледяной фазы. Особенно активно такие повреждения реализуются при концентрациях криопротектора до 10%. Инактивировать данный механизм повреждения клеток можно путем увеличения концентрации криопротекторов, когда большая часть локальных жидких включений переходит в жидкие межкристаллические прослойки, в которых избыточное давление в процессе замораживания биологических систем не возникает. При таком переходе резко

изменяется характер пластического течения замороженных образцов. В этом случае деформация замороженных образцов определяется не пластическими сдвигами внутри поликристаллических зерен льда, а скольжением относительно друг друга по разделяющим их жидкофазным прослойкам [87]. Вероятность такого механизма повреждения проиллюстрирована авторами методами тензодилатометрии и термопластической деформации на примере дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* при их замораживании в присутствии ДМСО, ПЭО-1500 и глицерина в диапазоне концентраций от 3 до 10% [88]. Скачкообразное повышение жизнеспособности клеток при достижении пороговых концентраций 5,0%, 6,0% и 7,0%, соответственно, обусловлено, как считают авторы, резким уменьшением эффективности предполагаемого механизма повреждения в связи с переходом замкнутых жидкофазных включений в сквозные жидкие прослойки [87, 88].

1.1.4. Факторы повреждения клеток в области эвтектических и субэвтектических температур

Не менее опасной зоной повреждения клеток, изученной в биологических системах относительно мало, является температурный интервал эвтектической кристаллизации. Впервые явление кристаллизации эвтектики в различных биологических растворах визуально при исследовании методом криомикроскопии морфологических структур льда проиллюстрировал В. Luyet [91]. Согласно классической фазовой диаграмме состояния в простых растворах NaCl кристаллизация остаточной смеси соль–жидкость–лед происходит при эвтектической температуре $-21,2^{\circ}\text{C}$. Однако в сложных многокомпонентных криозащитных средах, содержащих электролиты, белки, криопротекторы и другие растворенные вещества, существование такой чистой эвтектики мало вероятно. При изучении изменения фазового состояния различных водных растворов и сывороток методами ДСК и измерения электрического сопротивления было установлено, что кристаллизация эвтектического раствора,

как правило, наблюдается при его переохлаждении, в то время как плавление эвтектики происходит при температуре термодинамического равновесия системы. Криомикроскопические исследования и ДСК – термограммы также показывают, что переохлаждение эвтектического раствора ниже температуры термодинамического равновесия эвтектики является необходимым условием его кристаллизации [92]. При повторном охлаждении температура кристаллизации эвтектики не воспроизводится, даже если соблюдаются экспериментальные условия замораживания образцов, что свидетельствует о вероятностном характере этого процесса. Эвтектическая кристаллизация может быть запущена гетерогенным механизмом с использованием заранее охлажденной иглы или других катализаторов. Кроме того, она может быть инициирована в результате довольно длительной выдержки образца (более 15 мин) при температурах несколько ниже температуры термодинамического равновесия эвтектики. Указанные особенности позволяют утверждать, что кристаллизация эвтектики биологических растворов представляет собой кинетический процесс затвердевания аналогичный процессу льдообразования, в основе которого лежит классическая теория возникновения новой фазы [93–98], предполагающая нуклеацию и последующий рост кристаллов. Поскольку процесс образования критического зародыша эвтектики требует существенного переохлаждения, а дальнейший кристаллический рост эвтектики является относительно быстрым, энергия активации зародышеобразования эвтектики больше, чем энергия активации ее кристаллического роста.

Сравнивая кристаллические структуры ряда эвтектических смесей, Н. Т. Меруман [99] обнаружил, что криопротекторы, такие как глицерин и ДМСО, могут предотвращать образование эвтектики электролитов. К. Izutsu с соавт. [100], используя методы ДСК и ЯМР, также показали, что кристаллизация эвтектики в системе NaCl–вода исчезает при введении различных видов криопротекторов. В. Нап с соавт. [101] подтвердили их результат в бинарной системе NaCl–вода, а также зафиксировали исчезновение образования эвтектики в присутствии криопротекторов в многокомпонентной смеси, подобной

фосфатному буферу. Таким образом, низкая концентрация электролита в физиологическом растворе и присутствие криопротекторов делают эвтектическую кристаллизацию в течение криоконсервирования биологических объектов едва различимой или вообще исключают ее. Поскольку криопротекторы позволяют нивелировать повреждение биологических объектов, обусловленное эвтектической кристаллизацией, исследованиям этой температурной зоны практически не уделялось внимания, а важность образования эвтектики, как фактора повреждения биологических объектов при замораживании, в значительной степени была упущена. Теоретически влияние образования эвтектики на внутриклеточное льдообразование было изучено W. M. Toscano с соавт. [102]. Однако авторы рассматривали образование эвтектики в течение замораживания как термодинамически равновесный процесс и пренебрегали переохлаждением эвтектики при кристаллизации. J. Kristiansen [103] показал, что утечка флуоресцентного красителя после замораживания липосом в растворах соли до различных температур существенно увеличивалась, если происходила кристаллизация эвтектики. И хотя утечка красителя рассматривалась, как аналогия повреждения мембран, такого рода исследования не были проведены при замораживании суспензий различных типов клеток.

Используя в своих исследованиях три независимых метода ДСК, криомикроскопию и метод направленной кристаллизации, В. Нап с соавт. [92] изучили повреждение опухолевых клеток линии АТ-1 простаты крыс в результате кристаллизации эвтектики. В экспериментах две группы АТ-1 клеток были суспендированы в растворе NaCl с концентрацией 552 ± 6 мОсм/кг и заморожены в криомикроскопе со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры -25°C . При этой температуре в одной группе клеток с помощью касания края образца охлажденной азотом иглой вызывали эвтектическую кристаллизацию, в другой – эвтектическая кристаллизация не инициировалась. После экспозиции обеих групп клеток в течение 3 мин при -25°C образцы отогревали со скоростью $130^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до комнатной температуры. В случае инициирования эвтектической кристаллизации жизнеспособность АТ-1 клеток после отогрева падала по

сравнению с контролем ($94,1 \pm 2,3\%$) до $17,8 \pm 2,5\%$. При отсутствии эвтектической кристаллизации в образце жизнеспособность клеток была значительно выше и составляла $63,9 \pm 2,9\%$. Поскольку при температуре -25°C обе группы клеток подвергались воздействию одной и той же высокой концентрации электролита разницу в падении жизнеспособности клеток порядка $46,1\%$ авторы связывают с эвтектической кристаллизацией как непосредственным фактором повреждения. При исследовании методом направленной кристаллизации влияния эвтектической кристаллизации сред, имеющих различную температуру кристаллизации эвтектики, было установлено, что введение в среду культивирования клеток АТ-1 растворов, имеющих более высокую, чем NaCl, температуру эвтектической кристаллизации (KNO_3 – вода $T_{\text{эвт.}} = -2,9^{\circ}\text{C}$ или KCl – вода $T_{\text{эвт.}} = -11,1^{\circ}\text{C}$), вызывает повреждение клеток также в области более высоких температур.

Падение жизнеспособности клеток АТ-1 в эвтектической зоне представляет собой суммарный эффект, включающий как повреждение клеток высокой концентрацией раствора, так и повреждение, обусловленное эвтектической кристаллизацией. В связи с этим, эвтектическую кристаллизацию можно рассматривать как дополнительный фактор повреждения или же, как составную часть повреждения клеток “эффектами раствора”. В. Нап с соавт. [92] предполагают два возможных механизма повреждения клеток при образовании эвтектики. Известно, что даже при медленных скоростях охлаждения внеклеточная эвтектика представляет собой мелкозернистую структуру. Поскольку расстояние между кристаллическими эвтектическими структурами и клетками мало, повреждение мембраны клеток в виде разрывов может возникнуть, как считают авторы, вследствие механического воздействия этих структур при прямом контакте с клетками. Второй механизм повреждения клеток связан с кристаллизацией эвтектики во внутриклеточном пространстве. При термодинамически равновесной эвтектической концентрации основного вещества (NaCl для физиологического раствора) вследствие обезвоживания клеток такая же суммарная концентрация достигается и во внутриклеточном

пространстве. Дальнейшее понижение температуры обеспечивает достаточное переохлаждение для формирования эвтектической кристаллизации как во вне -, так и во внутриклеточном пространстве. Кроме того, при этой концентрации и температуре внутриклеточная эвтектическая кристаллизация может инициироваться распространением внеклеточной эвтектики через существующие в мембране поры или через образовавшиеся в результате механического повреждения мембраны разрывы. Но поскольку состав внутриклеточного раствора отличается от внеклеточного, эвтектика может сформироваться лишь частично, в пределах некоторой части внутриклеточного раствора, или же может инициироваться внутриклеточный лед и тогда возникает известный механизм повреждения клеток внутриклеточным льдом. Однако криомикроскопические исследования не позволяют однозначно утверждать обусловлено ли повреждение клеток образованием внутриклеточной эвтектики или внутриклеточного льда. Поэтому детальные механизмы повреждения клеток в результате эвтектической кристаллизации требуют дальнейшей проверки. Обстоятельно не изучены влияние различных эвтектических кристаллических структур на особенности повреждения клеток, возможность контроля инициации эвтектической кристаллизации, а также эффективные механизмы ингибирования ее образования. Тем не менее, предложенные механизмы позволяют дать более всестороннее физическое объяснение повреждения клеток при замораживании и расширяют представления о повреждениях “эффектами раствора”.

При криоконсервировании биологических объектов для предотвращения образования эвтектики в качестве криопротекторов используются различные смеси, включая глицерин, ДМСО, некоторые полимеры, аминокислоты и сахара [100, 104–106]. Показано, что добавление сахаров предотвращает кристаллизацию водных растворов NaCl путем образования аморфной смеси, содержащей NaCl, сахар, воду и кристаллогидраты $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Однако механизм взаимодействия между электролитом и криопротекторами на молекулярном уровне остается малопонятным. С этой целью в работе [106], используя метод ДСК и метод одновременной регистрации дифракционных пиков рентгеновских

лучей и пиков ДСК в процессе отогрева, изучено влияние гидрофобности и числа единиц сахара в моно– и олигосахаридах на образование эвтектики в тройных системах NaCl – амфифильные соединения на основе сахаров – вода или NaCl – свободные сахара – вода. В качестве криопротекторов были исследованы амфифильные производные моносахарида, дисахарида, трисахарида и два вида свободных сахаров: сахароза и раффиноза. Исследования показали, что рентгеновские дифракционные пики, зарегистрированные в замороженном состоянии в тройной системе, содержащей амфифильные производные сахара, в частности амфифильную раффинозу, относились к кристаллогидратам, имеющим гексагональную форму. Наличие экзотермического пика на ДСК–термограммах тройных систем, обусловленного девитрификацией, свидетельствовало о способности, как свободных, так и амфифильных сахаров замедлять скорость образования эвтектики и сохранять состояние стекла на этапе охлаждения. Зависимость величины депрессии точки замерзания от концентрации NaCl в тройных системах при постоянной концентрации амфифильных сахаров имела точку перегиба. Это отклонение от коллигативной закономерности, имеющей в бинарном растворе NaCl – вода линейный вид, свидетельствовало о существовании в сложной системе взаимодействия между амфифильными сахарами и NaCl. Анализ энтальпий плавления кристаллогидратов NaCl-2H₂O и эвтектики в присутствии или отсутствии амфифильных сахаров, показал, что при увеличении концентрация NaCl энтальпия плавления кристаллогидратов в обеих системах пропорционально уменьшалась. В тоже время энтальпия плавления эвтектики увеличивалась прямо пропорционально концентрации NaCl. Это позволило авторам утверждать, что между кристаллогидратами и эвтектикой в условиях их образования существует взаимосвязь, а, так как эвтектика состоит из гидратов NaCl и кристаллогидратов, образование эвтектики регулируется не молекулами NaCl, а гидратами NaCl. Было установлено, что для тройных систем, содержащих амфифильные сахара, существует критическая концентрация соли, ниже которой образование эвтектики не наблюдается, а выше ее эвтектика генерируется в таком же приращении, как и для бинарной системы. Это

указывает на способность амфифильных сахаров захватывать только определенную часть гидратов NaCl при их концентрировании после образования кристаллогидратов, и тем самым уменьшать концентрацию свободных гидратов NaCl, участвующих в формировании эвтектики. Эффективность амфифильных сахаров ингибировать образование эвтектики возрастает пропорционально концентрации амфифильных сахаров и числу единиц сахара в них. В частности, установлено, что ингибирующая способность амфифильных производных трисахарида в три раза выше амфифильных производных моносахарида. Оценки показали, что в процессе замораживания – отогрева один моль сахарной единицы производных сахара способен захватить один моль гидрата NaCl. Однако ингибирующая способность амфифильных сахаров не зависит от длины алкильной гидрофобной цепочки, а эффект структурного изомеризма сахаров относительно ингибирования образования эвтектики незначительный: нет заметной разницы ни между исследованными амфифильными моносахаридами, ни между амфифильными дисахаридами.

Установлено [106], что свободные сахара обладают практически в два раза более сильным эффектом ингибирования образования эвтектики, а также имеют большую способность формировать аморфную фазу, чем амфифильные. По мнению авторов работы [106], эти эффекты могут быть связаны с различным поведением сахаров в растворенном состоянии. Свободные сахара, не содержащие гидрофобных групп, находятся в водном растворе в виде рассеянных одиночных молекул, многочисленные гидроксильные группы которых и при концентрировании раствора имеют возможность свободно взаимодействовать с гидратами NaCl. Амфифильные сахара благодаря наличию гидрофобных групп представляют собой в водной системе однородную совокупность агрегатов амфифильных молекул, так называемых мицелл, образование которых приводит в процессе замораживания к ограниченному взаимодействию между производными сахарами и гидратами NaCl. Для амфифильной раффинозы критическая концентрация образования мицелл при комнатной температуре составляет 0,49 мМ. При достижении этой концентрации определенная часть

амфифильной раффинозы становится недоступной для гидратов NaCl, тогда как свободная раффиноза растворяется в системе без ограничения. Таким образом, для амфифильных производных сахаров критическим фактором эффективности ингибирования эвтектики в тройной системе является мицеллообразование, а разница в гидрофобности – второстепенна.

На основании полученных результатов авторы [106] рассматривают два возможных механизма ингибирования формирования эвтектики амфифильными сахарами: сохранение состояния стекла эвтектической фазы и захват гидратов NaCl сахарной частью амфифильных агрегатов на молекулярном уровне. Поскольку было обнаружено, что амфифильная раффиноза ниже -100°C содержит незамерзающую воду, которая сильно связана с ее гидрофильной частью, авторы считают, что возможный механизм ингибирования образования эвтектики связан с замещением этой незамерзающей воды гидратами NaCl. Если концентрация амфифильного сахара достаточна, чтобы захватить все гидраты NaCl, эвтектика не формируется. Отсутствие коллигативного свойства в тройных системах, свидетельствующее о существовании взаимодействия между амфифильными сахарами и NaCl в водном растворе, поддерживает представление авторов о том, что структура амфифильных сахаров могла бы захватить гидраты NaCl в процессе замораживания.

Физические изменения в замороженных растворах могут определяться даже при -80°C . При этой температуре все еще происходит медленная, но постоянная деградация молекул, несовместимая с клеточной выживаемостью. Как показано методами калориметрического и термического анализа [107] а также криомикроскопии и рентгеноструктурного анализа [6] остаточная высококонцентрированная вязкая криозащитная смесь в диапазоне температур от -100 до -120°C претерпевает переход в стекловидную фазу. В этой области температур и ниже замороженная клеточная суспензия представляет собой сложную гетерогенную систему, состоящую из кристаллов льда и стеклообразной аморфной фазы, в которой клетки представляют собой включения в матричной среде. Такая неоднородность структуры приводит к развитию целого ряда

физических явлений, представляющих определенную опасность для биологических объектов. Как правило, замораживание криобиологических систем сопровождается значительными концентрационными и температурными градиентами, которые являются причиной возникновения в твердофазной матрице внутренних термомеханических напряжений. Свойства упругости и прочности клеточной суспензии в твердой фазе, в основном, определяются свойствами фазы льда и отвердевшего криопротектора [108]. Методом акустической эмиссии был установлен высокий уровень активности процессов динамической разгрузки термомеханических напряжений, которая реализуется в твердофазной матрице и связана с деформацией и разрушением структуры льда и отвердевшего криопротектора [109, 110]. Характер этих процессов, безусловно, не может не отражаться на степени повреждения клеток. Такая связь между активными процессами динамической разгрузки напряженной твердой матрицы и образованием микро – и макроразрывов в ткани была установлена при замораживании почки [109].

В свою очередь термомеханические напряжения твердофазной матрицы сопровождаются такими физическим явлениям, как электрическая поляризация вещества, генерация импульсных электромагнитных полей [111]. В работе [112] было исследовано влияние указанных явлений на сохранность изолированных гепатоцитов крыс под защитой ДМСО в 10% конечной концентрации. Гепатоциты замораживали, погружая образцы в жидкий азот (одноэтапно), или выдерживая суспензию клеток 30 мин в спиртовой бане при -25°C и затем погружали в жидкий азот (двухэтапно). После двухэтапного замораживания сохранность клеток составляла 85% от контроля ($90 \pm 1\%$), а при одноэтапном замораживании – 28%. В обоих случаях акустическая эмиссия и электрические импульсы регистрировались в температурном диапазоне стеклования и при дальнейшем понижении температуры. Аналогичные сигналы регистрировались и в криозащитной среде при отсутствии клеток. Интенсивность и длительность импульсов акустической эмиссии, как при одноэтапном, так и двухэтапном замораживании, свидетельствовала о наличии дефектов в затвердевшей матрице в

виде трещин порядка 100 мкм и более. Однако если при одноэтапном охлаждении электрические импульсы были значительны, то при двухэтапном охлаждении они проявлялись слабо. Авторы [112] считают, что повреждение гепатоцитов в этой температурной зоне происходит за счет развития термомеханических напряжений и электрических явлений при зарождении микро – и субмикротрещин в твердофазной матрице. Указанные дефекты могут быть источниками электрических полей достаточно большой напряженности, способных вызвать разряды и электрический пробой плазматической мембраны клеток.

Деструктивное воздействие зоны стеклования в цикле замораживания – отогрева биологических объектов убедительно проиллюстрировано авторами работы [113]. Изолированные гепатоциты крыс под защитой 5,0% ДМСО подвергали многократному изменению температуры в диапазонах 77 – 223 К, 77 – 173 К, 77 – 123 К. Диапазоны температур “циклирования” подбирали с учетом температуры стеклования данной системы, которая составляла 168 К. Показано, что циклические изменения температуры в твердой фазе приводят к снижению сохранности криоконсервированных гепатоцитов, если температурный диапазон “циклирования” включал температуру стеклования. Так, при температурном циклировании в диапазоне 77 – 223 К сохранность гепатоцитов составляла $34,0 \pm 3,6\%$, в то время как “циклирование” в твердой фазе в диапазоне 77 – 123 К практически не влияло на сохранность клеток ($97,5 \pm 1,5\%$). Если же температурная зона захватывала только диапазон стеклования 77 – 173 К, сохранность составляла $89,0 \pm 2,0\%$. Таким образом, физические явления в твердофазной матрице также могут стать причиной повреждения клеток.

1.1.5. Девитрификация как фактор повреждения клеток на этапе отогрева

Этап отогрева представляет собой зеркальное отражение этапа охлаждения. В этом случае последовательность физико-химических явлений наблюдается

строго в обратном порядке: в диапазоне температур $-100^{\circ}\text{C} \dots -80^{\circ}\text{C}$ – девитрификация стекловидной матрицы; выше -60°C – начало движения молекул воды в пределах матрицы лед – растворенное вещество; в диапазоне температур -40°C и выше интенсивная рекристаллизация и плавление льда. Точные температурные диапазоны этих процессов в зависимости от состава криозащитных сред определяются из фазовых диаграмм состояния.

Особую опасность на этапе отогрева клеточных суспензии и тканей, криоконсервированных, как с образованием кристаллов льда, так и методом витрификации, представляет девитрификация вне – и внутриклеточного раствора. Процесс внутриклеточной девитрификации как возможного фактора повреждения клеток в течение отогрева был зарегистрирован методом калориметрии [114]. Внутриклеточные изменения, вызванные девитрификацией или рекристаллизацией, наблюдались методом электронной микроскопии [115] и криомикроскопии [116, 117]. Однако эти исследования носили описательный характер и не позволили получить количественные оценки кинетики формирования внутриклеточного льда или установить взаимосвязь между скоростью охлаждения и скоростью отогрева. Кинетика девитрификации в ооцитах мыши была проанализирована S. Seki с соавт. [118]. Витрификацию в клетках достигали быстрым двухэтапным охлаждением до -70°C . Затем ооциты мыши быстро отогревали от -70°C до промежуточных температур в интервале $-65^{\circ}\text{C} \dots -50^{\circ}\text{C}$, при которых выдерживали в течение 3–60 мин и фиксировали кинетику потемнения клеток, которая свидетельствовала о развитии девитрификации и последующей рекристаллизации. Это позволило определить скорость девитрификации в зависимости от температуры и вычислить энергию активации этого процесса, которая составила 27,5 ккал/моль. Было установлено также, что скорость девитрификации клеток увеличивается в 4 раза при каждом повышении температуры на 5°C . В. Jin. с соавт. [119] оценили условия, при которых девитрификация происходит в морулах мыши. Криозащитная среда (EFS10 – EFS50), в которой замораживали эмбрионы, содержала 10–50% этиленгликоля + фикол + сахарозу. При температуре -80°C все растворы EFS в

течение 3 мин оставались прозрачными, что свидетельствовало об их стекловании. Но после 60 мин растворы EFS20 и EFS30 и 24 ч EFS40 темнели, что указывало на развитие кристаллизационных процессов. Витрифицированные морулы отогревали от -80°C с различными скоростями и оценивали их сохранность в культуре. После быстрого отогрева (контроль) сохранность клеток была высока в растворах EFS30 (79–93%) и EFS40 (96–99%). После медленного отогрева сохранность уменьшалась как в растворах EFS30 (48–62%), так и в растворах EFS40 (44–64%). Для определения температурной зоны активной внутриклеточной девитрификации эмбрионы выдерживали в течение медленного отогрева при различных субнулевых температурах. Было установлено, что сохранность эмбрионов в растворах EFS30 и EFS40 при экспозиции в течение 3 мин при -80°C соответственно составляла 25 и 75%; при -60°C – 7 и 49%; при -40°C – 0 и 41%; при -20°C – 26 и 60%. Если эмбрионы экспонировали в течение 24 ч при -80°C , сохранность клеток составляла 0–14%. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что девитрификация происходит в широком температурном интервале от -80°C до -20°C , а наиболее активно – в интервале между -60°C и -40°C .

Влияние скорости отогрева на сохранность биологических объектов сильно зависит от предыстории образца: от геометрии и поверхностно-объемного отношения биологического объекта, биофизических параметров его плазматической мембраны, вида и начальной концентрации криопротектора, а также протокола охлаждения. Оптимизация скоростей отогрева, позволяющая минимизировать повреждения биологических объектов при соответствующей корреляции со скоростями охлаждения является принципиально важным в технологии криоконсервирования. Общепринято, что для предотвращения повреждений клеток на этапе отогрева, обусловленных процессом завершения кристаллизации, имеющей место на этапе охлаждения, или же зарождением и ростом кристаллической фазы в квазивитрифицированной матрице, как во вне –, так и во внутриклеточной среде, требуются большие скорости отогрева. Для некоторых смесей растворенных веществ было оценено, что для исключения

вероятности реализации этих явлений в температурной зоне около -60°C образцы должны отогреваться со скоростями выше $1200^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ [3]. Однако для таких типов клеток, как, например, эмбрионы и ооциты млекопитающих, эффективная скорость отогрева, по данным D. G. Whittingham с соавт. [120], составляет около $8^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Исследования S. P. Leibo [121] показали, что 90% сохранность эмбрионов мышей, замороженных под защитой ДМСО со скоростью $0,2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, отмечалась при скоростях отогрева около $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, и резко падала в случае отогрева со скоростью $200^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Сохранность эмбрионов замороженных со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ была в пределах от 80% до 60% при скоростях отогрева от 2 до $200^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. W. F. Rall и C. Polge [122] при замораживании эмбрионов мыши в присутствии 1,5 М глицерина установили, что сохранность клеток увеличивалась от 75 до 86%, если скорость отогрева уменьшалась от $500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. В связи с чрезвычайно небольшим коэффициентом проницаемости плазматических мембран этих клеток для молекул воды и криопротекторов их оптимальная скорость замораживания составляет не более $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Значительное обезвоживание клеток на этапе замораживания приводит к высокому внутриклеточному осмотическому давлению. Поэтому снижение сохранности при высоких скоростях отогрева ооцитов и эмбрионов может быть вызвано резким потоком воды в клетку, повреждающим мембрану [52], или лизисом, обусловленным значительной регидратацией.

Экспериментальный поиск оптимальных скоростей отогрева представляет собой трудоемкий процесс. И если рациональные методы оптимизации скоростей охлаждения, основанные на теоретических моделях повреждения клеток на этапе замораживания, позволяют довольно успешно корректировать протоколы криоконсервирования [59, 123], то разработка подобных методов оптимизации скоростей отогрева не представлялась возможной из-за отсутствия теоретических моделей ответа клеток на этот процесс. Первым шагом на пути решения данной проблемы явилась теоретическая модель внутриклеточной девитрификации J. O. M. Karlsson [124], разработанная на основе ранее развитой им с соавторами механистической модели формирования внутриклеточного льда в течение

замораживания [59, 125]. Все предшествующие теоретические исследования девитрификации не учитывали влияние обезвоживания клеток в течение охлаждения на образование внутриклеточного льда при отогреве. Так, G. Spieles с соавт. [126] изучали влияние девитрификации на эффективность хранения быстрозамороженных эритроцитов, используя клеточный гомогенат в качестве экспериментальной модели внутриклеточного содержимого. W. F. Rall и D. S. Reid [117] в исследованиях девитрификации методом калориметрии использовали тройной раствор $\text{H}_2\text{O}-\text{NaCl}-\text{Me}_2\text{SO}$, моделирующий внутриклеточное содержимое замороженных эмбрионов. Такой экспериментальный подход дает полезную информацию о процессе девитрификации при разработке технологии криоконсервирования методом витрификации, однако абсолютно не может отражать реальную картину внутриклеточной девитрификации при криоконсервировании биологических объектов с образованием внеклеточных кристаллов льда. Принципиально существенным в предложенной модели внутриклеточной девитрификации J. O. M. Karlsson [124] явилось объединение уравнений мембранно–лимитированного транспорта воды [38], классической теории нуклеации и классической теории диффузионно–лимитированного роста кристаллов [45, 93–98]. В модели девитрификации J. O. M. Karlsson [124] термодинамическая модель транспорта воды Р. Mazur [38] была использована для прогнозирования мгновенного объема клетки и состава цитозоля в течение непрерывного цикла охлаждения–отогрева в присутствии криопротектора, классическая теория зародышеобразования – для прогнозирования скорости нуклеации при девитрификации, классическая теория диффузионно–лимитированного роста – для прогнозирования результатов кинетики кристаллизации при девитрификации.

Как известно, процесс внутриклеточной кристаллизации регулируется обезвоживанием клеток при развитии внеклеточных кристаллов льда путем изменения химического состава цитозоля. Состав и температура внутриклеточного раствора определяют его термодинамическое состояние в любой момент времени, а эволюция этого состояния определяет вероятность

образования внутриклеточного льда и протяженность его развития в клетке в течение охлаждения и отогрева. На основании уравнения потери воды J. O. M. Karlsson [124] теоретически промоделировал термодинамическое состояние кератиноцитов человека насыщенных 2 М раствором глицерина, охлажденных со скоростью $20,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ от температуры 25°C до -150°C и отогретых с со скоростями 0,1, 1,0, 10, $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Численное моделирование было проведено с использованием известных из литературы специфических биофизических параметров кератиноцитов человека. Так как предполагалось, что через мембрану осуществляется только транспорт воды, состав внутриклеточного раствора был определен из начальных концентраций NaCl и глицерина и мгновенных значений объема клетки V . Анализ прогнозируемых термодинамических траекторий состояний внутриклеточного раствора кератиноцитов показал, что в цикле замораживания–оттаивания в состоянии внутриклеточного раствора наблюдается гистерезис: в начальной стадии отогрева концентрация глицерина во внутриклеточном растворе продолжает возрастать. Явление гистерезиса, как считает автор, может быть обусловлено тем, что время релаксации клетки в процессе обезвоживания гораздо больше, чем время охлаждения системы. В связи с этим при росте внеклеточных кристаллов льда возрастание концентрации глицерина во внутриклеточном растворе происходит значительно медленнее, чем во внеклеточном окружении, и поэтому цитозоль находится в неравновесном состоянии. Концентрация глицерина во внеклеточном пространстве в течение охлаждения возрастает и падает в течение отогрева, постоянно поддерживая равновесие с фазой внеклеточного льда. Концентрация же глицерина в цитозоле, возрастающая в течение охлаждения, непрерывно возрастает и в начальной стадии процесса отогрева вследствие продолжающегося обезвоживания клетки. В частности, при скорости отогрева $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ концентрация глицерина в кератиноцитах, согласно результатам численного моделирования, достигает порядка 12 М. При увеличении скоростей отогрева выраженность эффекта дегидратации в начальной стадии отогрева снижается. Анализ результатов моделирования также показал, что регидратация клеток не начинается до тех пор,

пока пространственные термодинамические траектории состояния внутриклеточного раствора не пересекут линию ликвидуса, т.е. пока внутриклеточный раствор не достигнет термодинамического равновесия с внеклеточным окружением. На основании этого феномена автор делает принципиально важное заключение о том, что фазовое превращение внутриклеточной воды регулируется только процессом обезвоживания, а не концентрационными изменениями при регидратации в течение отогрева.

Влияние транспорта воды при отогреве на кинетику внутриклеточной нуклеации и роста кристаллов льда было проиллюстрировано моделированием кинетики девитрификации в кератиноцитах и в каплях, содержащих смесь 7,9 М глицерина и 0,6 М NaCl (концентрационный состав в кератиноцитах при -150°C), отогретых со скоростями 0,1, 1,0, 10,0 100,0 $1000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Для определения количества внутриклеточных зародышей льда, радиуса внутриклеточных кристаллов и оценки кристаллизующейся части внутриклеточного объема при девитрификации была использована модель внутриклеточной нуклеации льда и последующего диффузионно–лимитированного роста внутриклеточных кристаллов при замораживании [125], а также неизотермическая модель диффузионно–лимитированного роста, разработанная D. R. MacFarlane с соавт. [127] для прогнозирования девитрификации в течение отогрева в бинарных системах. Сравнение результатов моделирования показало, что при всех скоростях отогрева процесс девитрификации в каплях постоянного объема развивается значительно активнее, чем в клетках. Разница между скоростью образования льда в клетках и в каплях существенно возрастала с уменьшением скорости отогрева, явно указывая на то, что процесс обезвоживания клетки влияет на образование внутриклеточного льда. Особенности льдообразования в клетках свидетельствовали о том, что скорость отогрева определяет механизм кинетики девитрификации. Расчеты показали, что при скорости отогрева $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ наиболее вероятное максимальное количество зародышей льда, возникающих в клетках, в 5 раз больше, чем при скорости отогрева $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, в то время как максимальная

кристаллизующаяся часть объема при скорости отогрева $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в 7 раз меньше, чем при скорости отогрева $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Из этого следует, что при скорости отогрева $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ процесс девитрификации контролируется скоростью роста зародышей льда сильнее, чем скоростью их образования. Установлено, что девитрификация в кератиноцитах в разной степени ингибируется при всех скоростях отогрева. Однако механизм ингибирования развития внутриклеточных кристаллов в области высоких скоростей отогрева и в области низких скоростей отогрева принципиально различный, о чем свидетельствует характер диффузионно–лимитированного роста кристаллов льда. Оценки показали, что максимальный радиус кристаллов в кератиноцитах в области низких скоростей отогрева возрастает при увеличении скоростей отогрева и уменьшается только при скоростях отогрева выше $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. По мнению авторов, в области низких скоростей отогрева ингибирование роста кристаллов льда обусловлено снижением коэффициента диффузии и уменьшением пересыщения в результате обезвоживания. А увеличение радиуса кристаллов при увеличении скорости отогрева связано с уменьшением времени для обезвоживания. В области высоких скоростей отогрева ($100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) уменьшение радиуса кристаллов льда обусловлено кинетическим ингибированием.

Таким образом, анализ результатов моделирования кинетики девитрификации в кератиноцитах человека позволил выявить важные ее особенности в зависимости от скоростей отогрева. Максимальная объемная фракция внутриклеточного льда при девитрификации формируется при средних скоростях отогрева около $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. При скоростях отогрева ниже этих скоростей, несмотря на то, что в этом случае может возникнуть большое количество зародышей, формирование внутриклеточного льда ингибируется, прежде всего, влиянием обезвоживания клеток на скорость роста внутриклеточных кристаллов льда. То есть скорость внутриклеточной нуклеации менее чувствительна к клеточному обезвоживанию, чем скорость роста внутриклеточных кристаллов льда. При скоростях отогрева выше средних скоростей объемная фракция внутриклеточного льда уменьшается вследствие

кинетического ингибирования процесса зародышеобразования.

Для определения взаимосвязи между скоростью отогрева и скоростью охлаждения, использованных в цикле замораживания–отогрева кератиноцитов человека, было промоделировано влияние этих двух параметров на протяженность развития в клетках внутриклеточной кристаллизации. Были рассчитаны максимальное число возникающих зародышей льда, максимальный средний радиус кристаллов льда и максимальная объемная часть внутриклеточного льда. Учитывая критические значения размера внутриклеточных кристаллов льда (10^{-2} мкм) [60] и формирующегося объема внутриклеточного льда (порядка 10^{-2}) [59], не вызывающих необратимые повреждения клеток, модель девитрификации для кератиноцитов человека устанавливает следующую связь между критическими скоростями отогрева и скоростями охлаждения. В области низких скоростей отогрева критические скорости охлаждения возрастают с уменьшением скоростей отогрева, тогда как в области высоких скоростей отогрева критические скорости охлаждения возрастают с увеличением скоростей отогрева. Очень важным во взаимосвязи скоростей охлаждения и скоростей отогрева является значимость факторов повреждения внутриклеточным льдом. Если размер внутриклеточных кристаллов является более важным фактором в механизме повреждения клеток, чем объемная часть внутриклеточного льда, критическая скорость охлаждения более чувствительна к скорости отогрева. Если же объемная часть внутриклеточного льда более существенна в повреждении клеток, чем радиус кристалла, критическая скорость охлаждения относительно независима от скорости отогрева особенно при высоких скоростях отогрева.

Возможность использования данной модели прогнозирования кинетики девитрификации для других видов клеток была проиллюстрирована J. O. M. Karlsson [124] при исследовании чувствительности наблюдаемых при отогреве кристаллизационных процессов к вариациям водной проницаемости мембраны кератиноцитов L_{∞} и энергии активации проницаемости E_a . Для значений водной проницаемости и энергии активации выше и ниже характерных для

кератиноцитов человека ($L_{\infty} = 1,60 \times 10^{-6} \text{ мПа}^{-1}\text{с}^{-1}$ и $E_a = 4,43 \times 10^4 \text{ Дж/моль}$) была рассчитана максимальная кристаллизующаяся часть объема для определенной постоянной скорости охлаждения. Результаты прогнозирования показали, что в области скоростей отогрева ниже 1°C/мин при всех вариациях значений проницаемости объемная часть внутриклеточного льда ничтожно мала. В пределах до 10°C/мин она возрастает с возрастанием скоростей отогрева, указывая на то, что образование льда при медленном отогреве регулируется обезвоживанием клетки. При скоростях отогрева выше 10°C/мин при всех вариациях проницаемости объемная часть внутриклеточного льда уменьшается. Формирование льда при этих скоростях ингибируется кинетическим фактором и практически не зависит от обезвоживания. Увеличение водной проницаемости приводит к уменьшению максимального значения кристаллизующейся части объема и к его смещению в область более высоких скоростей отогрева, т.е. расширяется интервал скоростей отогрева, при которых формирование льда регулируется обезвоживанием. Прогнозирование показало, что максимальная кристаллизующаяся часть объема более чувствительна к изменению энергии активации, чем водной проницаемости: увеличение энергии активации проницаемости всего на 20% приводит к полной кристаллизации клетки при всех скоростях отогрева ниже тех, при которых выражен кинетический эффект ингибирования кристаллизации. Следовательно, для клеток с энергией активации проницаемости намного большей, чем для кератиноцитов человека $E_a = 44,3 \text{ кДж/моль}$, формирование внутриклеточного льда в течение отогрева не будет существенно регулироваться обезвоживанием, а любая зависимость от скорости отогрева будет отражать только кинетическое ингибирование девитрификации высокими скоростями отогрева. Таким образом, численное моделирование проиллюстрировало влияние транспорта воды в течение охлаждения на последующее образование внутриклеточного льда в течение отогрева и позволило корректно предсказать, что критические скорости отогрева возрастают с увеличением скоростей охлаждения. Однако для клеток с энергией активации мембранного транспорта менее чем 50 кДж/моль девитрификация может быть

также связана с обезвоживанием клеток в течение отогрева, обуславливая смену взаимосвязи между скоростью охлаждения и критической скоростью отогрева.

Исследование чувствительности образования внутриклеточного льда в течение отогрева к вариациям в начальной концентрации глицерина показали, что при больших концентрациях криопротектора, более чем 1 М, ингибирование роста внутриклеточных кристаллов льда обезвоживанием в течение медленного отогрева существенно не зависит от исходной концентрации глицерина. Скорость отогрева необходимая для кинетического ингибирования девитрификации (область высоких скоростей отогрева) снижается при увеличении концентрации криопротектора.

Таким образом, теоретически исследуя роль обезвоживания в процессе внутриклеточной девитрификации клеточных суспензий, автору работы [124] удалось показать важность взаимосвязи транспорта воды, нуклеации льда и роста кристаллов в формировании внутриклеточного льда в течение отогрева, и установить связь между скоростью охлаждения и скоростью отогрева при определении финального состояния клеток в процессе криоконсервирования.

Модель транспорта воды при отогреве [124], прогнозирует, что в начальной стадии отогрева клетки должны уменьшаться в объеме и регидратация клеток не начинается до тех пор, пока внутриклеточный раствор не достигнет температуры несколько выше соответствующей ему температуры плавления. В литературе имеются ограниченное количество сообщений об измерениях объема клеток во время отогрева. Тем не менее, полученные J. B. Griffiths с соавт. [128] данные, свидетельствующие о том, что во время быстрого отогрева клеток овариальной ткани китайского хомячка, замороженных медленно или быстро, нет существенных изменений объема клеток ниже точки плавления среды, подтверждают результаты, прогнозируемые моделью девитрификации. G. J. Schwartz и K. R. Diller [129] методом криомикроскопии наблюдали уменьшение объема клеток дрожжей в начальной стадии отогрева после их неравновесного замораживания, что также согласуется с прогнозируемым моделью поведением клеток. Однако в этих исследованиях наблюдались также и клетки, которые

регидратировали до достижения равновесной температуры плавления. J. M. Кнох с соавт. [130], теоретически проанализировав экспериментальные данные работы [129], пришли к заключению, что регидратация клеток в течение отогрева до достижения температуры равновесного плавления могла быть обусловлена поступлением в них электролитов еще на этапе охлаждения. Поэтому чтобы оценить, достаточно ли точно предложенная модель транспорта воды описывает изменение объема клеток млекопитающих в течение отогрева, необходимо накопление экспериментальных данных по этому вопросу.

В криобиологической литературе отсутствуют обстоятельные количественные исследования внутриклеточной девитрификации в биологических объектах. Поэтому сложно сравнить представленное модельное прогнозирование с существующими экспериментальными наблюдениями этого процесса. Тем не менее, исследования свидетельствуют о том, что при умеренных скоростях охлаждения, сохранность клеток возрастает с увеличением скорости отогрева [119, 131–133]. Установлено, что критические супраоптимальные скорости охлаждения, при которых сохранность начинает падать в связи с образованием внутриклеточного льда, возрастают с увеличением скорости отогрева [134, 135]. Эти данные согласуются с результатами прогнозирования взаимосвязи между эффектом дегидратации клеток в течение охлаждения и эффектом кинетического ингибирования формирования льда в течение отогрева: быстро отогретые клетки требуют менее интенсивного обезвоживания, чтобы избежать повреждения девитрификацией. При охлаждении клеточных суспензий с супраоптимальными скоростями зависимость сохранности клеток от скорости отогрева часто связывают с рекристаллизацией внутриклеточного льда [18]. Однако какой из двух процессов, девитрификация или рекристаллизация или их комбинация, ответственны за экспериментальные результаты, может быть установлено только после разработки количественной модели рекристаллизации, учитывающей взаимосвязь между обезвоживанием клетки и ростом кристаллов [125]. В области низких скоростей отогрева обезвоживание клетки в течение процесса отогрева влияет на сопутствующие нуклеацию и рост внутриклеточных

кристаллов льда путем изменения состава цитозоля. С понижением скорости отогрева объем внутриклеточного льда и размер внутриклеточных кристаллов, прогнозируемые моделью, уменьшаются, что обусловлено увеличением времени для обезвоживания. Данные об увеличении сохранности эмбрионов мыши при снижении скоростей отогрева, приведенные выше [120–122], вполне могут служить подтверждением представленного механизма регулирования образования внутриклеточного льда при медленном отогреве. Однако при отогреве помимо образования внутриклеточного льда на сохранность клеток могут влиять и другие повреждающие факторы. Например, повреждение клеток может быть обусловлено “эффектами раствора” и осмотическим шоком при регидратации, возрастающими с уменьшением скорости отогрева вследствие увеличения времени их неблагоприятного воздействия [136]. С другой стороны, повреждение клеток в результате осмотического шока при регидратации, возрастает и с возрастанием скорости отогрева, вследствие значительного потока воды в клетку под действием осмотических сил, движение которого может индуцировать силу трения способную привести к разрыву мембраны [52]. Тот факт, что в большинстве эмпирически оптимизированных протоколах криоконсервирования используются умеренно высокие скорости отогрева, может указывать на то, что при медленных скоростях отогрева повреждающее влияние “эффектов раствора” и шок при регидратации могут превалировать над потенциальными преимуществами ингибирования девитрификации обезвоживанием клеток. Как правило эмпирические протоколы отогрева предполагают использование только одной определенной скорости отогрева. На основании результатов прогнозируемых моделью девитрификации J. O. M. Karlsson [124] предлагает использовать мультишаговые протоколы отогрева: изначально обезводить клетку при низких температурах, чтобы минимизировать повреждение при девитрификации и далее увеличить скорость отогрева, чтобы минимизировать повреждение клеток “эффектами раствора” и осмотическим шоком при регидратации. Преимущество мультишаговых протоколов, минимизирующих повреждение клеток в течение охлаждения, хорошо известно

[123, 137].

Таким образом, в работе [124] представлен абсолютно новый взгляд на способ управления процессом внутриклеточной девитрификации, важную роль в котором играет водный транспорт, а следовательно транспортные характеристики плазматических мембран клеток. Обезвоживание клеток в течение охлаждения определяет начальные условия для процесса отогрева. Как показано в работе, обезвоживание клеток в начальной стадии отогрева может непосредственно влиять на образование и рост кристаллов внутриклеточного льда. Поэтому протоколы замораживания и отогрева связаны неперенным требованием их одновременной оптимизации. Моделирование кинетики девитрификации с использованием разработанной модели J. O. M. Karlsson [124] позволяет получить очень ценную информацию для оптимизации протоколов криоконсервирования. Если повреждение клеток в цикле замораживания–оттаивания вызывается разрастанием внутриклеточных кристаллов льда до некоторых критических размеров или же формированием критического объема льда, модель девитрификации, предсказывая максимальную объемную часть внутриклеточного льда и максимальный средний радиус кристаллов как функции скоростей охлаждения и последующих скоростей отогрева, позволяет выделить неблагоприятные режимы криоконсервирования. Основное преимущество данной модели в том, что она по своей природе в значительной степени механистическая. Она содержит в себе точное описание скорости нуклеации и поэтому исключает необходимость принятия ряда допущений таких как, например, о нулевой скорости нуклеации уже существующих центров зародышеобразования [138, 139] или о постоянной скорости нуклеации [127]. Однако существенным препятствием использования представленной модели девитрификации является отсутствие данных о физико-химических свойствах переохлажденных растворов криопротекторов (вязкость, коэффициенты скорости нуклеации), а также о биофизических параметрах плазматических мембран большинства клеток.

1.1.6. Морфологические проявления повреждений биологических объектов после цикла замораживание–отогрев

Морфологические повреждения биологических объектов физическими и физико-химическими факторами в процессе замораживания–отогрева хорошо иллюстрируют криомикроскопические исследования. Одним из проявлений клеточного повреждения после цикла замораживания–отогрева мышинных и человеческих ооцитов и эмбрионов [140], клеток почек сирийского хомячка [141] и других клеток является, например, появление цитоплазматического блеббинга. После отогрева могут сохраняться искажения *zona pellucida* ооцитов и эмбрионов, обусловленные непосредственным контактом с фронтом льда [23, 24]. Образование внеклеточного льда может инициировать вне – и внутриклеточное формирование пузырьков газа, рост которых приводит к разрушению эмбрионов [140]. Считается, что при значительном обезвоживании клеток в межкристаллических каналах изменение молекулярной архитектуры липидного бислоя может стать причиной нарушения избирательной проницаемости плазматических мембран [142]. Замораживание модельных униламеллярных везикул позволило предположить, что чрезмерное обезвоживание клеток, сопровождающееся искривлением бислоев, может привести к слиянию бислоев клеток и к слиянию бислоев контактирующих клеток, что обуславливает необратимые повреждения после оттаивания [143, 144]. И хотя известно, что плазматические мембраны играют существенную роль в повреждении клеток, достаточно ясного понимания на молекулярном уровне корреляции между состоянием мембраны и вне – и внутриклеточной водой в процессе замораживания пока еще нет. Как считают авторы [145–147], повреждение мембраны вполне может быть обусловлено снижением гидратации липидов при обезвоживании клеток и вероятностью участия этой дополнительной воды в развитии внеклеточных кристаллизационных процессов.

Попытку связать морфологические проявления повреждений клеток с определенными факторами воздействия на бластоцисты мышей предприняли М.

Kasai с соавт. [148]. Клетки повреждали различными факторами, последствия которых наблюдали при возвращении в раствор сахарозы, модифицированный фосфатно-солевой буфер и после культивирования в течение 1 ч или 24 ч. Если повреждение бластомеров было вызвано внутриклеточным льдообразованием, то эмбрионы нормально сокращались в растворе сахарозы, но набухали в фосфатно-солевом буфере и разрушались при культивировании. При токсическом воздействии криопротекторов внешне эмбрионы выглядели нормальными в обоих растворах, но после 1 ч культивирования наблюдалась декомпактизация бластомеров и последующее их вырождение. Если токсичность была слишком высока, эмбрионы были относительно нормальными в фосфатно-солевом буфере, но цитоплазма была сморщена и выглядела как бы зафиксированной. После воздействия гипотонии эмбрионы выглядели нормально в фосфатно-солевом буфере, но после культивирования они сморщивались. После воздействия высокой гипертонии эмбрионы разбухали в фосфатно-солевом буфере и затем разрушались. При механическом повреждении *zona pellucida* эмбрионов имела разрывы. Если повреждение было обусловлено внеклеточным льдом, *zona pellucida* выглядела растянутой. Таким образом, в модельных исследованиях морфологически можно установить корреляцию между типом повреждения клеток и вызвавшим его фактором. Однако наблюдаемые после цикла замораживания-отогрева повреждения клеток представляют собой результат воздействия комплекса неблагоприятных факторов. Если было бы возможно однозначно идентифицировать специфические механизмы повреждения клеток, это существенно помогло бы корректировать протоколы криозащиты.

1.2. Термодинамические модели и экспериментальные методы определения транспортных характеристик плазматических мембран клеток в условиях внеклеточного льдообразования

Изменение агрегатного состояния внеклеточной среды при замораживании клеточной суспензии приводит к нарушению термодинамического равновесия

между клеткой и окружающей ее жидкой фазой. Разность химических потенциалов между вне – и внутриклеточной средой возрастает по мере вымораживания воды и концентрирования внеклеточного раствора. Поскольку любая система стремится к минимуму свободной энергии в ней стимулируются процессы, препятствующие удалению от термодинамического равновесия [149]. Разность химических потенциалов может компенсироваться либо путем оттока воды из клетки, поскольку процесс проникновения воды через избирательно проницаемую плазматическую мембрану является более быстрым, чем других растворенных веществ, либо путем внутриклеточного льдообразования. Вероятность реализации указанных механизмов достижения термодинамического равновесия в системе “клетка – жидкая фаза” зависит от скорости охлаждения. При низких скоростях охлаждения вода успевает покидать клетки в количестве необходимом для того, чтобы в каждый момент времени между клеткой и средой успевало установиться термодинамическое равновесие. В этом предельном режиме охлаждения обезвоживание является максимальным, а переохлаждение цитоплазмы и вместе с ним вероятность внутриклеточного льдообразования ничтожно малы. Напротив, высокая скорость охлаждения приводит к резкому росту переохлаждения цитоплазмы, образованию внутриклеточных кристаллов льда, одновременно снижая степень обезвоживания клеток. Таким образом, в зависимости от того является ли скорость охлаждения низкой или высокой внутриклеточная вода выходит из клеток и присоединяется к фазе внеклеточного льда или же замерзает внутриклеточно. Образование внутриклеточного льда при больших скоростях охлаждения, как правило, приводит к потере целостности плазматических мембран и развитию лизиса клеток [18]. Значительное обезвоживание и длительное воздействие концентрированных внеклеточных растворов при медленных скоростях охлаждения также губительно для клеток [10, 150]. Существование оптимальной скорости охлаждения, которая минимизирует повреждение клеток в результате действия этих двух факторов, было подтверждено экспериментально для различного типа клеток: действительно, кривая сохранности клеток как функция скорости охлаждения

носит куполообразный характер [9]. Оптимальная скорость охлаждения является функцией проницаемости плазматической мембраны клеток для молекул воды и вероятности того, что остающаяся при дегидратации клеток в зоне развития внеклеточных кристаллов внутриклеточная вода может закристаллизоваться при необходимом для этого ее переохлаждении. Отличия в транспортных характеристиках плазматических мембран различного типа клеток и в вероятности внутриклеточного льдообразования обуславливает существование различных численных значений оптимальных скоростей охлаждения.

Для оценки проницаемости плазматических мембран клеток для молекул воды L_p и криопротекторов k_p при температурах выше 0°C существует несколько методов контроля объемных параметров клеток при изменении осмолярности внеклеточной среды. К их числу относятся: определение времени лизиса клеток в гипотонических средах, которое пропорционально проницаемости плазматических мембран для молекул воды [151, 152]; измерение объемного ответа клеток электронным счетчиком Coulter [153, 154], световой микроскопией, оснащенной диффузионной камерой для смены растворов [155–157]. Численные значения коэффициентов проницаемости плазматических мембран сперматозоидов ряда млекопитающих (барана, быка, кролика, мыши, человека) для молекул воды L_p , определенные этими методами, как в отсутствии криопротекторов, так и при их наличии в среде, хорошо согласуются между собой и лежат в интервале от $0,85 \times 10^{-13}$ до $17,0 \times 10^{-13} \text{ м}^3/\text{Нс}$ ($0,5\text{--}10 \text{ мкм/мин атм}$), соответственно энергия активации E_a составляет от 12 до 60 кДж/моль ($3\text{--}14 \text{ ккал/моль}$) [158]. Коэффициент проницаемости L_p является температурозависимым параметром клеточной мембраны. В частности, для сперматозоидов человека коэффициент проницаемости L_p при температурах 22°C , 11°C и 0°C соответственно составляет $1,84 \pm 0,06 \text{ мкм/мин атм}$, $1,45 \pm 0,04 \text{ мкм/мин атм}$, $1,14 \pm 0,07 \text{ мкм/мин атм}$, энергия активации процесса транспорта воды – $3,48 \text{ ккал/моль}$ [153]. Для изолированных клеток островков поджелудочной железы золотого хомяка коэффициент проницаемости L_p при температурах 37°C , 22°C , 8°C и 0°C соответственно составляет $0,54 \pm 0,07$

мкм/мин атм, $0,25 \pm 0,03$ мкм/мин атм, $0,06 \pm 0,008$ мкм/мин атм и $0,01 \pm 0,001$ мкм/мин атм, энергия активации – 16,21 ккал/моль [159]. Гидравлическая проницаемость L_p гранулоцитов человека при температурах 30°C, 25°C и 20°C соответственно составляет 0,62 мкм/мин атм, 0,52 мкм/мин атм, и 0,43 мкм/мин атм [160]. Для сперматозоидов хряка в присутствии в среде глицерина коэффициент проницаемости L_p при 22°C и 0°C составляет соответственно 0,14 мкм/мин атм и 0,052 мкм/мин атм, энергия активации – 4 ккал/моль [161]. Для сперматозоидов мыши коэффициент проницаемости L_p падает от 10 мкм/мин атм при 37°C до 0,4 мкм/мин атм при –3°C (но в отсутствии льда) [162]. В присутствии криопротекторов значение коэффициентов проницаемости L_p уменьшается как минимум в два раза [153, 158]. Например, для сперматозоидов мыши при наличии этиленгликоля или глицерина коэффициент проницаемости L_p при 22°C падает до 0,38 мкм/мин атм по сравнению с его значением в отсутствии криопротекторов равного 1,03 мкм/мин атм [163].

Однако экстраполяция данных о коэффициентах проницаемости плазматических мембран клеток L_p и об энергии активации E_a , определенных при температурах выше 0°C, к области субнулевых температур для оценки параметров проницаемости L_{pg} в зоне формирования внеклеточных кристаллов льда и прогнозирования оптимальной скорости охлаждения оказалась безуспешной. Так, численное моделирование транспорта воды в спермиях человека при замораживании на основании вышеприведенных данных свидетельствует о том, что клетки способны обезвоживаться даже при скоростях охлаждения около 7000°C/мин. Однако экспериментально определенная оптимальная скорость для спермиев человека ниже 100°C/мин. [164–166]. Аналогичные оценки для сперматозоидов мыши и собаки показали, что прогнозируемая оптимальная скорость охлаждения составляла бы около 5000°C/мин, в то время как экспериментально определенная оптимальная скорость в зависимости от концентрации криопротектора во внеклеточной среде находится в интервале 10–40°C/мин для спермиев мыши [158, 167, 168] и 10–30°C/мин для спермиев собаки [169, 170]. Для сперматозоидов хряка

прогнозируемая оптимальная скорость охлаждения оказалась на два порядка выше (более $1000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) фактически экспериментально установленной ($30^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) [171, 172].

Причиной такого расхождения вероятнее всего является тот факт, что транспортные характеристики плазматических мембран клеток при температурах ниже 0°C при наличии внеклеточного льда существенно отличаются от таковых, определенных на основании известных данных о L_p при положительных температурах, и потому простая экстраполяция не дает ожидаемых результатов. Изменение транспортных характеристик может быть обусловлено тем, что прогрессирующее внеклеточное льдообразование приводит к резкому повышению вязкости среды, которая снижает скорость вытекания воды, тем более в присутствии криопротекторов. Как показывают оценки, если коэффициент проницаемости плазматических мембран L_{pg} при субнулевых температурах как минимум на порядок ниже, а энергия активации E_{Lp} как минимум в 2 раза выше, чем при положительных температурах, то прогнозируемая оптимальная скорость охлаждения оказывается близкой к экспериментальной [165].

Таким образом, для успешной оптимизации методов криоконсервирования клеточных суспензий крайне необходимо знание таких важных биофизических характеристик как коэффициенты проницаемости плазматической мембраны клеток для молекул воды и криопротекторов не только на этапе эквilibрации клеток в криозащитной среде, но и на этапе фазового перехода в присутствии внеклеточного льда и криопротекторов. Определение численных значений этих параметров позволяет достаточно точно, а priori предсказать наиболее вероятный диапазон оптимальных скоростей замораживания для данного типа клеток.

Для аналитического описания осмотического поведения клеток при замораживании был разработан целый ряд термодинамических моделей. Первую попытку математического описания кинетики процесса обезвоживания клеток в период кристаллизации клеточной суспензии и его связи с внутриклеточной кристаллизацией предпринял Р. Mazur [38]. При построении физико-

математической модели этого процесса автором был сделан целый ряд допущений: цитоплазма представляет собой идеальный раствор; температурные градиенты в моделируемой системе отсутствуют; площадь поверхности клетки в процессе обезвоживания остается постоянной; клеточная мембрана при охлаждении остается интактной и проницаемой только для молекул воды; процесс фазового превращения вне клеток протекает обратимо; скорость охлаждения постоянна. Помимо этого предполагалось, что вода в цитоплазме клеток по своим физико-химическим свойствам не отличается от внеклеточной воды, коэффициенты активности и диссоциации всех присутствующих в биологической суспензии веществ по обе стороны мембраны одинаковы, а сопротивление пассивному переносу или активному транспорту веществ между клеткой и окружающей средой оказывает полупроницаемая плазматическая мембрана клеток. Кроме того, считалось, что клетки ведут себя подобно идеальному осмометру, то есть объем внутриклеточной воды, и объем клетки являются линейными функциями осмолярности внеклеточной среды и подчиняются закону Вант-Гоффа. При описании кинетики обезвоживания клетки Р. Mazur использовал четыре взаимосвязанных уравнения [38, 173, 174]. Первое уравнение касается скорости потери цитоплазматической воды в зависимости от разницы химических потенциалов вне – и внутриклеточной воды, выраженной как отношение давления паров p_e / p_i , изменение которого от температуры Р. Mazur вычисляет из второго дифференциального уравнения, полученного на основании закона Рауля и зависимости Клаузиуса–Клайперона. Третье уравнение относится к скорости охлаждения клетки, В. И, наконец, четвертое – определяет зависимость коэффициента проницаемости плазматической мембраны клеток для молекул воды k от температуры. Предполагая, что V и T единственные переменные, Р. Mazur после определенных преобразований этих уравнений получил дифференциальное уравнение второго порядка (1.7), описывающее количество внутриклеточной воды V , как функцию скорости охлаждения B , коэффициента проницаемости клеточной мембраны для молекул воды k_g при температуре T_g , осмотического давления растворенных внутри клетки веществ π_2 ,

поверхностно-объемного отношения γ (A/V) и температуры T :

$$Te^{b(T_g-T)} \frac{d^2V}{dT^2} - \left[(bT+1)e^{b(T_g-T)} - \frac{ARk_g n_2 T^2}{B(V+n_2 v_1^0)V} \right] \frac{dV}{dT} = \frac{L_f A k_g}{B v_1^0} \quad (1.7)$$

Анализ модели позволил Р. Mazur [38], используя известные значения клеточных параметров (k_g , b , n_2 , γ), установить связь между скоростью охлаждения и величиной переохлаждения внутриклеточного раствора при каждой заданной температуре и сформулировать двухфакторную гипотезу криповреждения [9]. Однако аналитические оценки оптимальных скоростей охлаждения, проведенные на основании данной модели, как показано выше, оказались более высокими, чем экспериментально определенные, как вследствие приближенного характера модели, так и в силу отсутствия необходимых для расчета данных о коэффициентах проницаемости плазматических мембран клеток и их температурных зависимостей в области субнулевых температур [175]. В дальнейшем было предпринято несколько попыток [176–179] усовершенствования термодинамической модели Р. Mazur [38]. В частности, авторы работы [176] нашли аналитические решения уравнения (1.11) для ряда асимптотических значений безразмерных комбинаций, фигурирующих в нем параметров, которые хорошо согласуются с результатами численного интегрирования этого уравнения. Авторы пришли к выводу о существовании критической температуры, которая зависит от скорости охлаждения и типа клеток, замораживание ниже которой неизбежно приводит к гибели незащищенных клеток, либо в результате значительной дегидратации, либо в результате внутриклеточной кристаллизации. Модифицируя модель Р. Mazur, G. A. Mansoori [179] учитывал, в частности, возможность отклонения свойств цитоплазмы от идеального раствора. Всесторонний анализ введенных в модели G. A. Mansoori [179] уточнений показал, что к наиболее существенному отклонению от решений, полученных с помощью исходной более простой модели, может привести изменение площади поверхности плазматической мембраны в процессе обезвоживания клеток при замораживании.

Основным недостатком всех вышеприведенных термодинамических

моделей является тот факт, что все они ограничиваются описанием трансмембранных потоков при замораживании одного химического вещества – воды. Однако, как известно, криозащитные среды представляют собой многокомпонентную сбалансированную систему, включающую, в том числе, проникающие криопротекторы. Поэтому для строгого описания кинетики изменения клеточного объема в процессе замораживания необходимо учитывать сопряженный массоперенос воды и криопротекторов.

В физико-математических моделях, учитывающих особенности транспорта воды в процессе замораживания клеток при наличии внеклеточного льда и криопротекторов в среде, как и в случае описания трансмембранных потоков в области положительных температур в присутствии криопротекторов, используется подход О. Kedem и А. Katchalsky [180, 181], базирующийся на теории термодинамики необратимых процессов. Как известно, модель Kedem – Katchalsky [180, 181] аналитически описывает массоперенос воды и растворенных веществ через мембрану в ответ на градиент химического потенциала. Уравнения Kedem – Katchalsky весьма успешно были использованы при описании удаления криопротекторов из клеток [182], процесса замораживания и возникающего при этом перепада концентраций растворенных веществ на плазматической мембране [183–185]. J. O. M Karlson с соавт. [59, 125], опираясь на термодинамическую модель Kedem – Katchalsky, усовершенствовал модель Р. Mazur [38], учтя влияние криопротекторов на объемные изменения клеток в течение замораживания следующим образом:

$$\frac{dV}{dT} = -\frac{L_p A_c R T}{B V_w} \left[\ln \frac{(V_0 - V_b - n_{cpa} V_{cpa}) / V_w}{(V_0 - V_b - n_{cpa} V_{cpa}) / V_w + (\phi_s n_s + n_{cpa})} - \frac{\Delta H_f V_w \rho}{R} \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \right], \quad (1.8)$$

где V – объем клетки при текущей температуре $T(K)$ ниже $0^\circ C$; A_c – эффективная площадь мембраны для транспорта воды (принимается постоянной в процессе замораживания); V_0 и V_b изотонический и осмотически неактивный объем клетки, соответственно; R – универсальная газовая постоянная (8,314 Дж/моль К); B – постоянная скорость охлаждения (К/мин); n_{cpa} – количество молей

криопротектора в растворе; $V_{\text{сра}}$ – молярный объем криопротектора; V_w – молярный объем воды; ϕ_s – константа диссоциации соли ($=2$); n_s – количество молей соли ($n_s = C_i \times (V_0 - V_b)$), где C_i – это исходная осмолярность в клетке, 0,285 М); ΔH_f – скрытая теплота плавления льда (335 мДж/мг); ρ – плотность воды (1000 кг/м³). Коэффициент проницаемости L_p согласно [59, 125, 175] определяется как:

$$L_p = L_{pg}[\text{сра}] \exp \left[-\frac{E_{L_p}[\text{сра}]}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}} \right) \right], \quad (1.9)$$

где L_{pg} – гидравлическая проницаемость при температуре $T_{\text{ref}} = 273,15\text{K}$, E_{L_p} – энергия активации транспорта воды через мембрану или температурный коэффициент проницаемости (кДж/моль). Если криопротектор отсутствует ($n_{\text{сра}} = 0$), то уравнения (1.8) и (1.9) переходят в базовую модель транспорта воды Р. Mazur [38] и R. L. Levin с соавт. [175]. Два неизвестных параметра проницаемости клеточной мембраны $L_{pg}[\text{сра}]$ и $E_{L_p}[\text{сра}]$ в присутствии криопротектора или L_{pg} и E_{L_p} при его отсутствии определяются путем их подбора из условия максимального совпадения теоретической и экспериментально полученной кривых изменения клеточного объема в процессе замораживания.

Для одновременного моделирования сопряженных мембранных потоков, связанных со всеми этапами процесса криоконсервирования, был предложен обобщенный подход, основанный на принципах сетевой термодинамики [186]. В этой модели поведение сложных динамических систем, представляется в виде диаграммы, на которой указаны эффекты рассеивания, сохранения и соединения многочисленных потоков, одновременно проходящих через плазматическую мембрану. Для получения численных решений диаграмма ставится в соответствие с нелинейными дифференциальными уравнениями, управляющими этой системой. Данный подход авторы предлагают использовать для моделирования осмотической реакции клеток на добавление и удаление криопротекторов, осмотического стресса при замораживании и оттаивании, а

также определения коэффициентов проницаемости для воды и криопротекторов. Однако в силу своей сложности эта модель не получила широкого применения.

В условиях формирования внеклеточного льда для контроля объемных изменений клеток, трехмерную форму которых можно восстановить по площади большого сечения или по двум линейным измерениям большого диаметра, классическим методом является криомикроскопия [187, 188]. Клеточная суспензия переохлаждается до определенной температуры ниже 0°C, при которой инициируется внеклеточная нуклеация. Эта температура поддерживается постоянной на протяжении всего эксперимента. После образования льда считается, что концентрация внеклеточного растворенного вещества известна и изменяется с понижением температуры в соответствии с фазовой диаграммой. Эксперименты проводятся в условиях термодинамического равновесия при разных дискретных температурах, каждая из которых создает соответствующую разницу химических потенциалов для движения веществ через мембрану. Этим методом были измерены коэффициенты проницаемости плазматических мембран эмбрионов коровы и мыши [189, 190], кератиноцитов человека [191], моноцитов человека [192, 193], гранулоцитов человека [194, 195], дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [196], гепатоцитов крыс Sprague-Dawley [197] и человека [198].

Однако возможности криомикроскопии ограничены для клеток малых размеров и уникальной морфологии, например, сперматозоидов млекопитающих или же для клеток в составе тканей. В этом случае для контроля объемных изменений клеток разработан метод дифференциально сканирующей калориметрии (ДСК), адекватность которого была проиллюстрирована при параллельном изучении транспортных характеристик EBVT лимфоцитов человека методом криомикроскопии [199]. При анализе тканевых фрагментов метод ДСК используется в комбинации с двухступенчатым замораживанием (метод “two-step” низкотемпературной микроскопии), которое включает программное замораживание ткани в специально сконструированном устройстве на столике низкотемпературного микроскопа до определенных субнулевых температур для ее обезвоживания. Затем следует погружение ткани в жидкий

азот с последующей подготовкой срезов для микроскопического анализа и восстановления стереоизображения клеток [200–203]. При ДСК – анализе в одном и том же образце при замораживании сначала измеряется количество тепла $q_{\text{нач.}}$, выделяющееся в процессе обезвоживания осмотически активных клеток. После отогрева эти же клетки лизируют, используя большие скорости замораживания (около $200^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) до -100°C . После отогрева при повторном замораживании уже полностью лизированных клеток также измеряют количество выделяющегося тепла $q_{\text{финал.}}$, которое, естественно, ниже, поскольку клетки в первом случае были максимально обезвожены. Разница в количестве тепла $\Delta q(T) = q(T)_{\text{нач}} - q(T)_{\text{финал}}$ соотносится к воде, которая транспортируется из клеток в результате обезвоживания и участвует в формировании внеклеточного льда. Связь между изменением клеточного объема в процессе обезвоживания и выделяющимся теплом при присоединении внутриклеточной воды к фазе льда имеет вид:

$$\frac{V_i - V(T)}{V_i - V_b} = \frac{\Delta q(T)}{\Delta q}, \quad (1.10)$$

где V_i – изотонический объем клетки, V_b – осмотически неактивный объем клетки, $V(T)$ – объем клетки при заданной температуре ниже 0°C . Из уравнения (1.10) вычисляется текущий объем клетки $V(T)$ при обезвоживании.

Данные методы были использованы при определении гидравлической проницаемости L_{pg} сперматозоидов млекопитающих, в том числе мыши [158], человека [164], собаки [169], хряка [171], устрицы *Crassostrea gigas* [204], рыбы видов *Xiphophorus helleri* и *Xiphophorus maculatus* [205, 206], коня [207], фрагментов ткани печени крыс Sprague-Dawley [202, 203] и древесной лягушки *Rana sylvatica* [201, 208] ткани яичника обезьяны *Macaca mulatta* [209] и лошади [210]. Значения коэффициентов проницаемости L_{pg} в 0°C , полученные этим методом, значительно отличаются от рассчитанных в 0°C на основании данных о проницаемости в области положительных температур. Так, например, для сперматозоидов мыши в отсутствии криопротектора L_{pg} в 0°C оказалось равным $0,01 \text{ мкм}/\text{мин атм}$ [158], что более чем в 30 раз ниже измеренного Е. Е. Noiles с

соавт. (0,33 мкм/мин атм) [211]. При наличии криопротектора в суспензии сохраняется примерно такое же соотношение: L_{pg} в 0°C составляет 0,004 мкм/мин атм [158] против 0,10 мкм/мин атм измеренного M. J. Phelps с соавт. [163].

Несмотря на то, что методом ДСК можно исследовать объемные изменения клеток любой формы, он имеет целый ряд недостатков. Во-первых, требуется априорное знание геометрических параметров биологического объекта, в частности, поверхностно-объемного отношения, а также изотонического и осмотически неактивного объемов, которые должны быть получены другими методами. Во-вторых, необходимо быть твердо уверенным, что выделяющееся тепло $\Delta q(T)$ является результатом обезвоживания клеток при замораживании, поскольку оно может быть обусловлено и внутриклеточной кристаллизацией. В связи с этим требуется привлечение криомикроскопии для проведения дополнительного контроля, подтверждающего отсутствие внутриклеточной кристаллизации в исследуемых условиях замораживания. Кроме того, технические возможности ДСК не позволяют проводить эксперименты с большими скоростями охлаждения (более 40°C/мин) [199, 203]. В последнее время разработаны две новые криомикроскопические системы, позволяющие изучать как клеточные суспензии, так и тканевые фрагменты: оптический криомикроскоп, уникальная конструкция которого исключает физические ограничения по толщине образца вдоль оптической оси, и оптический дифференциально сканирующий калориметр, позволяющий одновременно регистрировать тепловыделение и криомикроскопические изображения [212].

Подводя итог анализу литературы, следует отметить следующее. Несмотря на обширный экспериментальный и теоретический объем криобиологических исследований, привлекательность представленных гипотез криоповреждения и возможной криозащиты биологических объектов, все еще остается множество открытых фундаментальных вопросов на молекулярном и биофизическом уровне, требующих дальнейшего углубленного изучения механизмов ответных реакций клеток на физико-химические явления, сопровождающие этапы криоконсервирования. Трансмембранный перенос веществ в условиях

подготовки клеток к замораживанию, замораживания и отогрева является одним из основополагающих процессов, от которого зависит успех при разработке технологий криоконсервирования. Его интенсивность определяется состоянием внеклеточной среды и лимитируется индивидуальными характеристиками плазматических мембран клеток, такими как, проницаемость для молекул воды и криопротекторов, упругие свойства. Качественное прогнозирование результатов криоконсервирования может быть получено на основании данных о транспортных характеристиках плазматических мембран клеток не только в области положительных температур, но и, что особенно важно, на этапе формирования и развития внеклеточных кристаллов льда, что требует создания адекватного и доступного алгоритма. Отсутствие обстоятельных исследований механизмов зародышеобразования и роста кристаллов льда в сложных криобиологических системах, которые определяют специфичность метода низкотемпературного консервирования, не позволяет направленно воздействовать на эти процессы, модифицируя морфологическую структуру льда, и тем самым влиять на характер массообмена “клетка–внеклеточная среда” в условиях фазового перехода.

Все вышесказанное и послужило основанием для выполнения данной работы, целью которой явилось установление механизмов зарождения и роста внеклеточных кристаллов льда в криоконсервируемых биологических системах и механизмов действия на клетки физико-химических факторов, связанных с фазовым переходом “жидкость – кристалл”.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследований

Для адекватного решения конкретных задач в работе использован спектр биологических объектов, удовлетворяющих следующим критериям: качественная визуализация клеточных реакций, специфическое морфологическое строение, размер, форма, поверхностно-объемное отношение, чувствительность формы клеток к внешнему воздействию. Такими объектами служили эритроциты взрослых доноров, эритроциты пуповинной крови человека, сперматозоиды человека, эмбрионы мышей линии СВА ранних стадий развития, гепатоциты белых лабораторных крыс, перевиваемая культура почек сирийского хомячка (ВНК-21), модель внеклеточной среды на основе раствора лиофилизированной плазмы крови человека группы 0(1).

Эритроциты взрослых доноров выделяли из цельной донорской крови группы А(II), которую получали на Харьковской областной станции переливания крови. Эритроциты пуповинной крови выделяли из цельной пуповинной крови, которую получали при нормальных родах у здоровых рожениц родильного дома №5 г. Харькова. В качестве консерванта в обоих случаях использован стандартный консервирующий раствор “Глюгицир”. Для получения эритромассы пуповинной крови и эритромассы взрослых доноров цельную кровь трехкратно отмывали от плазмы, разрушенных клеток и консерванта 0,15 М раствором NaCl путем центрифугирования проб при 3000 об/мин в течение 15 мин. Надосадок полностью удаляли [213]. Концентрацию клеток в уплотненной эритромассе контролировали, определяя гематокритное число стандартным методом [214, 215].

Сперму человека получали на базе родильного дома №5 г. Харькова

методом мастурбации в стерильные пластиковые чашки Петри или бюксы после 3–4 дней полового воздержания. Эякулят помещали для разжижения в термостат (37°C). Качественную оценку спермиев проводили по морфологическим признакам (состояние головки, тела, хвоста) и кинетическому параметру – характеру движения клеток. Концентрация спермиев в эякулятах составляла от 60 до 72 млн в 1 мл, процент подвижных клеток колебался в пределах от 55 до 71% . Оценка качества эякулята соответствовала требованиям ВОЗ [216]. В экспериментах использовано 22 сперма-дозы.

Весь вышеуказанный биологический материал был предоставлен с письменного проинформированного согласия доноров.

Эмбрионы мышей линии СВА получали методом суперовуляции [217]. С этой целью самкам проводили внутрибрюшинную инъекцию 5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) (Folligon, “Intervet”, Holland) и 7,5 МЕ человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) (Hogulon, “Intervet”, Holland) с интервалом 46-48 часов. Для получения эмбрионов самок подсаживали к самцам той же линии для осеменения. Забой самок осуществляли дислокацией шейных позвонков. Эмбрионы получали путем промывания отпрепарированных яйцеводов самок мышей физиологической средой Дюльбекко при комнатной температуре по стандартной методике [217]. Поиск и все манипуляции с яйцеклетками и эмбрионами проводили в эмбриональных стеклах под микроскопом МБС-9 при 28-кратном увеличении. В экспериментах использовали клетки нормальные согласно временным параметрам развития и морфологической оценке, включающей целостность *zona pellucida* и цитоплазматической мембраны, прозрачность цитоплазмы, правильную форму бластомеров [217, 218]. В экспериментах использовано 240 эмбрионов от 30 животных.

Гепатоциты выделяли из печени крыс неферментативным методом [219]. Изолированные гепатоциты были взвешены в среде суспендирования следующего состава: 250 мМ сахара, 5 мМ KCl, 0,4 мМ KH_2PO_4 , 0,4 мМ NaHPO_4 , 0,8 мМ MgSO_4 , 1,2 мМ CaCl_2 , 10 мМ трис HCl, 1% бычий сывороточный

альбумин (все вещества «Реахим», квалификации ”х.ч.” или ”ч.д.а.”). рН суспензии составлял 7,4. В экспериментах использовано 38 животных и проанализировано более 1500 индивидуальных клеток.

Клетки перевиваемой культуры почек сирийского хомячка суспендировали в среде Игла, содержащей 10% бычьей сыворотки. Концентрация клеток составляла $9,7 \times 10^5$ клеток в 1 мл.

Жизнеспособность гепатоцитов крыс и клеток почек сирийского хомячка оценивали по исключению суправитального красителя 0,2% трипанового синего. В среднем исходная жизнеспособность клеток составляла не менее 80%.

Экспериментальные исследования с использованием материала животного происхождения не противоречат “Общим принципам экспериментов на животных”, одобренным I-III Национальными конгрессами по биоэтике (Киев, 2001–2007 гг.) и согласуются с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985г.).

В модельных исследованиях в качестве внеклеточной среды был использован раствор лиофилизированной плазмы крови человека группы 0(I).

2.2. Методы исследования

2.2.1. *Криомикроскопия.* Особенности поведения биологических объектов на этапе кристаллизации клеточных суспензий и на этапе их отогрева, морфологические особенности формирующейся кристаллической структуры, а также механизмы зарождения и роста кристаллов льда исследовали методом криомикроскопии.

Криомикроскопия является единственным методом, который позволяет в реальном масштабе времени в широком температурном диапазоне визуально наблюдать кинетику процессов, сопровождающих замораживание – отогрев живых, не фиксированных биологических объектов (клеточные суспензии, тонкие фрагменты ткани) [20, 212, 220–223]. Анализ результатов

криомикроскопических исследований позволяет определить количественные характеристики процессов, которые происходят при замораживании биологических объектов во внеклеточной среде, а также биофизические параметры плазматических мембран клеток, экспериментально установить и теоретически обосновать оптимальные условия, обеспечивающие максимальную сохранность структуры или жизнеспособность биологического материала на всех этапах технологического процесса криоконсервирования.

На рис. 2.1 представлен общий вид криомикроскопического комплекса, созданного СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины на основе макетных образцов низкотемпературных столиков, разработанных в отделе низкотемпературного консервирования Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [20, 220, 224, 225].



Рис. 2.1. Общий вид криомикроскопического комплекса.

Криомикроскопический комплекс состоит из: криоприставки, установленной на предметном столике светового микроскопа МБИ 15–У4.2 (ЛОМО, Ленинград); блока программного управления, задающего режим охлаждения, отогрева и стабилизации температуры в рабочей камере

криоприставки; системы снабжения хладагентом; блока контроля светового потока в криоприставке; блока управления фотосъемкой. В качестве хладагента используется жидкий азот.

Технические характеристики блока программного управления позволяют осуществлять: 1) программное одно – или двухэтапное охлаждение биологического объекта, размещенного в рабочей камере криоприставки, в диапазоне температур от 37°C до –100°C со скоростями от 0,3°C/мин до 30°C/мин, 2) программный обогрев биологического объекта со скоростями от 0,3 до 10°C/мин, 3) стабилизацию температуры в рабочей камере криоприставки в диапазоне температур от 20°C до –100°C длительностью до 60 мин. Погрешность реализации заданного значения скорости охлаждения и обогрева в установившемся режиме не превышает $\pm 10\%$. Отклонение температуры стабилизации от заданного значения в установившемся режиме не превышает $\pm 2^\circ\text{C}$. Кроме того, имеется форсированный режим, позволяющий проводить охлаждение или обогрев биологического материала с максимально возможной скоростью около 50°C/мин.

На рис. 2.2 представлен общий вид криоприставки. Криоприставка имеет герметичную рабочую камеру, образованную цилиндрическим корпусом, верхней и нижней крышками, которые имеют отверстия для объектива и конденсора микроскопа. Для герметичного и подвижного ввода в рабочую камеру объектива и конденсора в крышках имеются отверстия, которые закрыты эластичными резиновыми мембранами. Внутри рабочей камеры коаксиально находится обойма с двумя дисками из высокотеплопроводного монокристалла лейкоапфира, образующих канал для прохождения паров хладагента. Хладагент, поступающий через патрубок подачи хладагента, отводится через аналогичный диаметрально расположенный патрубок. Верхний диск лейкоапфира служит предметным стеклом, на котором располагают биообъект для наблюдения. На нем же расположен датчик температуры, служащий для измерения температуры биообъекта. По периметру предметного стекла сверху расположен нагреватель в виде спирали, участвующий в цепи поддержания заданной скорости охлаждения.



Рис. 2.2. Общий вид криоприставки.

Важной технической особенностью криоприставки является возможность управления переохлаждением в ее рабочей камере, и, следовательно, переохлаждением биологического объекта с помощью предложенного нами специального устройства, представляющего собой капилляр, заполненный дистиллированной водой (патент Украины N13671 «Устройство для криомикроскопических исследований») [225]. С этой целью в предметном стекле рабочей камеры криоприставки выполнено отверстие, в котором установлен капилляр. Один конец капилляра непосредственно контактирует с биологическим объектом, а другой выведен через подающий хладагент трубопровод наружу и заканчивается наконечником, через который капилляр заполняется дистиллированной водой и герметично закрывается заглушкой. При охлаждении в момент достижения нулевой температуры вода в капилляре замерзает. Образовавшиеся кристаллики льда являются инициаторами фазового перехода в биологическом объекте. Следует указать, что предложенное нами решение управления процессом фазового перехода является уникальным. В зарубежных аналогах подобных низкотемпературных приставок к световому микроскопу [226, 227] фазовый переход вызывается струей жидкого азота, которую

направляют из пневматического насоса на периферическую область образца за пределами поля зрения, что, в принципе, может исказить скорость охлаждения объекта в рабочей камере.

Кроме этого, в конструкции криоприставки предусмотрено устройство для подвода к исследуемому биообъекту различных веществ, например криопротектора, при любой стабилизированной температуре до начала фазового перехода. Устройство представляет собой иглу, которая проходит через отверстие в корпусе криоприставки и паз в предметном стекле к биообъекту. Второй конец иглы заканчивается наконечником под медицинский шприц и закрывается заглушкой. Криоприставка крепится на предметный стол микроскопа.

Образцы клеточных суспензий в виде капли наносили на предметное стекло рабочей камеры криоприставки, покрывали покровным стеклом для исключения высыхания и получения тонкослойного препарата, позволяющего получить четкое изображение на просвет.

Кинетику процесса замораживания-отогрева и реакций биологических объектов в этих условиях регистрировали фотографически методом покадровой съемки с минимальным интервалом в 5–10 с в зоне как положительных, так и отрицательных температур в полуавтоматическом режиме, задающимся с блока управления фотосъемкой.

2.2.2. *Криомикроскопия объемных образцов.* Кинетика роста кристаллов существенно зависит от толщины кристаллизующегося слоя [228, 229]. Основной особенностью процесса формирования структуры в больших объемах является сочетание последовательной и объемной кристаллизации. При последовательной кристаллизации имеется единый приближенно плоский фронт раздела фаз, теплоотвод осуществляется через твердую фазу и собственно процесс кристаллизации протекает при меняющемся во времени переохлаждении. Объемная кристаллизация характеризуется возникновением и ростом кристаллов внутри переохлажденного образца, их формой, близкой к сферической,

теплоотводом через жидкость к фронту последовательной кристаллизации [230]. При замораживании клеточных суспензий в рабочей камере криомикроскопического комплекса в капле под покровным стеклом рост кристаллов льда происходит фактически в тонкой пленке путем последовательной кристаллизации. На практике же криоконсервирование биологических объектов осуществляется в контейнерах объемом не менее 1 мл. В связи с этим изучение механизмов роста кристаллов в криобиологических системах корректно проводить в объемных образцах.

С этой целью нами была сконструирована плоская кварцевая кювета диаметром 17,0 мм с толщиной слоя в ней 1,25 мм. Заполнение кюветы проводили всасыванием исследуемого раствора через два диаметрально расположенных патрубка, после чего их герметически закрывали. Инициирование кристаллов льда в исследуемых растворах осуществляли кратковременным погружением нижнего патрубка кюветы в жидкий азот. Такой способ существенно не влиял на процесс охлаждения жидкости в кювете, но за счет образования кристаллов льда в патрубке надежно устранял переохлаждение системы и обеспечивал начало роста кристаллов льда всегда из одного и того же места в кювете, а именно, со стороны ее соединения с патрубком. Охлаждение кюветы и стабилизацию температуры в ней осуществляли в специально изготовленном из прозрачного пластика термостате, содержащем рабочую жидкость гептан. Температуру в термостате регулировали с помощью системы “контактный термометр – реле – нагреватель” при постоянном притоке хладагента, которым служили пары жидкого азота. Стабилизация температуры обеспечивалась с точностью $\pm 0,07^{\circ}\text{C}$ в интервале температур от 0°C до -15°C и с точностью $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ в интервале температур от -15°C до -40°C .

При проведении эксперимента в термостате устанавливали необходимую отрицательную температуру для обеспечения заданного переохлаждения. Кювету заполняли исследуемым раствором, охлаждали 2–3 мин в термостате, затем извлекали, проводили инициирование льда в нижнем ее патрубке и снова помещали в термостат. Через 20–30 с, что было достаточно для выравнивания

температуры кюветы и рабочей жидкости термостата, регистрировали рост кристаллов льда во времени с использованием горизонтального длиннофокусного микроскопа МБ-2 с фотонасадкой при увеличении 32 или 56 крат. Скорость роста кристаллов льда измеряли по движению первичной оси дендрита визуально, используя шкалу окуляра микроскопа, или фотометрически в 3–4 повторях. Дисперсность образовавшейся кристаллической структуры оценивали по средней длине отрезка прямой пересекающего кристалл зерна методом случайных секущих [231]. Практически это сводилось к счету количества пересечений с гранями кристаллов линий случайного направления с известной длиной. Средний размер кристаллического зерна ℓ рассчитывали по нескольким замерам по формуле:

$$\ell = \frac{2L}{n},$$

где ℓ – средний размер кристалла, L – длина линии случайного направления, n – количество пересечений линии случайного направления с гранями кристалла. Данный метод оценки дисперсности кристаллической структуры, образующейся в водных растворах и, особенно, в концентрированных растворах, имеет систематическую ошибку из-за пренебрежения размерами участков жидкой фазы между кристаллами льда. Однако, поскольку размер этих участков по сравнению с кристаллами льда невелик, ошибку измерений можно считать незначительной и постоянной во всех экспериментах.

Ошибка результатов измерений для скорости роста составляла $\pm 4,8\%$, для дисперсности кристаллов – $\pm 7,8\%$ в доверительном интервале 0,95.

2.2.3. Физико-химическая модель для изучения механизма зародышеобразования. Изучение механизма первичного зародышеобразования в криобиологических системах осложняется тем, что непосредственное микроскопическое определение числа центров кристаллизации в клеточных суспензиях практически невозможно ввиду большой линейной скорости ($1,3 \times 10^{-2} \Delta T^2 \text{ см} \times \text{с}^{-1}$) кристаллизации воды [232]. Так, например, при температуре $-0,9^\circ\text{C}$

линейная скорость кристаллизации воды составляет 230 мм/мин, а при -7°C она возрастает на порядок и составляет 2800 мм/мин [233]. Капля диаметром 1 мм замерзает при -41°C за 0,6 с. При этом скорость или частота образования зародышей I равна $10^{12,5}$ зародышей/см³с [234]. При температуре -1°C для построения кристаллической решетки льда необходимо 4×10^6 молекул, а при температуре гомогенной нуклеации чистой воды (около -40°C) критический размер зародыша составляет 10 Å, что соответствует флуктуационному переходу в твердую фазу примерно 100 молекул воды [235]. Уменьшение критического размера зародышей при увеличении переохлаждения обусловлено уменьшением работы, затраченной на их образование, которая при температуре -10°C составляет 24×10^{-14} эрг, а при -40°C ее значение падает до 2×10^{-14} эрг [236].

При изучении термодинамических свойств воды и водно-солевых систем с целью выяснения механизма зародышеобразования льда широко используется метод микрообъемов [237], предложенный D. Turnbull [238] для металлов, – разбиение кристаллизующейся системы на капли диаметром от 10 до 100 мкм путем получения обратных эмульсий типа вода/масло [239–241]. При таком разбиении жидкости на небольшие капли частицы примеси макроскопического размера, на которых может происходить гетерогенная нуклеация, попадают лишь в некоторые из них. При охлаждении эти капли кристаллизуются раньше других, то есть при меньших переохлаждениях. Основная же масса капель достигает максимально возможного переохлаждения и, как полагают, кристаллизуется в результате гомогенного образования зародышей. В отличие от величин переохлаждения, при которых происходит гетерогенное затвердевание капель, максимальное переохлаждение хорошо воспроизводится [96, 242]. Метод позволяет исследовать собственно процесс зародышеобразования новой фазы, так как рост кристалла в изолированных каплях эмульсии идет медленнее, чем зародышеобразование [243, 244]. Строго говоря, максимальное переохлаждение однозначно не связано с частотой зарождения кристаллов (I , см⁻³с⁻¹), так как акт образования зародыша осуществляется в результате флуктуации и, следовательно, является случайным. Вероятность его осуществления за время $d\tau$

есть $IVd\tau$ – где V – объем капли. Поэтому доля капель, не замерзших к моменту времени τ , равна $\exp(-IV\tau)$, а доля замерзших капель, соответственно, равна $1-\exp(-IV\tau)$. Экспериментальная зависимость числа капель, не замерзших к моменту τ , действительно падает экспоненциально со временем, подтверждая вероятностную природу образования зародышей твердой фазы. Зная объем капель V , из экспериментальных кривых “доля замерзших капель – время” находят скорость или частоту нуклеации I [242]. Анализ кинетики кристаллизации ансамбля капель статистически эквивалентен многократному проведению опытов с одной каплей. Таким образом, использование методики малых капель и статистических методов обработки времени жизни переохлажденных капель позволяет разделить вклад в кристаллообразование гомогенного и гетерогенного механизмов зарождения кристаллов [95, 242, 245].

Для получения эмульсий в качестве дисперсионной среды используются вазелиновое, сафровое, силиконовое, касторовое масло или гептан с растворенным в них до насыщения эмульгатором (стабилизатором эмульсии). О появлении зародышей судят по кристаллизации капель, используя для регистрации этого процесса микроскопию или метод дифференциально – термического анализа.

Нами физико-химическая модель типа вода/масло была использована для изучения механизма первичного зародышеобразования во внеклеточной среде биологической суспензии. Дисперсионной средой служил гептан. Дисперсная фаза, моделирующая внеклеточную среду, представляла собой раствор лиофилизированной плазмы крови человека группы 0(1). Раствор сухой плазмы крови человека и гептан смешивали в объемном соотношении 1:1. В качестве стабилизатора эмульсионной системы был выбран стандартный фосфатидилхолин. Эмульсию получали путем механического встряхивания пробирки с указанными компонентами. Аликвоту эмульсии пробоотборником переносили в кювету, установленную в рабочей камере криомикроскопа. Микроскопически препарат представлял собой монослой изолированных капель размером 28–56 мкм (рис. 2.3). Образцы охлаждали с различными скоростями в

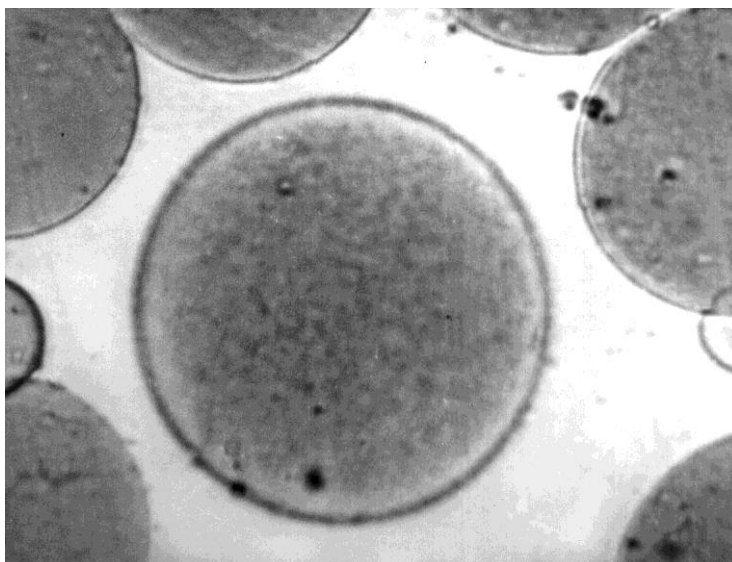


Рис. 2.3. Эмульсионная модельная система в поле зрения криомикроскопа.

Увеличение при съемке $\times 120$

интервале от $1,6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $14,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температур экспозиции в интервале от -25°C до -30°C . Кинетику процесса изотермической кристаллизации капель при заданной температуре фиксировали фотографически. Затем подсчитывали процент закристаллизовавшихся капель во времени, что являлось количественной характеристикой процесса первичного зародышеобразования.

Точность результатов, выраженная величиной стандартного отклонения, составляла $\pm 4,4\%$ в доверительном интервале 95%.

2.2.4. *Низкотемпературная рентгенография.* Структурные особенности кристаллизационных процессов в криобиологических системах в зависимости от условий их замораживания изучены методом низкотемпературной рентгенографии [246, 247]. На рис. 2.4 представлена схема низкотемпературной установки для рентгеноструктурного анализа поликристаллических образцов методом Дебая-Шеррера [248]. Источником рентгеновского $\text{CuK}_{\alpha 1}$ -излучения (длина волны $1,540051 \text{ \AA}$) 1 служил острофокусный рентгеновский аппарат УРС-0,02. Образец для исследований находился на пути прохождения первичного пучка рентгеновских лучей в рабочей камере 2, имеющей прозрачные окошки из

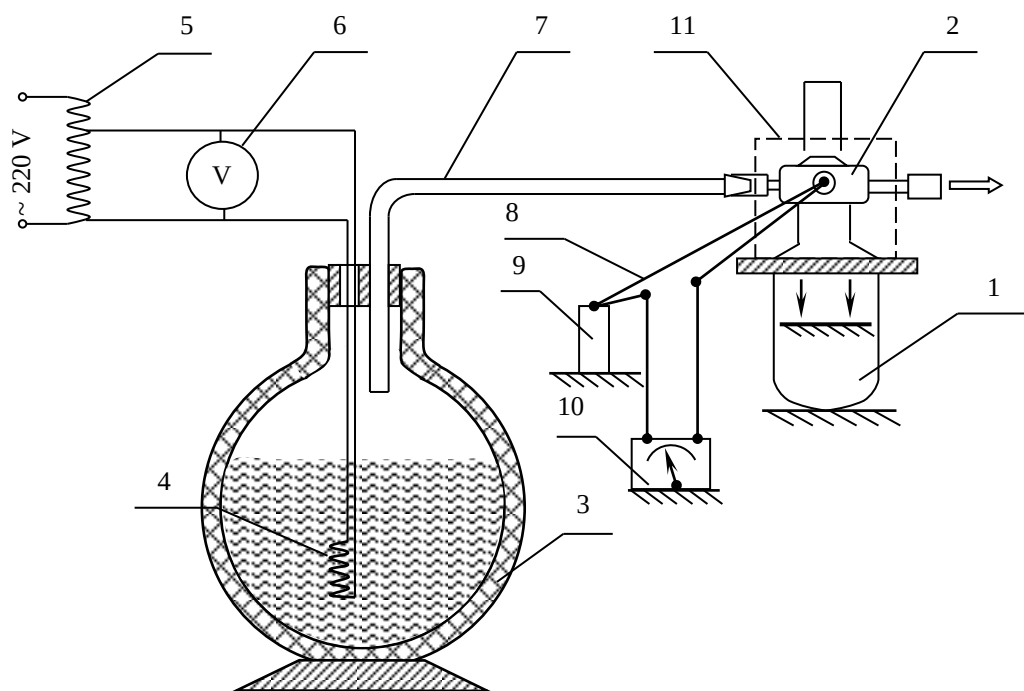


Рис. 2.4. Схема установки для низкотемпературной рентгенографии.

лавсановой пленки толщиной 15 мкм. Замораживание и поддержание заданной температуры экспозиции осуществляли обдувом камеры парами жидкого азота. Система подачи паров хладагента состояла из сосуда Дьюара 3 с расположенным внутри него нагревателем 4, позволяющим регулировать скорость и температуру охлаждения рабочей камеры путем изменения давления паров в сосуде. Различное давление в сосуде Дьюара создавали изменением силы тока, протекающего через нагреватель, с помощью блока управления подачей хладагента, в который входили трансформатор 5 и вольтметр 6. Под давлением пары жидкого азота по дьюаровской трубке 7 подавались на столик, на котором была закреплена рабочая камера. Блок контроля температуры образца представлял собой дифференциальную медь – константовую термопару 8, теплый спай которой находился в нуль-термостате 9, а другой непосредственно в рабочей камере на периферии образца. Потенциометр постоянного тока Р-308 10 служил для измерения эдс термопары компенсационным методом. Температуру определяли по данным градуировочной таблицы. Точность поддержания скорости охлаждения образцов в интервале температур $20^{\circ}\text{C} \dots -140^{\circ}\text{C}$ составляла

$\pm 2^\circ\text{C}/\text{мин.}$

Проходящие через образец рассеянные рентгеновские лучи регистрировали на плоскую высокочувствительную рентгеновскую пленку РТ-1 11 при температуре -140°C , напряжении анода рентгеновской трубки 30 кВ и токе накала лампы 400 мА. Время экспозиции составляло 35 мин. Точность поддержания температуры образца во время съемки находилась в пределах $\pm 2^\circ\text{C}$.

Условием дифракции рентгеновских лучей на атомах, регулярно размещенных в кристалле, является выполнение уравнения Вульфа-Брэгга:

$$n\lambda = 2d \sin\theta,$$

где λ – длина волны использованного рентгеновского излучения, n – целое число (аналогичное порядку дифракции от дифракционной решетки), характеризующее разность хода отраженных рентгеновских лучей соседними плоскостями, d – расстояние между плоскостями решетки в кристалле, θ – угол падения рентгеновского пучка (а также и угол рассеяния или отражения). Для поликристаллических образцов, для которых характерна хаотическая ориентация кристаллических зерен, уравнение Вульфа-Брэгга удовлетворяется для любого набора кристаллических плоскостей [249, 250]. Лучи, отраженные от плоскостей с определенными миллеровскими индексами (hkl), дают дифракционный конус с углом раствора 4θ . В результате на пленке, расположенной перпендикулярно по отношению к первичному пучку, возникают концентрические дебаевские кольца [247]. В соответствии с уравнением Вульфа-Брэгга углы θ , отвечающие различным кольцам дебаеграммы, тем больше, чем меньше расстояние между плоскостями, отражение от которых дало эти кольца. Следовательно, первое кольцо рентгенограммы соответствует наибольшему межплоскостному расстоянию, последнее кольцо – наименьшему [248].

Интерференционная картина на рентгенограмме позволяет не только качественно описать кристаллизационную структуру образца, но и количественно оценить размеры кристаллов, участвующих в рассеивании рентгеновских лучей. Поскольку при стандартных условиях съемки в отражении

рентгеновских лучей участвует один и тот же объем вещества изменение вида дебаевских колец позволяет судить об изменении числа рассеивающих кристаллитов, и следовательно, об изменении их размеров [248, 251].

Если в рассеивании первичного рентгеновского пучка участвует объем V поликристаллического образца, то общее число рефлексов регистрируемых на дебаевском кольце (hkl) равно:

$$N_{hkl} = \frac{1}{2} P \cos \theta d\theta \frac{V}{V_0},$$

где $1/2 \cos \theta d\theta$ – вероятность нахождения кристаллов в отраженном положении; $d\theta$ – угол, под которым виден фокус рентгеновской трубки из какой либо точки образца ($d\theta = a/L$, где a – размер фокуса, L – расстояние от фокуса до образца); P – фактор повторяемости, показывающий с какой частотой встречается при хаотической ориентации плоскость отражения с данными миллеровскими индексами (hkl) ; V_0 – средний объем единичного рассеивающего кристаллического зерна в облучаемом объеме V . Фактор повторяемости P имеет определенные целочисленные значения для каждой атомной плоскости данного сорта кристаллов и не зависит от θ . Для линий дебаеграммы кристаллических фаз, относящихся к ромбической сингонии, фактор повторяемости P не превышает восьми, а для всех линий дебаеграммы кристаллов триклинной сингонии он равен двум [248].

Рассеивающий объем V определяется размером облучаемой площади образца S , зависящей от параметров рентгеновского аппарата (в частности, диаметра коллиматора), и толщиной исследуемого образца h .

При получении рентгенограмм поликристаллического льда в наших исследованиях диаметр коллиматора рентгеновской трубки составлял $D = 1,5$ мм, размер облучаемой площади $S = \pi D^2/4 = 1,77$ мм², размер фокуса $a = 0,05$ мм, расстояние от фокуса до образца $L = 80$ мм, толщина образца $h = 0,8$ мм. Считали, что рассеивающая плоскость с определенными индексами (hkl) может повторяться как минимум дважды.

В табл. 2.1 приведены данные для расчета размеров кристаллических зерен

Таблица 2.1

Характеристики рентгенограммы поликристаллического льда.

Индексы отражающих плоскостей (hkl) [252, 253]	Межплоско- стное расстояние, d, Å [252, 253]	Радиус кольца, мм	Угол отражения θ, град	cosθ	Vcosθdθ ×10 ⁻⁶
100	3,92	16,0	11,75	0,9790	866
101	3,44	17,5	13,0	0,9744	866
102	2,68	22,3	17,0	0,9563	850
110	2,26	26,2	20,5	0,9367	822
103	2,065	28,3	22,5	0,9239	822
112	1,92	30,0	24,2	0,9128	812
203	1,516	35,6	31,0	0,8572	764
122	1,368	37,5	34,8	0,8211	-
300	1,30	38,3	37,0	0,7988	-
123	1,25	39,0	38,2	0,7870	-

поликристаллического льда по числу рефлексов на дифракционных кольцах рентгенограммы. Таким образом, практическая задача определения размеров кристаллов льда в образцах сводилась к количественному подсчету среднего числа рефлексов N_{hkl} на кольцах рентгенограмм, определению числа кристаллитов N_0 в единице рассеивающего объема

$$N_0 = \frac{2N_{hkl}}{V \cos \theta d \theta},$$

их среднего объема

$$V_0 = \frac{1}{N_0}$$

и среднего линейного размера

$$\ell = \left(\frac{1}{N_0} \right)^{\frac{1}{3}}$$

Дебаевские кольца поликристалла получают сплошными и тонкими, когда линейный размер кристалликов ℓ лежит в пределах 10^{-3} – 10^{-5} см. Наличие кристаллов меньших размеров ($\ell < 10^{-5}$ см) влечет за собой дифракционное расширение линии. Если же кристаллики более крупнозернистые, то есть $\ell > 10^{-3}$ см, то кольца рентгенограммы становятся зернистыми, состоящими из отдельных рефлексов [250]. Чем крупнее кристаллы, тем сильнее на фоне дебаевского кольца выделяются рефлексы от них, поскольку интенсивность отражения пропорциональна отражающему объему.

Точность определения дисперсности кристаллической структуры методом низкотемпературной рентгенографии составляет ± 2 мкм.

2.2.5. *Осмометрия.* При исследовании процессов массопереноса в системе "клетка – окружающая среда" осмотическое давление растворов реагентов контролировали криоскопическим методом с помощью микроосмометра ОМКА-Ц-01 (Медлабортехника, Одесса) в диапазоне от 0 до 400 мОсм/л с точностью ± 2 мОсм/л и диапазоне от 400 до 3000 мОсм/л с точностью ± 12 мОсм/л. Калибровку микроосмометра проводили по водным растворам хлорида натрия. Осмотическое давление растворов выше 3000 мОсм/л оценивали по экстраполированной градуировочной кривой. Кроме того, использовали известное соотношение

$$P_{\text{ам}} = \frac{t_{\text{замрз}}}{1,86} \times 22,4 \text{ атм},$$

зная, что для водных растворов с концентрацией 1 моль любого вещества точка депрессии понижается на $1,86^\circ\text{C}$, что соответствует осмотическому давлению 22,4 атм или суммарной концентрации осмотически активных веществ 1000 мОсм/л [254].

2.2.6. *Микроскопический метод определения транспортных характеристик плазматических мембран клеток.* При определении численных значений коэффициентов проницаемости плазматических мембран клеток для молекул воды L_p , L_{pg} и проникающих криопротекторов k_p , k_{pg} использовали

аналитический подход, предложенный Kedem O., Katchalsky A. [180, 181] и модифицированный в приложении к криобиологическим задачам Е.А. Гордиенко [5]. В основе метода лежит сочетание физико-математического моделирования изменения клеточного объема и экспериментального изучения осмотического поведения клеток в аналогичных условиях [255].

Осмотическое поведение клеток при комнатной температуре изучали методом световой микроскопии непосредственно на предметном столике микроскопа МБИ-15У4.2, что позволяло наблюдать реакцию клеток практически с первых минут. Для этой цели была сконструирована специальная камера, представляющая собой предметное стекло с прорезанной в нем канавкой, один конец которой входил в ячейку для клеточной суспензии. Объем ячейки, составляющий $5 \times 18 \times 0,30 \text{ мм}^3$ (27,0 мкл), создавался закрепленными на предметном стекле покровными стеклами. Суспензию клеток вносили в канавку, по которой благодаря действию капиллярных сил они попадали в ячейку. Таким же образом дозатором добавляли аликвоты исследуемых реагентов.

Исследование транспортных характеристик плазматических мембран клеток при субнулевых температурах (L_{pg} , k_{pg}) проводили методом криомикроскопии.

Количественную оценку клеточного объема как при изменении тоничности внеклеточной среды в области положительных температур, так и при замораживании-отогреве клеточных суспензий проводили методом волюмометрии [256]. Данный метод основывается на анализе двухмерной проекции микроскопического изображения клетки, которая затем экстраполируется на трехмерную проекцию для определения клеточного объема. Экспериментально методом относительного взвешивания фотоизображений определяли изменение площади большого сечения клетки во времени или при различных субнулевых температурах. Аппроксимируя форму клетки сферой и зная отношение S_t/S_0 , где S_0 – исходная площадь сечения клетки, S_t – площадь сечения в момент времени t (при температуре $T^\circ\text{C}$), определяли отношение V_t/V_0 , где V_0 – исходный объем клетки, V_t – объем клетки в момент времени t (при

температуре T°C):

$$\frac{V_t}{V_0} = \left(\frac{S_t}{S_0} \right)^3$$

При обезвоживании клеток в гипертонических растворах или же в каналах при внеклеточном льдообразовании клетки значительно деформируются, в связи с чем аппроксимация их объема простыми геометрическими формами достаточно приближенна. Однако восстановление трехмерного изображения и определение истинного объема клеток сложной формы, которую они принимают в процессе обезвоживания, остается в криомикроскопии технически не решенной проблемой [187, 257]. В связи с этим описанный подход является общепринятым и считается адекватным [188, 192, 258–261].

2.2.7. *Оптическая микроскопия.* Трансформацию эритроцитов человека как индикатор морфологического ответа клеток на действие стрессовых факторов криоконсервирования изучали методом оптической световой и фазовоконтрастной микроскопии с использованием микроскопа МБИ-15У4.2 и инвертированного микроскопа МБИ-13 (ЛОМО, Ленинград) в “живой капле”. В эксперименте каплю крови и исследуемого реагента смешивали на предметном стекле непосредственно на столике микроскопа, что позволяло контролировать развитие трансформации эритроцитов с первых минут реакции. Для избежания высыхания и равномерного распределения клеток препарат закрывали покровным стеклом. Толщина препарата составляла 10–15 мкм. При этом эритроциты находились во взвешенном состоянии, что позволяло фиксировать различные проекции клетки. Кинетику трансформации эритроцитов регистрировали с использованием фото- и киносъемки в режиме покадровой съемки с интервалами между кадрами 3 с, что позволяло наблюдать реакцию максимум через 2–2,5 с после ее начала. В морфологической оценке особенностей формы и поверхностной архитектоники клеток использовали традиционную классификацию эритроцитов человека и животных [262–265].

Количественный анализ соотношения различных морфологических форм эритроцитов проводили путем обработки фотоизображений и выражали в процентах.

2.2.8. *Определение коэффициента перераспределения веществ в системе “клетка-среда” методом ^1H -ЯМР-спектроскопии.* Особенности перераспределения гипертонических растворов неэлектролитов ряда Н-спиртов в системе “клетка-среда” были исследованы методом ^1H -ЯМР-спектроскопии на спектрометре “Tesla BS 597A”(Чехословакия) с рабочей частотой 100 МГц для протонов. Использование спектроскопии ЯМР для количественного анализа основано на том, что интегральная интенсивность сигнала вещества в спектре ЯМР пропорциональна числу резонирующих ядер, что позволяет использовать ее как меру концентрации вещества в растворе [266, 267].

Методика приготовления образцов для ^1H -ЯМР исследований состояла в следующем. Гипертонический (30%) раствор неэлектролита по каплям при постоянном перемешивании добавляли к отмытой суспензии эритроцитов человека в соотношении 1:1 (объем/объем). Для установления термодинамического равновесия в системе смесь выдерживали в термостате 20-30 мин при 25°C. Затем эритроциты отделяли от межклеточной жидкости, центрифугируя суспензию при 1200g в течение 10 мин.

Характеристикой перераспределения неэлектролитов в системе “клетка-среда” служил коэффициент распределения Q равный отношению концентрации вещества в клетке к его концентрации во внеклеточной среде. Коэффициент распределения Q вычисляли из соотношения площадей сигналов углеводородных групп неэлектролита $S_{\text{вещ}}^*$ и сигнала гидроксильных групп $S_{\text{вод}}^*$, образованного протонами воды и гидроксильными протонами неэлектролита.

Методика определения значений Q была следующей. Из ^1H -ЯМР спектров плотной суспензии эритроцитов и надосадка при помощи встроенного в спектрометр интегратора вычисляли площади под сигналами углеводородных

групп исследуемого вещества ($S_{\text{вещ}}^*$) и воды ($S_{\text{вод}}^*$). Ошибка вычисления площадей не превышала 10%. Для учета вклада ОН^- групп неэлектролита из общего сигнала воды и ОН^- групп вычитали величину $A = S_{\text{вещ}}^* / k$:

$$S_{\text{вод}} = S_{\text{вод}}^* - A = S_{\text{вод}}^* - S_{\text{вещ}}^* / k,$$

где k – константа, характеризующая соотношение групп ОН^- и протонов в молекуле вещества, равная для этанола 5, для 1,2-пропандиола – 3, для глицерина – 5/3, для ПЭГ-400 – 18, для ПЭГ-600 – 24, для ПЭГ-1500 – 68. Истинную концентрацию вещества внутри или вне клетки $S_{\text{вещ}}$ определяли как $S_{\text{вещ}} = S_{\text{вещ}}^* + A$. Величину K определяли как отношение:

$$K = S_{\text{вещ}} / S_{\text{вод}}.$$

Отношение значения величины K в плотной суспензии эритроцитов ($K_{\text{эр.}}$) к соответствующему значению величины K в надосадке ($K_{\text{над}}$) и есть коэффициент распределения Q :

$$Q = K_{\text{эр.}} / K_{\text{над}}, \quad (2.1)$$

Поскольку плотная суспензия эритроцитов, полученная после экспозиции клеток с неэлектролитами, включала в себя помимо эритроцитов некоторое количество внеклеточной жидкости, в формулу (2.1) была внесена поправка на остаточный объем внеклеточной жидкости. Этот объем оценивали измерением гематокрита в осадке клеток, полученном после центрифугирования эритроцитов, суспендированных в растворах неэлектролитов. Гематокритное число измеряли по стандартной методике центрифугирования образцов в тонком капилляре на центрифуге МГЦ-8. Таким образом, величину K в эритроmasse определяли по формуле:

$$K_{\text{эр.}}^{\text{расч}} = \frac{100 K_{\text{эр}}^{\text{изм}} - V_{\text{ост}} K_{\text{над}}^{\text{изм}} / 100}{100 - V_{\text{ост}}},$$

где $K_{\text{эр}}^{\text{изм}}$ – экспериментальное значение величины $K_{\text{эр.}}$; $K_{\text{над}}^{\text{изм}}$ – экспериментальное значение величины $K_{\text{над}}$ в надосадочной жидкости; $V_{\text{ост}}$ –

поправка на остаточный объем внеклеточной жидкости в плотной суспензии клеток.

Разрешение в спектрах надосадочной жидкости при вращении ампулы с образцом в датчике (20 об/с) составляло 2–3 Гц, в спектрах плотной суспензии клеток – 2–6 Гц.

2.2.9. *Спектрофотометрия.* Контроль уровня свободного гемоглобина при изучении явления гипертонического криогемолиза, а также накопления красителя альцианового синего при исследовании состояния поверхности эритроцитов после воздействия умеренной гипертонии проводили методом спектрофотометрии на спектрофотометре СФ-26. Супернатанты для фотометрирования получали центрифугированием образцов в течение 15 мин при 3000 об/мин. Концентрацию свободного гемоглобина в супернатантах выражали в мг% или в процентах по отношению к 100% гемолизу. Для построения градуировочной кривой уплотненную эритромассу с гематокритом 0,99 полностью гемолизировали, подвергая ее троекратному циклу замораживания-отогрева. Из полученного гемолизата соответствующим разведением готовили растворы с известной концентрацией гемоглобина в них (мг%). При этом учитывали, что гематокрит цельной пуповинной крови составляет $66,20 \pm 1,23\%$, а содержание общего гемоглобина – 21,0–25,0 г%. Таким образом, в уплотненной эритромассе пуповинной крови содержание гемоглобина составляет около 32 г%. Образцы фотометрировали в области 410 нм (полоса Соре, соответствующая характеристическому поглощению гемоглобина), помещая в канал сравнения спектрофотометра соответствующие растворы, не содержащие клеток.

Оптическую плотность образцов измеряли в диапазоне 0,2 – 0,8, в котором точность измерений составляла 2%.

2.2.10. *Оценка состояния внешних примембранных слоев эритроцитов человека (гликокаликса) методом прижизненной окраски альциановым синим.* Альциановый синий (АС) – катионный, водорастворимый, высокомолекулярный

краситель (м.в. 1300-1382) фталоцианиновой группы, содержащий до четырех групп изотиоурония, обуславливающих его растворимость [268]. Альциановый синий традиционно используется в гистологических и электронномикроскопических исследованиях для идентификации гликопротеинов и мукополисахаридов в фиксированных тканях, в частности для выявления их на поверхности клеток [268–270]. Считается [269], что химизм окрашивания альциановым синим связан с образованием ковалентных связей молекул красителя с кислотными группами кислых мукополисахаридов посредством изотиоуроновых групп.

Авторы работ [271, 272] разработали методику прижизненной окраски альциановым синим клеточных суспензий и убедительно доказали ее адекватность для оценки состояния внешних примембранных слоев (ВПМС), гликокаликса, на примере клеток асцитных опухолей (гепатомы Зайделя), поверхность которых содержит значительное количество гликопротеинов и мукополисахаридов, образующих хорошо выраженный гликокаликс. Ими показано, что в отличие от витальных красителей бирюзового прямого светопрочного (БПС) и трипанового синего (ТС), альциановый синий не окрашивает цитоплазму и ядро клеток, поврежденных после длительной окраски (до 60 мин) и даже мертвых клеток, убитых высокими дозами ультрафиолетовых лучей, повышенной температурой или трипсином. Авторы [271, 272] считают, что поскольку и у интактных, и у поврежденных, и у мертвых клеток асцитной гепатомы Зайделя АС окрашивает только самую поверхность, область ВПМС, а степень сорбции АС гликокаликсом пропорциональна содержанию в нем белков и углеводов, этот метод можно использовать для выявления гликокаликса.

Данная методика была модифицирована и успешно применена при изучении механизма действия коротковолнового ультрафиолетового излучения на эритроциты [273] и лимфоциты человека [274, 275], в связи с применением в клинической практике экстракорпорального ультрафиолетового облучения при лечении различных заболеваний. Как показали авторы работы [273], метод прижизненной оценки ВПМС позволяет количественно выявлять изменения

гликокаликса эритроцитов только при их незначительном повреждении, сопровождающимся увеличением гемолиза в образце не более чем на 30%.

Описанный выше методический подход был применен нами при изучении состояния внешних примембранных слоев эритроцитов человека после воздействия на клетки гипертонических растворов NaCl, не вызывающих грубых повреждений мембраны, приводящих к массовому гемолизу. В экспериментах после гипертонического воздействия в суспензию клеток в соотношении 1:1 (по объему) добавляли приготовленный на физиологическом растворе 0,01% раствор АС. Время окрашивания клеток составляло 10 мин, не считая времени центрифугирования проб при 3000 об/мин в течение 15 мин для получения супернатантов. Степень повреждения гликокаликса эритроцитов человека оценивали по интенсивности сорбции альцианового синего клетками. Интенсивность сорбции АС определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности красителя в супернатантах после гипертонического воздействия и окрашивания клеток (так называемый метод "косвенного" определения) в области 617 нм, соответствующей максимальному поглощению АС. Для контроля уровня гемолиза при фотометрировании супернатантов оптическую плотность одновременно измеряли также в области 410–420 нм (полоса Соре), соответствующей характерному поглощению гемоглобина. Концентрацию свободного гемоглобина в мг% и АС в % определяли по градуировочным кривым. Мерой сорбции АС клеточной поверхностью служил коэффициент распределения красителя между клеткой и средой, который определяли по изменению концентрации свободного АС в суспензии клеток. Расчет количества АС сорбированного одной клеткой проводили по формуле:

$$Q = \frac{C_0 - C}{nV},$$

где n – количество клеток в 1 мл, V – объем окрашиваемой суспензии (последний составлял 5 мл, что определялось емкостью кювет спектрофотометра СФ-26), C_0 – концентрация АС в исходной смеси до окрашивания клеток, C – концентрация АС в супернатанте после воздействия на клетки реагентов.

2.2.11. *Охлаждение образцов больших объемов.* При изучении явления криогемолиза эритроцитов пуповинной крови образцы объемом 10 мл охлаждали в пластиковых контейнерах в камере программного замораживателя УОП – 6, разработанного СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины. Комплекс состоит из камеры замораживания, блока программного управления процессом замораживания и отогрева, блока контроля выполнения заданной программы. Погрешность реализации заданного значения средней скорости охлаждения и отогрева в установившемся режиме не превышала $\pm 20\%$.

2.3. Химические реагенты

В качестве криозащитных веществ, а также реагентов, воздействующих на биологические объекты, использованы представители различных классов соединений:

1. Оксиды: диметилсульфоксид (ДМСО), фирмы «ДиаэМ», Россия, "х.ч." или «Реахим», "х.ч."
2. Полиэтиленоксиды (полиэтиленгликоли (ПЭО, ПЭГ)) м.м. 400, 600, 1500, 3000 фирмы «Merck», ФРГ, "х.ч." или «Реахим», "х.ч."
3. Одноатомный спирт: этанол, «Реахим», "х.ч."
4. Многоатомные спирты:
глицерин, «Реахим», "х.ч.";
оксиэтилированный глицерин (оксиэтилированная производная глицерина (ОЭГ, $n=5$)), синтезирован и идентифицирован в ИПКиК НАНУ;
этиленгликоль (ЭГ), фирмы «Sigma», США, "х.ч." или «Реахим», "х.ч.";
- 1,2 - пропандиол (1,2-ПД), «Реахим», "х.ч."
5. Представитель полимерных пирролидонов: поливинилпирролидон (ПВП) м.м. 12000, фирмы «Merck», ФРГ, "х.ч."
6. Соли:
хлористый натрий, «Реахим», "х.ч.", "ч.д.а."
7. Углеводы:

сахароза, «Реахим», ”х.ч.”, ”ч.д.а.”

8. Полимерные и мономерные поверхностно – активные вещества (ПАВ):

гидролизированный полиакрилонитрил, поливиниловый спирт, полиакриламид, полиоксиацетиленсорбитоллаурат, карбоксиметилцеллюлоза, алкилоамид ОС-20, СВ-33, ОП-10, тетрамон, триамон, гексаметафосфат натрия, «Реахим», “х.ч.”

9. Прижизненные красители:

трипановый синий (ТС) м.м. 960.82, фирмы «Chemapol», Чехословакия; высокомолекулярный краситель фталоцианиновой группы Alcian Blue 8GS м.м. 1300, фирмы «Serva», США.

10. Амфифильные соединения: хлорпромазин м.м. 355,3, фирмы ”Serva”, 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат м.м. 307,4 и додецил- β ,D-мальтозид м.м. 510,6, фирмы “Calbiochem”, децилсульфат натрия м.м. 260,0, НИИПАВ квалификации ”х.ч.”, ”ч.д.а.”

2.4. Методы анализа и статистической обработки результатов

При обработке экспериментальных результатов использован метод многофакторного регрессионного анализа [276–279]. Статистическую достоверность результатов оценивали методом Стьюдента-Фишера [280]. В расчетах использован пакет компьютерного статистического анализа данных программы Excel-2003.

Материалы раздела 2 опубликованы в работах [224, 225, 256]

РАЗДЕЛ 3

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАРОДЫШЕОБРАЗОВАНИЯ И РОСТА КРИСТАЛЛОВ ЛЬДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ РАСТВОРАХ

Осуществление фазового перехода “вода-лед” является главной особенностью метода низкотемпературного консервирования биологических объектов. Однако, в криобиологии, как правило, изучаются лишь последствия тех физико-химических явлений, которые обусловлены образованием и ростом кристаллов льда. Выяснению механизмов возникновения зародышей новой фазы и их дальнейшего роста уделяется недостаточное внимание, хотя общепризнано, что морфология кристаллической структуры льда коррелирует с жизнеспособностью клеток [20, 21, 74, 76–79]. Основными кинетическими параметрами, которыми количественно характеризуется процесс кристаллизации, являются линейная скорость кристаллизации v , то есть скорость продвижения фронта кристаллизации со временем, и число центров кристаллизации I_c , отражающее скорость возникновения зародышей новой фазы за единицу времени в единице объема. Указанные параметры являются функцией температуры и определяют дисперсность кристаллической структуры.

В задачу исследований данного раздела входило установление механизмов зарождения, роста кристаллов льда и формирования внеклеточной морфологической структуры льда различной дисперсности, а также изучение влияния криопротекторов и режимов замораживания на особенности протекания кристаллизационных процессов в модельных биологических растворах.

3.1. Механизм внеклеточной нуклеации льда

Фазовый переход “вода-лед” представляет собой сложный

взаимосвязанный многостадийный процесс, который схематически может быть представлен следующим образом (рис. 3.1).

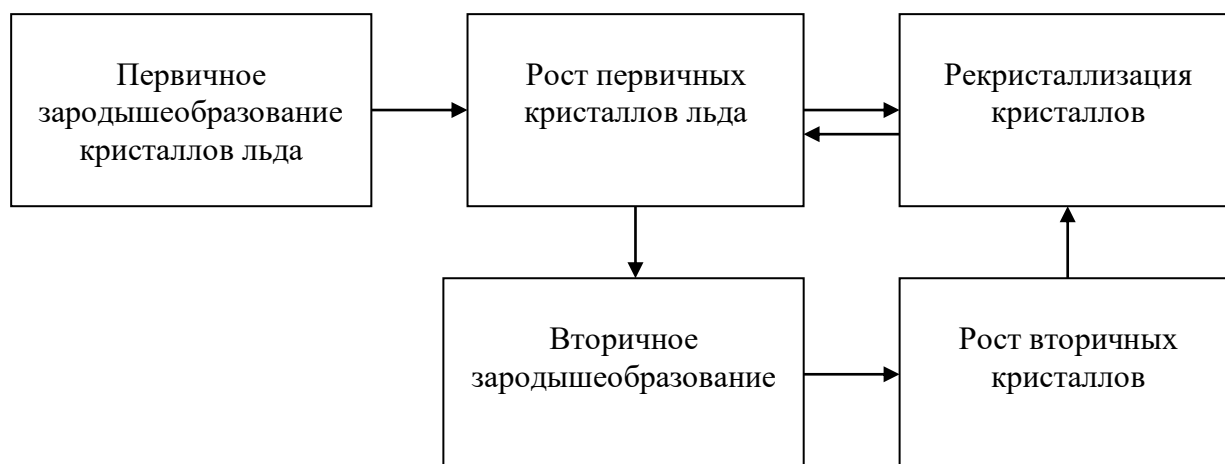


Рис. 3.1. Обобщенная схема кинетических процессов фазового превращения.

Стадия первичного зародышеобразования предусматривает возникновение зародышей кристаллической фазы в жидкой среде, еще не содержащей кристаллов. Эта стадия может реализоваться тремя механизмами: гомогенным или флуктуационным – за счет случайного соединения ионов, атомов, молекул в кристаллические зародыши (гомогенная нуклеация), гетерогенным – за счет образования зародышей на поверхности частиц нерастворимой твердой примеси в результате полимолекулярной адсорбции частиц кристаллизующего вещества – (гетерогенная нуклеация), гетерофазным – за счет образования зародышей на аморфной поверхности раздела фаз жидкость–газ, жидкость–жидкость, жидкость–твердое тело (гетерофазная нуклеация) [27, 233].

Возможность гомогенного зарождения кристаллов льда в клетках крови и в суспензиях дрожжевых клеток была показана D. H. Rasmussen с соавт. [281] при изучении первичного зародышеобразования методом мелких капель. Эмульсионная система в их исследованиях имела размер капель до 10 мкм, что обеспечивало минимальное содержание внеклеточной среды и исключало вероятность инициирования внутриклеточного льда внеклеточным. Методом дифференциального термического анализа была определена температура

гомогенного зародышеобразования в суспензиях дрожжевых клеток при различных концентрациях полиэтиленгликоля с молекулярным весом 4000 (ПЭГ-4000).

Аналогичный подход был использован в работах [282, 283] для исследования кинетики кристаллизации переохлажденных капель крови. Авторами был разработан статистический метод определения числа центров кристаллизации посредством подсчета замерзших и незамерзших капель крови в модельной системе. Исходя из вида определенной экспериментально функции распределения капель крови по размерам и теорий гомогенного и гетерогенного зародышеобразования, им удалось получить аналитические выражения для кинетических характеристик процесса изотермической кристаллизации переохлажденных капель и определить скорость образования центров кристаллизации в единице объема при различных переохлаждениях. Однако анализ полученных экспериментальных данных не позволил установить, какой механизм зарождения кристаллов льда является наиболее вероятным.

Нами механизм внеклеточной нуклеации льда исследован в модельной эмульсионной системе, в которой аналогом внеклеточной среды служил раствор лиофилизированной плазмы крови человека [284]. Экспериментально методом криомикроскопии было изучено влияние на кинетику процесса кристаллизации капель эмульсии двух факторов: скорости охлаждения и величины переохлаждения. В первом случае модельную систему охлаждали с различными скоростями (14,5; 12,0; 8,7; 3,9; 1,6°C/мин) до одной и той же температуры экспозиции (–25°C). Во втором случае модельную систему охлаждали с постоянной скоростью (4,6°C/мин) до различных температур экспозиции (–22,5; –25,0; –27,5; –30,0°C), создавая таким образом различное переохлаждение взвешенных в эмульсионной среде капель. Поскольку рост кристаллов происходит значительно быстрее, чем время ожидания возникновения зародышей новой фазы, момент визуально регистрируемого появления кристалла вполне корректно отождествлять с моментом образования центра роста, из которого этот кристалл образовался.

Рис. 3.2 и 3.3 иллюстрируют характер закристаллизовывания модельной системы в зависимости от переохлаждения. Как видно, при переохлаждении $\Delta T = 21,9^\circ\text{C}$ (рис. 3.2) рост возникших зародышей кристаллов льда происходит в условиях близких к равновесным, о чем свидетельствует структура фронта кристаллизации (изотропная кинетика роста, при которой размер кристалла увеличивается без изменения его формы).

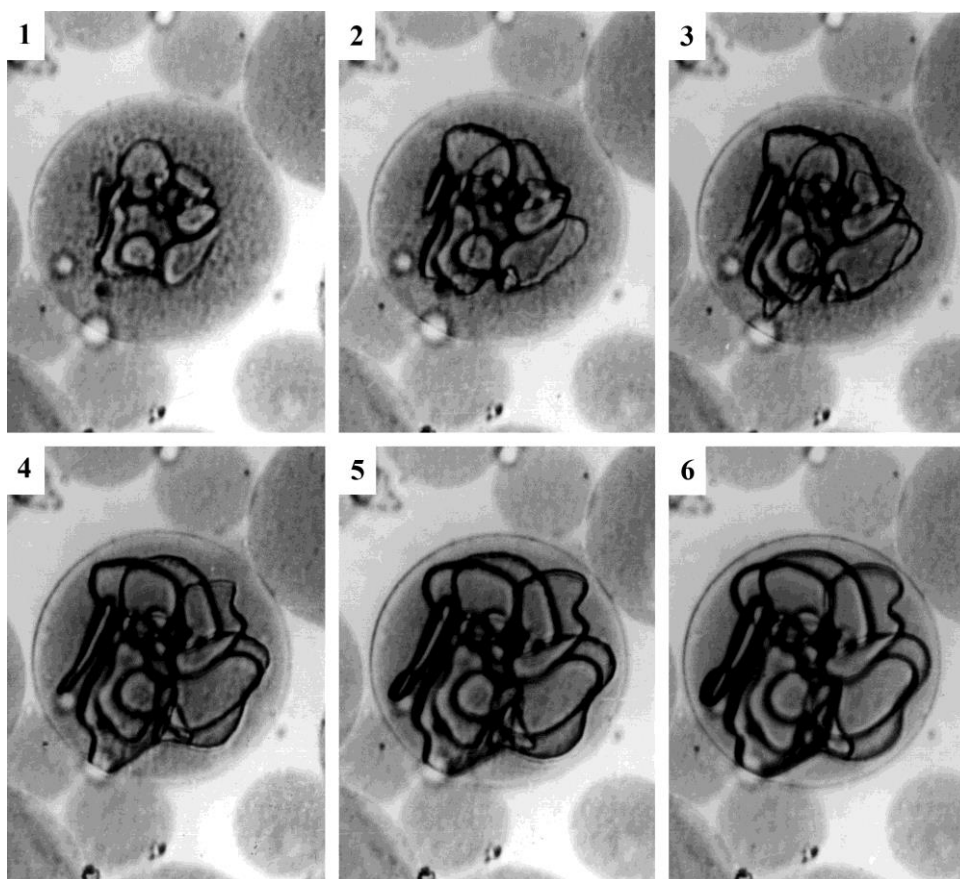


Рис. 3.2. Морфология кристаллов льда в капле плазмы крови человека при переохлаждении $\Delta T = 21,9^\circ\text{C}$. Увеличение при съемке $\times 120$.

При увеличении переохлаждения системы до значения $\Delta T = 29,4^\circ\text{C}$ (рис. 3.3) фронт кристаллизации теряет устойчивость и из исходно равновесного превращается в дендритный, что, по-видимому, обусловлено возникновением температурных градиентов в каплях и сменой механизма роста кристаллов льда.

В табл. 3.1 приведены полученные нами экспериментальные данные о кинетике процесса зародышеобразования в каплях плазмы крови человека в

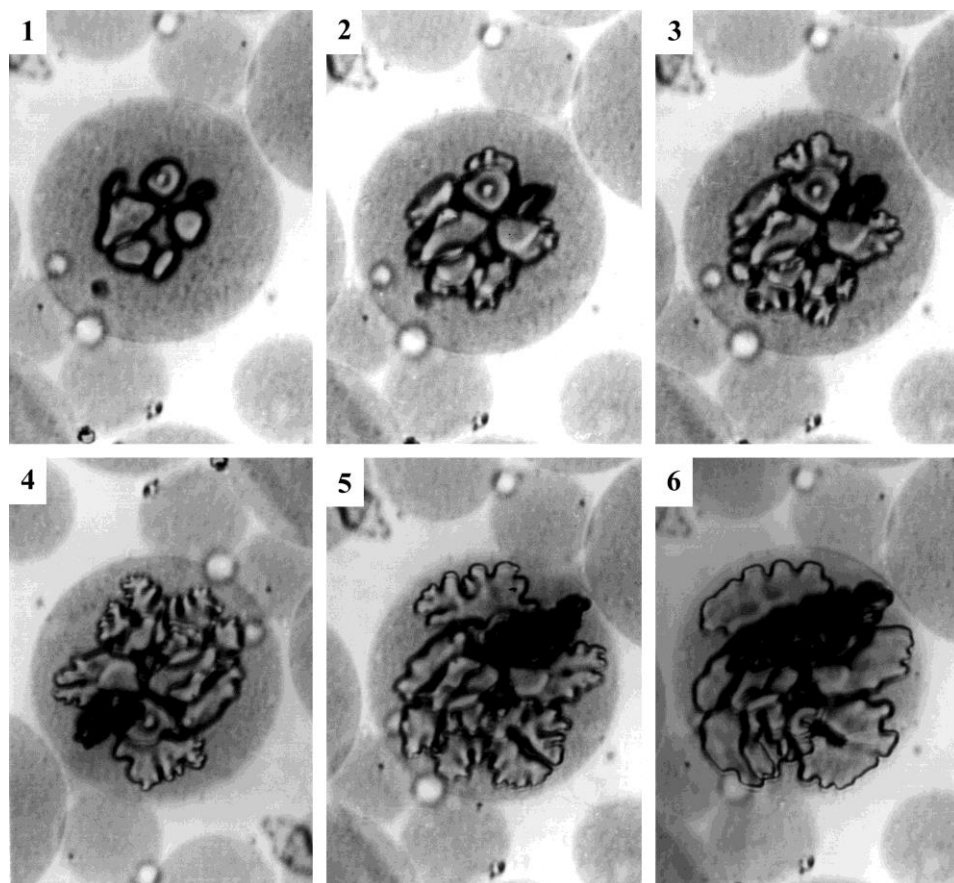


Рис. 3.3. Морфология кристаллов льда в капле плазмы крови человека при переохлаждении $\Delta T = 29,4^\circ\text{C}$. Увеличение при съемке $\times 120$.

зависимости от скорости охлаждения и переохлаждения модельной системы. Как следует из данных табл. 3.1 доля закристаллизовавшихся капель увеличивается как при увеличении переохлаждения, так и при увеличении скорости охлаждения.

Для обработки экспериментальных данных было использовано уравнение, описывающее процесс зародышеобразования в каплях эмульсии [285]. Уравнение получено на основе предположения, в соответствии с которым в каждой капле раствора процесс первичного зародышеобразования может одновременно и независимо реализоваться путем гетерогенного, флуктуационного и гетерофазного механизма образования кристаллов. В общем виде указанное уравнение имеет следующий вид:

$$\alpha = 1 - \frac{2}{3} \int_0^\infty \exp \left\{ -\frac{2}{3} V - mV [1 - \exp(-I_k \tau)] - \left(I_v V + I_s V^{\frac{2}{3}} \right) \tau \right\} dV, \quad (3.1)$$

Таблица 3.1

Влияние скорости охлаждения и температуры экспозиции на кинетику зародышеобразования в каплях плазмы крови человека.

Скорость охлажд., °C/мин	Температура экспозиции, °C	Доля закристаллизовавшихся капель в % за время в мин					
		1	2,5	5	7,5	10	12,5
4,6	–22,5	10,0 ± 0,44	12,0 ± 0,52	18,5 ± 0,81	18,0 ± 0,79	23,5 ± 1,03	24,0 ± 1,06
4,6	–25,0	25,5 ± 1,12	28,5 ± 1,25	30,0 ± 1,32	32,0 ± 1,41	33,5 ± 1,47	35,0 ± 1,54
4,6	–27,5	38,0 ± 1,67	41,5 ± 1,83	42,5 ± 1,87	42,0 ± 1,85	42,0 ± 1,84	43,0 ± 1,89
4,6	–30,0	54,0 ± 2,37	56,0 ± 2,46	56,5 ± 2,48	58,5 ± 2,57	59,5 ± 2,62	59,0 ± 2,60
1,6	–25,0	19,5 ± 0,85	25,0 ± 1,10	28,0 ± 1,23	29,5 ± 1,30	30,0 ± 1,32	30,5 ± 1,34
3,9	–25,0	20,0 ± 0,88	26,6 ± 1,17	28,5 ± 1,25	30,5 ± 1,34	30,0 ± 1,32	32,0 ± 1,40
8,7	–25,0	38,5 ± 1,69	43,5 ± 1,91	43,5 ± 1,91	44,0 ± 1,97	44,5 ± 1,96	45,0 ± 1,98
12,0	–25,0	54,0 ± 2,38	56,0 ± 2,46	56,5 ± 2,47	60,0 ± 2,64	60,5 ± 2,66	60,0 ± 2,64
14,5	–25,0	61,0 ± 2,68	65,0 ± 2,86	65,5 ± 2,88	66,0 ± 2,90	65,5 ± 2,88	65,5 ± 2,88

где α – доля закристаллизовавшихся капель эмульсии; V – относительный размер капли (отношение кубов фактического размера капли r к наиболее вероятному r_0); m – среднее число твердых примесей в капле характеристического размера ($m = \frac{\pi}{6} r_0^3 n$; $\frac{\pi}{6} r_0^3$) – характеристический объем капли, n – удельная концентрация твердых примесей); I_k – частота зародышеобразования на твердой примеси; I_v – частота флуктуационного зародышеобразования в единице объема капли характеристического размера; I_s – частота гетерофазного зародышеобразования в капле характеристического размера; τ – время.

При некоторых ограничениях уравнение (3.1) упрощается. Если зародышеобразование изучается в каплях определенной размерной фракции, то

$$\alpha = 1 - \exp \left\{ -mV[1 - \exp(-I_k \tau)] - \left(I_v V + I_s V^{\frac{2}{3}} \right) \tau \right\} \quad (3.2)$$

Если есть основания предполагать, что гетерофазный механизм нуклеации не реализуется ($I_s = 0$), то

$$\alpha = 1 - \frac{1}{1 + \frac{3}{2} I_v \tau + \frac{3}{2} m[1 - \exp(-I_k \tau)]} \quad (3.3)$$

Параметры уравнений (3.2) и (3.3) были получены методом нелинейного оценивания Марквардта [286]. В качестве минимизируемой функции принимали сумму квадратов отклонений экспериментальных значений α_i от результатов расчета $\alpha_{расч.}$.

В табл. 3.2 и 3.3 приведены количественные оценки ряда параметров, фигурирующих в уравнениях (3.2) и (3.3). Анализ приведенных в этих таблицах данных позволил извлечь информацию как о механизме нуклеации льда в модельном растворе, так и о характере влияния на него степени переохлаждения системы и скорости ее охлаждения. Сравнение значений частот гетерогенного и флуктуационно-гетерофазного зародышеобразования, рассчитанных по уравнению (3.2), а также значений частот гетерогенного и флуктуационного

Таблица 3.2

Оценка параметров уравнений (3.2) и (3.3) из экспериментов по влиянию температуры экспозиции (величины переохлаждения) на кинетику первичного зародышеобразования в плазме крови человека.

скорость охлажде- ния сис- темы, °C/мин	темпера- тура экс- позиции, °C	переох- лажде- ние сис- темы, °C	Расчетные параметры по уравнению (3.2)			Расчетные параметры по уравнению (3.3)				
			частота ге- терогенного зародышеоб- разования в 1 мл $I_k \times n \times 10^6$, мин ⁻¹ мл ⁻¹	частота флуктуа- ционного и гете- рофазного заро- дышеобразования в 1 мл $\frac{6(I_V V + I_S V^2)}{\pi_0^3} \times 10^6$, мин ⁻¹ мл ⁻¹	дис- пер- сия расч. $S^2 \times 10^{-4}$	частота ге- терогенного зародышеоб- разования в 1 мл $I_k \times n \times 10^6$, мин ⁻¹ мл ⁻¹	частота флук- туационного зародышеоб- разования в 1 мл $\frac{6I_V}{\pi_0^3} \times 10^6$, мин ⁻¹ мл ⁻¹	число активных примесей в 1 мл $n \times 10^6$	частота ге- тероген- ного заро- дышеоб- разования на твер- дой при- меси I_k , мин ⁻¹	дис- пер- сия расч. $S^2 \times 10^{-4}$
4,6	-22,5	21,9	3,05	9,99	5,1	2,78	8,37	4,21	0,66	3,6
4,6	-25,0	24,4	11,51	12,48	5,4	9,98	12,14	7,28	1,37	4,9
4,6	-27,5	26,9	23,87	19,10	0,58	21,09	3,25	11,29	1,87	0,7
4,6	-30,0	29,4	45,27	25,20	5,3	37,98	11,20	17,34	2,19	12,7

Таблица 3.3

Оценка параметров уравнения (3.3) из экспериментов по влиянию скорости охлаждения на кинетику первичного зародышеобразования в плазме крови человека.

скорость охлаждения системы, °C/мин	температура экспозиции, °C	Расчетные параметры по уравнению (3.3)				
		частота гетерогенного зародышеобразо- вания в 1 мл $I_k \times n \times 10^6$, мин ⁻¹ мл ⁻¹	частота флуктуационного зародышеобра- зования в 1 мл $\frac{6I_V}{\pi_0^3} \times 10^6$, мин ⁻¹ мл ⁻¹	число активных примесей в 1 мл $n \times 10^6$	частота гетерогенного зародышеобра- зования на твер- дой примеси I_k , мин ⁻¹	дисперсия расчета $S^2 \times 10^{-4}$
1,6	-25,0	5,31	4,51	6,81	0,78	1,0
3,9	-25,0	5,92	5,10	7,13	0,83	1,2
8,7	-25,0	19,97	4,87	11,82	1,69	0,4
12,0	-25,0	29,34	17,91	17,26	1,70	22,2
14,5	-25,0	38,13	2,61	22,04	1,73	2,9

зародышеобразования, рассчитанных по уравнению (3.3) (табл. 3.2), показывает, что в среднем вклад в первичное зародышеобразование гетерогенного механизма составляет 98,7%.

Количество активных твердых примесей в системе в исследованном диапазоне переохлаждений по порядку величины равно 10^6 – 10^7 в 1 мл плазмы и зависит от переохлаждения: с увеличением переохлаждения количество активных примесей возрастает (табл. 3.2). Активность твердых примесей, которая характеризуется частотой гетерогенного зародышеобразования на поверхности одной примесной частицы, также растет с увеличением переохлаждения системы (табл. 3.2). Как следует из анализа приведенных в табл. 3.3 данных, при увеличении скорости охлаждения системы увеличиваются как количество активных примесей в ней, так и их активность. Акт образования зародыша кристалла критического размера на поверхности частицы твердой примеси является результатом полимолекулярной адсорбции частиц кристаллизуемого вещества на ней. Характер адсорбции зависит как от свойств поверхности примеси, так и от свойств среды, в которой она находится [27, 233]. Вполне понятно, что увеличение скорости охлаждения модельной системы может привести только к уменьшению адсорбционной активности поверхности примесных частиц, поскольку в этом случае сокращается время, необходимое для образования адсорбционных слоев. Однако полученные данные противоречат этому на первый взгляд правдоподобному заключению. Наблюдаемое нами увеличение количества активных примесей и их активности свидетельствует о повышении адсорбционной активности поверхности примесей с ростом скорости охлаждения. Можно предположить, что скорость охлаждения влияет на процессы, которые определяют характер адсорбции при зародышеобразовании, еще в жидкой фазе. Известно, что вода представляет собой размытый тепловым движением вариант структуры льда [8]. Ближняя упорядоченность расположения молекул в воде, являющейся сильно ассоциированным веществом, выражена больше, чем в других жидкостях. Упорядоченность и число водородных межмолекулярных связей в воде возрастает с понижением температуры [236].

Следовательно, приближение структуры жидкой фазы к льдоподобной в этом случае облегчает фазовый переход “жидкость – кристалл”. Поскольку плазма крови имеет сложный белково-солевой состав [213], при взаимодействии ее компонентов с водной фракцией образуются структурные комплексы и льдоподобный каркас искажается. С уменьшением скорости охлаждения в жидкой фазе исследуемой системы успевают завершиться процессы ее структурирования, а наличие образовавшихся структур на конкурентной основе тормозят адсорбцию льдоподобного зародыша на поверхности твердых примесей, результатом чего является замедление процесса первичного зародышеобразования. Для выяснения возможной природы образующихся структур при небольших скоростях охлаждения была исследована кинетика первичного зародышеобразования в каплях чистой воды и растворах солей, имитирующих солевой состав плазмы крови человека. Результаты показали, что вариации скорости охлаждения в пределах 1,5–15°С/мин не влияют на процессы зародышеобразования в чистой воде и солевых растворах. Следовательно, можно предположить, что при пониженных скоростях охлаждения более полно успевают развиваться структуры воды и органических составляющих плазмы крови человека (белков, глюкозы, полисахаридов и др.), которые связывают воду и таким образом тормозят процессы зародышеобразования. При увеличении скорости охлаждения эти процессы не успевают завершиться в полной мере, с чем, возможно, и связано увеличение числа активных примесей и их активности, обуславливающие увеличение скорости процесса зародышеобразования.

3.2. Механизм роста внеклеточных кристаллов льда

Как показали проведенные нами ранее [21, 26] криомикроскопические исследования, в зависимости от режима охлаждения и состава внеклеточной среды в суспензии, в результате фазового перехода в ней, формируется внеклеточный лед различной морфологии. При этом сохранность замороженных клеток зависит от формы и размера внеклеточных кристаллов льда, в частности,

потому, что структура внеклеточного льда оказывает влияние на характер массообмена между клетками и окружающей их средой [26]. В свою очередь, формирующаяся при замораживании морфология кристаллической структуры зависит от механизма роста кристаллов льда [27].

В соответствии с классическими представлениями рост идеального кристалла осуществляется путем флуктуационного образования на его атомно-гладкой грани двумерных зародышей и последующего распространения кристаллического монослоя зародышей по всей грани. Поскольку молекулярный слой покрывает всю растущую грань за время малое по сравнению со временем ожидания появления на атомно-гладкой поверхности грани нового зародыша, линейная скорость роста кристалла лимитируется вероятностью зарождения двумерных зародышей критического размера. В этом случае аналитическая зависимость линейной скорости роста кристалла от переохлаждения имеет следующий вид:

$$v = K_1 e^{-\frac{U}{RT}} e^{-\frac{W}{kT}}, \quad (3.4)$$

где v – линейная скорость роста; T – абсолютная температура; W – работа образования двумерного зародыша; U – энергия активации при переходе молекул вещества из жидкости в кристалл; k – постоянная Больцмана; R – газовая постоянная. Работа образования двумерного зародыша определяется как

$$W = \frac{B\sigma^3}{(\Delta T)^2}, \quad (3.5)$$

где σ – поверхностное натяжение (или поверхностная энергия) на границе “кристалл-жидкость”; ΔT – переохлаждение; B – константа, которая определяется молекулярным весом, плотностью, температурой и теплотой плавления кристаллизующегося вещества. Относительная роль первого экспоненциального множителя в уравнении (3.4), связанного с подвижностью частиц, и второго, связанного с механизмом роста, меняется с переохлаждением. Первый член резко уменьшается с увеличением переохлаждения, поскольку уменьшается подвижность молекул, а, следовательно, увеличивается энергия активации U .

Второй, наоборот, увеличивается, поскольку уменьшается работа образования двумерного зародыша W (3.5) [236, 287]. В совокупности это обуславливает куполообразный характер зависимости линейной скорости роста кристалла от переохлаждения. Показано [288, 289], что в области малых переохлаждений характер экспериментальной зависимости линейной скорости роста кристалла от переохлаждения существенно отличается от теоретической, полученной на основании уравнения (3.4). Именно это обстоятельство не позволяет утверждать, что во всем интервале переохлаждений линейная скорость кристаллизации определяется вероятностью зарождения двумерных зародышей. Ход кривой в области максимума и особенно при больших переохлаждениях на ниспадающей ветви указанной выше зависимости в значительной мере определяется уменьшением подвижности молекул в жидкой фазе с понижением температуры [287–289]. Поэтому сопоставление экспериментальной зависимости в этой области переохлаждений с теоретической зависимостью (3.4) не позволяет установить механизм роста кристалла. В области же малых переохлаждений линейная скорость кристаллизации растет с понижением температуры, а температурный фактор, понижающий линейную скорость роста в этой области переохлаждений, играет второстепенную роль [288].

Таким образом, закон повышения линейной скорости роста кристалла в области малых переохлаждений, в основном, определяется механизмом роста кристаллов.

В общем случае, согласно представлениям молекулярно-кинетических теорий роста реальных кристаллов, считается, что на поверхности растущей грани кристалла недостроенный молекулярный слой образует ступеньку роста. В процессе присоединения к ней молекул кристаллизующего вещества ступенька движется к краю кристалла, формируя завершенную кристаллическую грань. Дальнейший рост кристалла происходит в том случае, если возникают новые ступеньки. Их источником являются различные дефекты кристаллической решетки, в частности, точечные дефекты (вакансии), линейные дефекты (краевые и винтовые дислокации), межзеренные границы и др. Вероятность возникновения

ступенек лимитирует линейную скорость роста реальных кристалла и определяет его механизм [233, 245].

Если поверхность межфазной границы “кристалл-жидкость” является атомно-шероховатой, то рост кристалла осуществляется по нормальному механизму путем беспорядочного присоединения молекул кристаллизующего вещества ко всей поверхности раздела фаз. В этом случае линейная скорость роста кристалла пропорциональна движущей силе процесса кристаллизации – переохлаждению ΔT [290]:

$$v_{\text{норм}} = K_2 \Delta T e^{-\frac{U}{RT}} \quad (3.6)$$

Рост по нормальному механизму может осуществляться во всем температурном интервале, поскольку шероховатость межфазной границы растет с понижением температуры.

Если в процессе роста кристалла ступенька не исчезает, как это имеет место при наличии винтовой дислокации, то рост кристалла осуществляется по дислокационному механизму [290, 291]. В этом случае винтовая дислокация, пронизывающая кристалл, выходя на его поверхность, образует ступеньку, к которой непрерывно присоединяются молекулы кристаллизующегося вещества. Грань зарастает, но поскольку поверхность является геликоидальной, ступенька все время поворачивается вокруг оси дислокации. При дислокационном механизме линейная скорость роста при малых переохлаждениях может быть аппроксимирована формулой вида:

$$v = K_3 (\Delta T)^m e^{-\frac{U}{RT}}, \quad (3.7)$$

где показатель степени m , как установлено многочисленными экспериментами, чаще всего близок к 2 [290–294]. Фигурирующие в уравнениях (3.4, 3.6, 3.7) константы K_1 , K_2 , K_3 – кинетические коэффициенты, характеризующие кристаллизующееся вещество. Дислокационный механизм роста энергетически более выгоден, поскольку двумерный зародыш в виде поверхностной дислокации всегда присутствует на грани кристалла и на его образование не требуется затраты дополнительной работы [291].

Таким образом, отличительными признаками вышеуказанных механизмов роста является различная зависимость линейной скорости роста кристалла v от движущей силы кристаллизации ΔT . При нормальном механизме скорость роста кристалла пропорциональна переохлаждению раствора ΔT , при дислокационном – пропорциональна квадрату переохлаждения ΔT^2 , а рост двухмерными зародышами описывается экспоненциальной зависимостью и может реализоваться при росте идеальных кристаллов в области очень малых переохлаждений.

Следовательно, оценить механизм роста внеклеточных кристаллов льда в сложных биологических системах можно, экспериментально определив показатель степенной зависимости линейной скорости роста кристалла льда от переохлаждения.

Нами линейная скорость роста кристаллов льда маточного раствора как функции переохлаждения ΔT изучена на модели внеклеточной среды, представляющей собой раствор лиофилизированной плазмы крови человека с добавлением следующих криопротекторов: этиленгликоля (ЭГ), диметилсульфоксида (ДМСО), полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500) и поливинилпирролидона с молекулярной массой 12000 (ПВП-12000). Концентрацию криопротекторов (С) варьировали в пределах от 0 до 40 масс % [295, 296].

Процессы кристаллизации, идущие с выделением тепла, как это имеет место при льдообразовании, приводят к возникновению градиента температуры на участке “граница кристалла – раствор”: у границы кристалла температура близка к температуре плавления, а при удалении от границы вглубь раствора температура снижается. Однако экспериментально оценить переохлаждение на грани кристалла практически невозможно из-за технических трудностей. Теоретически истинная величина переохлаждения на грани растущего кристалла, движущейся со скоростью v , может быть рассчитана, исходя из условия теплового баланса [297]. Измерения температуры на фронте кристаллизации плоских препаратов толщиной 0,3–0,35 мм показали, что температура на границе

“кристалл-расплав” не отличается от температуры термостата в пределах погрешности $\pm 0,1^\circ\text{C}$ во всем температурном интервале [298]. Поэтому в экспериментах при изучении механизма роста кристаллов и для определения энергии активации процесса кристаллизации чаще всего пользуются легко определяемой величиной, а именно, переохлаждением самой кристаллизующей системы [294, 299]. Очевидно, что подобная замена величины переохлаждения у растущей грани кристалла на объемное носит довольно приблизительный характер, так как корреляция этих параметров зависит от физико-химических свойств самого раствора (вязкость, теплоемкость), от гидродинамических процессов в системе (перемешивание и его интенсивность), от теплопроводности стенок ячейки. Следует подчеркнуть, что, по-видимому, такое приближение допустимо только для экспериментов, проводящихся при одних и тех же методических условиях. В противном случае более корректно было бы пользоваться величиной теплоотвода от кристаллизующей системы.

Учитывая методическую однотипность наших экспериментов, движущей силой роста кристаллов льда считали объемное переохлаждение системы: разницу между температурой кристаллизации исследуемого раствора и его температурой плавления.

Экспериментальные данные зависимости линейной скорости роста кристаллов льда v от вида, концентрации исследованных криопротекторов и переохлаждения системы приведены на рис. 3.4–3.7.

Аналитические зависимости линейной скорости роста грани кристалла от переохлаждения системы были получены с использованием метода многомерного статистического анализа [279]. Экспериментальные данные аппроксимировали полиномами вида $y = Ax + Bx^2$ и $y = Ax + Bx^2 + Cx^3$ в диапазоне скоростей роста от 0 до 100 мкм/с.

Как следует из табл. 3.4 независимо от экспериментальных условий (вид криопротектора, его концентрация, переохлаждение) линейная скорость роста кристаллов льда во внеклеточной среде преимущественно представляет собой сумму скоростей, обусловленных реализацией в системе одновременно двух

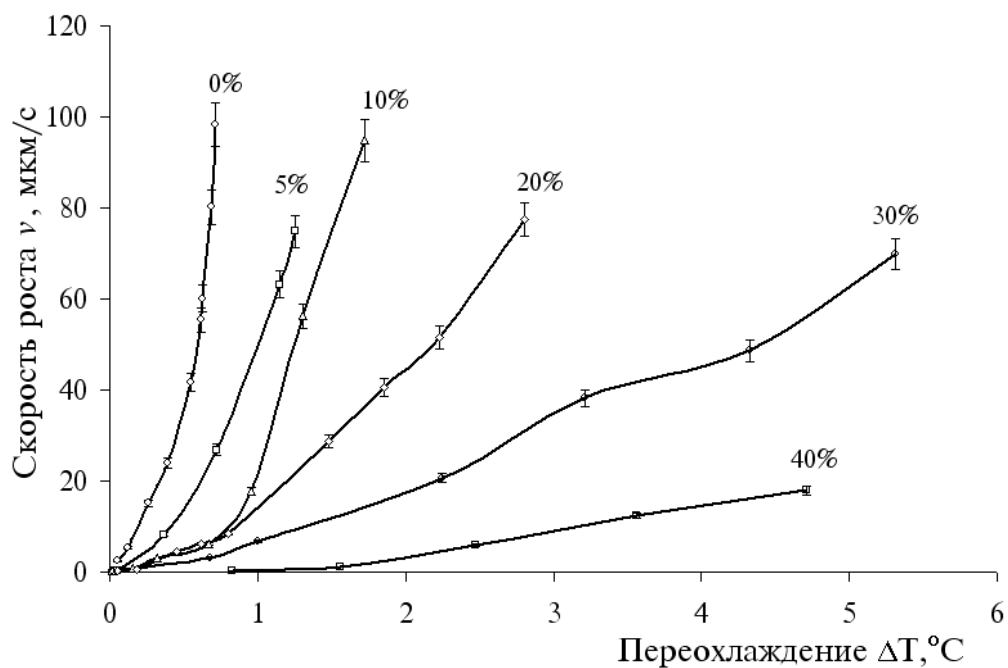


Рис. 3.4. Зависимость скорости роста кристаллов льда от переохлаждения при различной концентрации в плазме крови этиленгликоля.

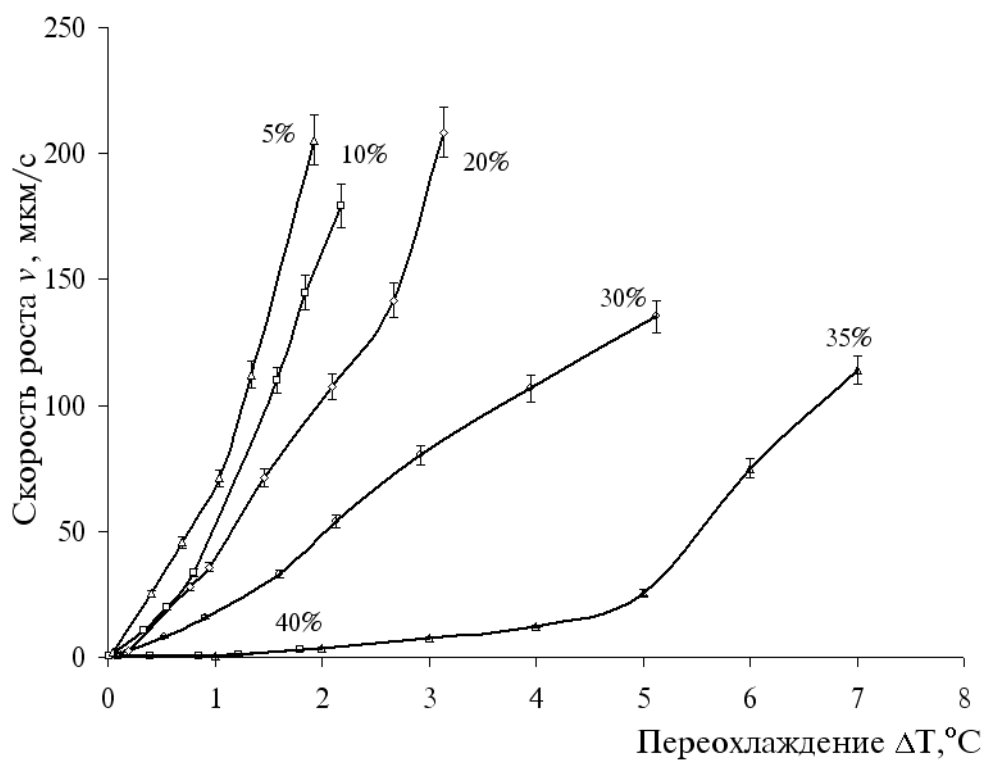


Рис. 3.5. Зависимость скорости роста кристаллов льда от переохлаждения при различной концентрации в плазме крови диметилсульфоксида.

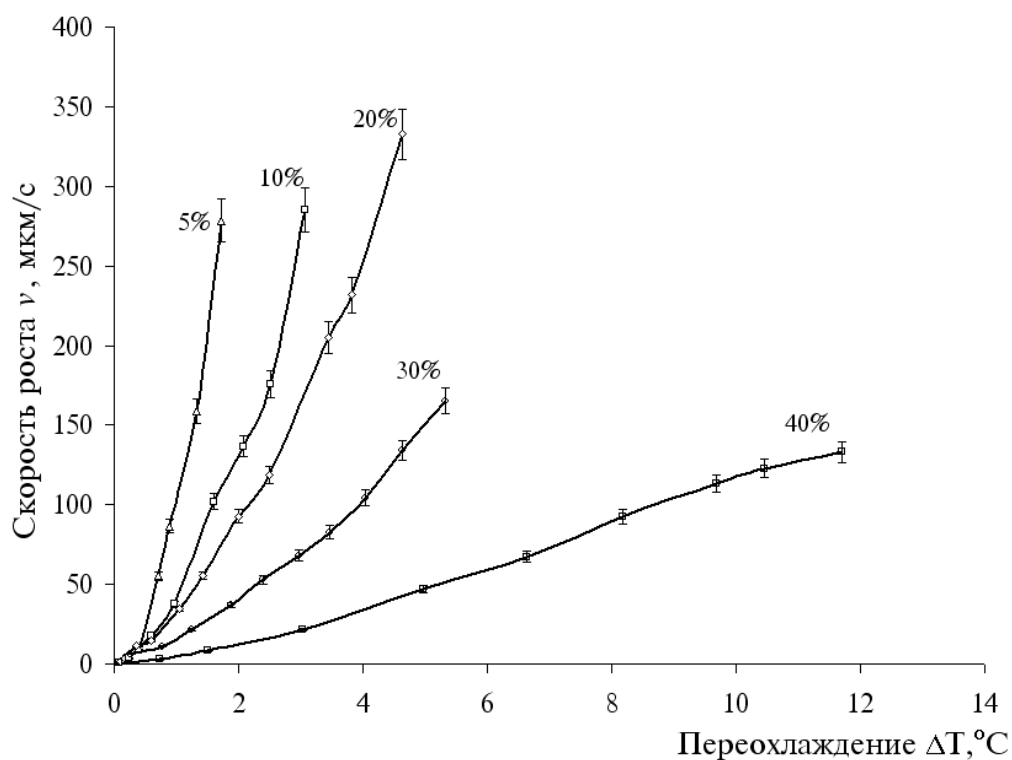


Рис. 3.6. Зависимость скорости роста кристаллов льда от переохлаждения при различной концентрации в плазме крови ПЭГ-1500.

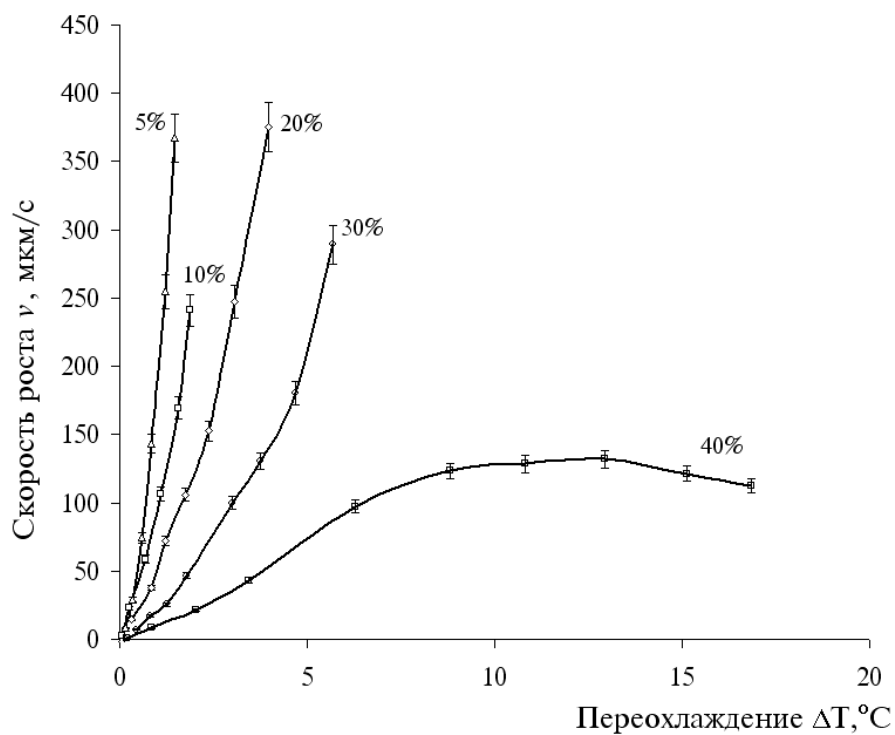


Рис. 3.7. Зависимость скорости роста кристаллов льда от переохлаждения при различной концентрации в плазме крови ПВП-12000.

Таблица 3.4

Аналитические зависимости скорости роста грани кристалла льда (v) в присутствии криопротекторов от переохлаждения (ΔT).

Концентрация, С, масс %	Этиленгликоль	Диметилсульфоксид	Полиэтиленгликоль м.м. 1500	Поливинилпирролидон м.м. 12000.
0	$v = 235(\Delta T)^3$	-	-	-
5	$v = 35,4(\Delta T)^2$	$v = 51,3(\Delta T)^2$	$v = 117(\Delta T)^2$	$v = 232(\Delta T)^2$
10	$v = 26,2(\Delta T)^2$	$v = 31,8\Delta T + 34,6(\Delta T)^2$	$v = 13,7\Delta T + 32,4(\Delta T)^2$	$v = 92,9\Delta T + 27,5(\Delta T)^2$
20	$v = 6,6\Delta T + 8,4(\Delta T)^2$	$v = 27,6\Delta T + 10,6(\Delta T)^2$	$v = 14,7\Delta T + 21,5(\Delta T)^2$	$v = 35,4\Delta T + 15,3(\Delta T)^2$
30	$v = 8,2\Delta T + 0,8(\Delta T)^2$	$v = 19,1\Delta T + 1,9(\Delta T)^2$	$v = 10,1\Delta T + 3,8(\Delta T)^2$	$v = 9,5\Delta T + 9,6(\Delta T)^2$
35	-	$v = 7,1\Delta T + 0,96(\Delta T)^2$	-	-
40	$v = 0,72(\Delta T)^2$	$v = 1,1\Delta T + 0,1(\Delta T)^2$	$v = 6,0\Delta T + 0,65(\Delta T)^2$	$v = 10,1\Delta T + 0,87(\Delta T)^2$

механизмов роста реальных кристаллов: нормального ($v \sim \Delta T$) и дислокационного ($v \sim \Delta T^2$). В отсутствие криопротекторов зависимость скорости роста грани кристалла от переохлаждения имеет вид $v \sim \Delta T^3$, что, по-видимому, связано с взаимным влиянием растущих дислокаций, которое приводит к возникновению новых ступенек роста, или с тем, что рост грани происходит путем развития уже имеющегося множества дислокаций. Как правило, в чистых веществах рост осуществляется по дислокационному механизму [291]. Увеличение концентрации криопротектора приводит к ингибированию обоих составляющих роста о чем свидетельствует уменьшение коэффициентов регрессии при ΔT и ΔT^2 в аналитических выражениях (табл. 3.4). Анализ степени ингибирования скорости роста грани кристалла льда показывает, что при увеличении концентрации криопротектора дислокационная составляющая роста ингибируется значительно сильнее, чем нормальная (табл. 3.5). Таким образом, дислокации как постоянно существующие центры роста оказываются более чувствительными к наличию в системе криопротектора.

Таблица 3.5

Степень ингибирования нормальной и дислокационной составляющих скорости роста грани кристалла льда в зависимости от концентрации криопротектора.

С, масс%	этиленгликоль		ДМСО		ПЭГ-1500		ПВП-12000	
	норм.	дислок.	норм.	дислок.	норм.	дислок.	норм.	дислок.
5	-	1	-	1	-	1	-	1
10	-	1,35	1	1,48	1	3,61	1	8,44
20	1	4,21	1,15	4,84	0,93	5,44	2,62	15,6
30	0,8	44,25	1,66	27,0	1,36	30,79	9,78	24,17
35		-	4,48	53,44	-	-	-	-
40		49,17	28,91	513,0	2,28	180,0	9,20	266,67

Несомненно, важным вопросом кинетики роста кристаллов льда является вопрос об ингибирующей активности исследованных криопротекторов в

отношении обоих механизмов роста. Графический анализ коэффициентов регрессии при ΔT^2 и ΔT (рис. 3.8, а, б) позволил установить последовательность криопротекторов по степени ингибирования нормального и дислокационного механизма роста кристаллов льда. В частности, при содержании 20% концентрации криопротекторов в растворе по степени ингибирования нормальной составляющей роста криопротекторы располагаются в ряд: ЭГ > ПЭГ-1500 > ДМСО > ПВП-12000, а дислокационной составляющей – в ряд: ЭГ > ДМСО > ПВП-12000 > ПЭГ-1500. Понятно, что существенную роль в различной

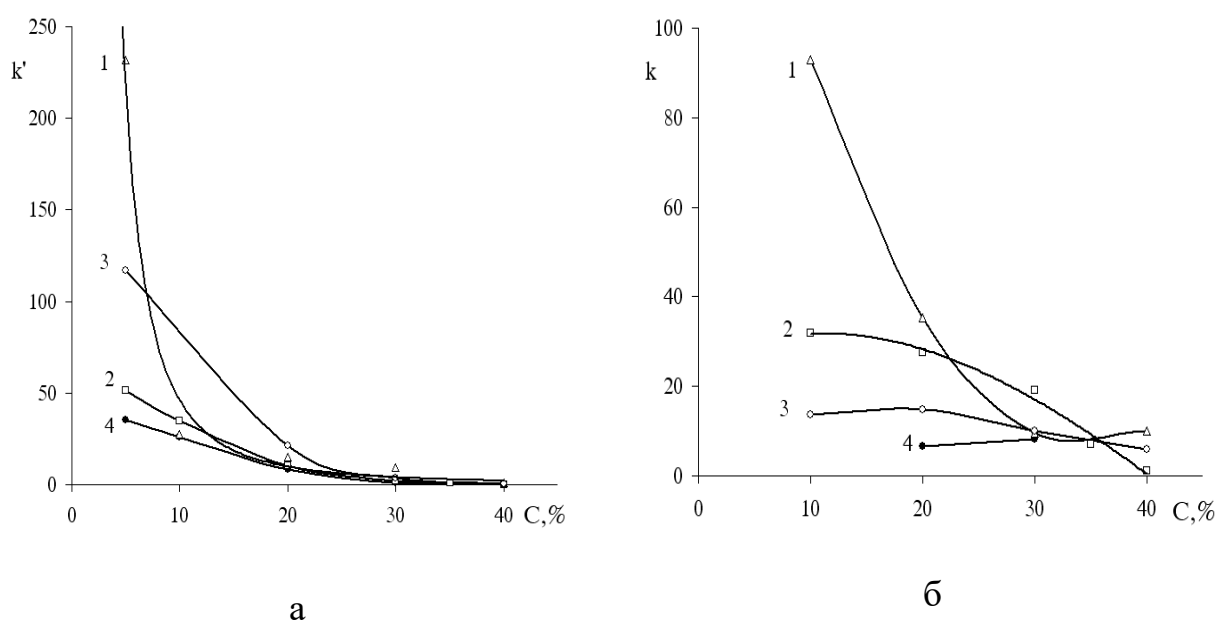


Рис. 3.8. Зависимость коэффициентов регрессии при ΔT^2 (а) и ΔT (б) от вида криопротектора и его массовой концентрации в плазме крови человека: 1– ПВП-12000, 2 – ДМСО, 3 – ПЭГ-1500, 4 – этиленгликоль.

степени ингибирующей активности криопротекторов играют их физико-химические свойства, такие как, молекулярная масса, число гидратации, поверхностная активность, вязкость. Однако, как показал анализ полученных нами результатов, однофакторная линейная корреляция между коэффициентами регрессии при ΔT и ΔT^2 и перечисленными физико-химическими свойствами криопротекторов, отсутствует, что, несомненно, свидетельствует о сложном взаимном влиянии указанных свойств криопротекторов на кинетические

характеристики роста кристаллов льда [300].

Полученные нами аналитические зависимости (табл. 3.4) позволили оценить величины критического переохлаждения ΔT_k , при которых вклад в рост кристаллов льда обоих механизмов одинаков и, следовательно, выделить те области переохлаждений, где будет превалировать тот или иной из них. В табл. 3.6 приведены критические переохлаждения, полученные на основании простых расчетов. При равном вкладе в скорость роста кристаллов льда обоих механизмов имеем следующее равенство: $A\Delta T_k = B\Delta T_k^2$. Следовательно, критическое переохлаждение $\Delta T_k = A/B$. При этом, если $\Delta T > \Delta T_k$, то преобладает вклад дислокационного механизма, если $\Delta T < \Delta T_k$, то преобладает нормальный рост.

Таблица 3.6

Критические переохлаждения системы ($\Delta T_k, ^\circ\text{C}$), обеспечивающие равенство вкладов нормального и дислокационного механизмов в скорость роста грани кристаллов льда (v).

концентрация С, масс %	Критические переохлаждения, $\Delta T_k, ^\circ\text{C}$			
	Этиленгликоль	ДМСО	ПЭГ-1500	ПВП-12000
5,0	-	-	-	-
10,0	-	0,92	0,42	3,38
20,0	0,79	2,60	0,68	2,31
30,0	10,25	10,05	2,66	0,99
40,0	-	11,0	9,23	11,61

Как следует из данных табл. 3.6 при возрастании концентрации ЭГ, ДМСО и ПЭГ-1500 значения критических переохлаждений увеличиваются. В то же время для ПВП-1500 отмечается снижение критических переохлаждений вплоть до 30%, что свидетельствует об увеличении в данной концентрационной зоне вероятности дислокационного механизма роста.

Анализ морфологических особенностей кристаллической структуры льда

в растворах лиофилизированной плазмы крови человека, содержащих различные концентрации криопротекторов (рис. 3.9, рис. 3.10, рис. 3.11), показал, что ее характер находится в полном соответствии с установленными закономерностями зависимости линейной скорости роста от переохлаждения. Нами установлено, что

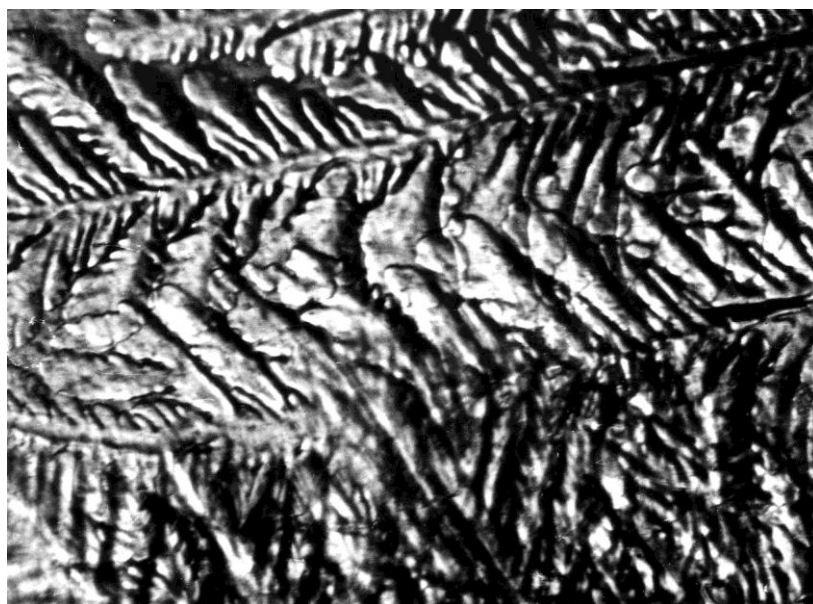


Рис. 3.9. Морфология кристаллов льда в растворе лиофилизированной плазмы крови человека не содержащей криопротекторы.

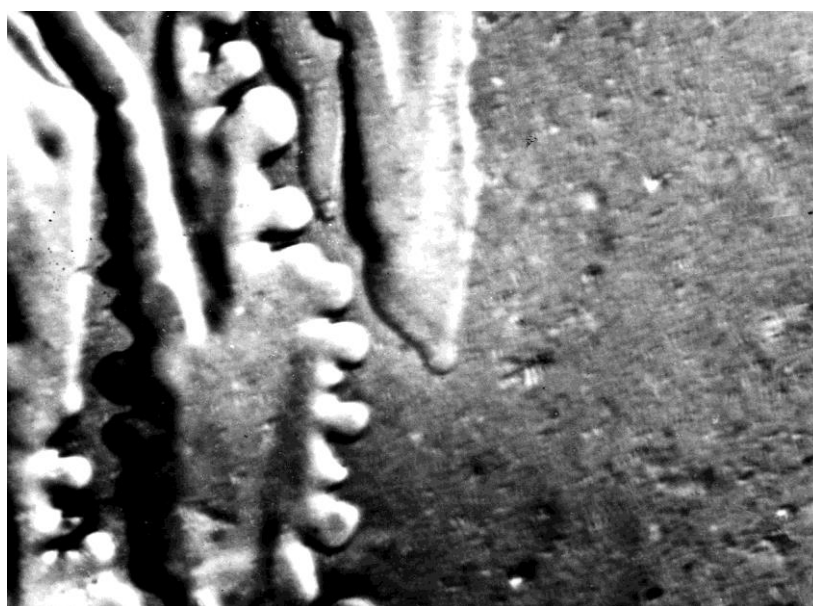


Рис. 3.10. Переход к смешанному механизму роста кристаллов льда: концентрация этиленгликоля 20%, переохлаждение системы $\Delta T = 0,8^\circ\text{C}$.

если криопротектор в растворе плазмы крови человека отсутствует, то рост кристаллов льда происходит только по дислокационному механизму (табл. 3.4). В этом случае при фазовом переходе формируются разветвленные дендритные структуры (рис. 3.9) во всем диапазоне исследованных переохлаждений. При содержании в растворе 20% концентрации этиленгликоля (рис. 3.10) наблюдается

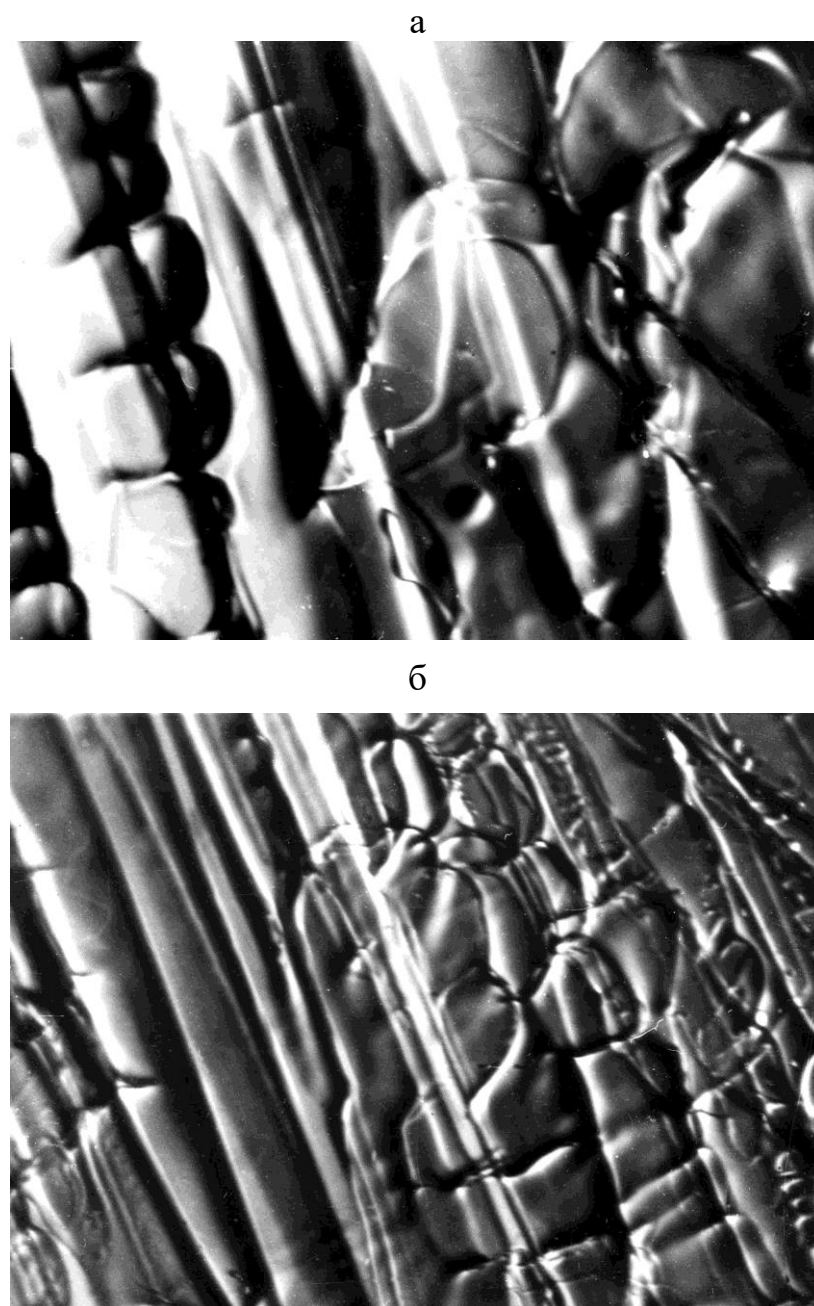


Рис. 3.11. Морфология кристаллов льда в растворах лиофилизированной плазмы крови человека при одновременной реализации нормального и дислокационного механизмов роста: концентрация криопротекторов 10%, переохлаждение системы $\Delta T = 0,97^\circ\text{C}$; а – ДМСО, б – ПЭГ-1500.

потеря устойчивости гладкого фронта роста и переход к смешанному механизму роста. Рис. 3.11 иллюстрирует морфологию льда в растворах плазмы крови при реализации одновременно обоих механизмов роста. Как видно протяженные линейные структуры перемежаются крупными дендритными ветвями, имеющими скругленные формы.

В процессе экспериментального изучения морфологических особенностей растущих кристаллов установлено, что один и тот же кристалл при изменении величины переохлаждения может принимать разнообразные формы от полиэдрической до скелетной, переходящей в дендритную [299, 301], что связано именно со сменой механизма роста. С увеличением переохлаждения гладкая плотноупакованная грань становится кинетически-шероховатой в связи с тем, что на ее поверхности возникает эшелон ступеней, края которых покрываются изломами, обеспечивающими преимущественный рост по нормальному механизму. Увеличение движущей силы кристаллизации приводит к уменьшению работы образования и размера критического зародыша, что вызывает ускорение роста отдельных граней кристалла, т.е. анизотропию роста. Рост первичных кристаллов в определенных направлениях, обусловленных температурными и концентрационными градиентами, в свою очередь, приводит к потере устойчивости фронта, последующему образованию дефектных структур, генерирующих дислокации и, следовательно, к разнообразию морфологии кристаллической структуры.

Таким образом, механизм роста является “внутренним” свойством системы “кристалл-жидкость”, чувствительным к изменению внешних условий. С изменением переохлаждения происходит последовательная смена механизмов роста реальных кристаллов. При малых переохлаждениях, в области температуры плавления, рост кристалла происходит почти в равновесных условиях очень медленно, поскольку скорость роста лимитируется вероятностью образования двумерных зародышей. В этом случае образуются сравнительно большие кристаллы, по форме близкие к плоскогранным полиэдрам. Наличие округлой формы роста, повторяющей изотерму кристаллизации, служит признаком

осуществления нормального механизма. Скелетный и разветвленный дендритный рост свидетельствует о дислокационном механизме роста [27, 299, 301]. Таким образом, возможность привлечения анализа кристаллических форм роста может служить качественным признаком действия того или иного механизма роста.

Влияние криопротекторов на морфологию кристаллов льда, образующихся в растворах лиофилизированной плазмы крови человека при ее замораживании, следует рассматривать, как с точки зрения изменения свойств маточной среды, так и с точки зрения способности криопротекторов адсорбироваться на растущей грани кристалла, что приводит к изменению кинетики роста.

Как правило, в состав криобиологической системы входят криопротекторы, представляющие собой различные классы химических соединений (спирты, амиды, оксиды, искусственные полимеры), белковые фракции, органические и неорганические добавки и собственно подлежащий криоконсервированию биологический объект. Казалось бы, сложность такой системы не может не влиять на механизм роста кристаллов льда в ней. Но полученные нами результаты свидетельствуют, что рост кристаллов льда в биологических растворах осуществляется традиционными механизмами роста несовершенных кристаллов: нормальным и дислокационным.

Однако для биологического объекта, в частности, для суспензии клеток, преобладание того или иного механизма формирования кристаллической структуры оказывается небезразличным. Криомикроскопические эксперименты показывают [20, 21], что в процессе роста внеклеточных кристаллов льда клетки, как макрочастицы, оттесняются фронтом кристаллизации в окружающий кристаллы льда маточный раствор с повышающейся по мере понижения температуры (в соответствии с фазовой диаграммой состояния) концентрацией растворенных во внеклеточной среде веществ. При этом между клеткой и маточным раствором нарушается осмотическое равновесие, в результате чего клетка теряет внутриклеточную воду. Естественно, что от скорости протекания внеклеточных процессов и транспортных характеристик плазматической мембраны клетки будет зависеть ее осмотическая реакция. Поскольку при

дислокационном механизме линейная скорость роста кристаллов больше, чем при нормальном механизме, то в этом случае быстрое увеличение градиента осмотического давления на мембране может привести к гибели клетки уже в температурной зоне формирования первичной кристаллической структуры. Отсюда следует целесообразность максимального ингибирования этой составляющей роста.

С точки зрения обеспечения сохранности клеток при их низкотемпературном консервировании, дислокационная составляющая роста кристаллов, как следует из полученных нами экспериментальных данных, ингибируется при увеличении концентрации криопротекторов в криозащитной среде и особенно этиленгликоля.

3.3. Механизм формирования кристаллической структуры льда различной дисперсности

Повреждение биологических объектов при криоконсервировании, как правило, сильно коррелирует с размером образующихся кристаллов льда. Считается, что чем меньше линейные размеры кристаллов по сравнению с размерами клеток и внутриклеточных органелл, тем меньше вероятность их повреждения за счет механического разрушения [28–30, 59, 60]. Выяснение механизма формирования кристаллической структуры льда различной дисперсности в растворах разных криопротекторов может быть одним из подходов к выбору наиболее эффективных криозащитных веществ.

Нами была изучена зависимость дисперсности кристаллической структуры льда от величины переохлаждения и концентрации криопротектора в тех же модельных системах внеклеточной среды, в которых изучали скорость роста кристаллов льда, а именно в растворах лиофилизированной плазмы крови человека, содержащих ЭГ, ДМСО, ПЭГ-1500, ПВП-12000 [302]. Дисперсность кристаллической структуры оценивали методом случайных секущих по микрофотографиям полностью закристаллизовавшегося препарата.

Экспериментальные зависимости дисперсности кристаллической структуры льда от переохлаждения при различных концентрациях исследованных криопротекторов приведены на рис. 3.12–3.15. Видно, что дисперсность льда увеличивается при увеличении концентрации криопротектора и величины переохлаждения.

Аналитические зависимости дисперсности кристаллической структуры льда от переохлаждения системы были также получены методом многомерного статистического анализа. Аппроксимацию экспериментальных данных проводили полиномами вида $y = Ax + Bx^2$. При аппроксимации удобней было воспользоваться не величинами размеров кристаллов ℓ , а обратной величиной, $1/\ell$, то есть так называемой степенью дисперсности кристаллической структуры. Как следует из данных табл. 3.7, влияние переохлаждения на степень дисперсности кристаллической структуры льда при различных концентрациях криопротекторов описывается однотипными выражениями.

Аналитические зависимости табл. 3.7 позволили оценить критические переохлаждения, при которых вклад линейного (ΔT) и квадратичного (ΔT^2) членов в степень дисперсности кристаллической структуры льда ($1/\ell$) одинаков. В табл. 3.8 приведены значения критических переохлаждений, полученные из условия $A\Delta T_k = B\Delta T_k^2$. Анализ данных о критических переохлаждениях показывает, что при повышении концентрации, в частности низкомолекулярных криопротекторов (ЭГ и ДМСО) наблюдается увеличение указанного параметра. Из этого следует, что вклад квадратичного по переохлаждению члена во влияние на степень дисперсности кристаллической структуры льда ингибируется криопротекторами более значительно, чем вклад линейного. Сопоставление данных, приведенных в табл. 3.7 и табл. 3.8 с соответствующими данными для линейной скорости роста кристаллов льда (табл. 3.4, табл. 3.6), позволяет утверждать, что в аналитических выражениях, описывающих зависимость степени дисперсности структуры льда от переохлаждения (табл. 3.7) линейный член соответствует росту кристаллов по нормальному механизму, а квадратичный – по дислокационному механизму. Таким образом,

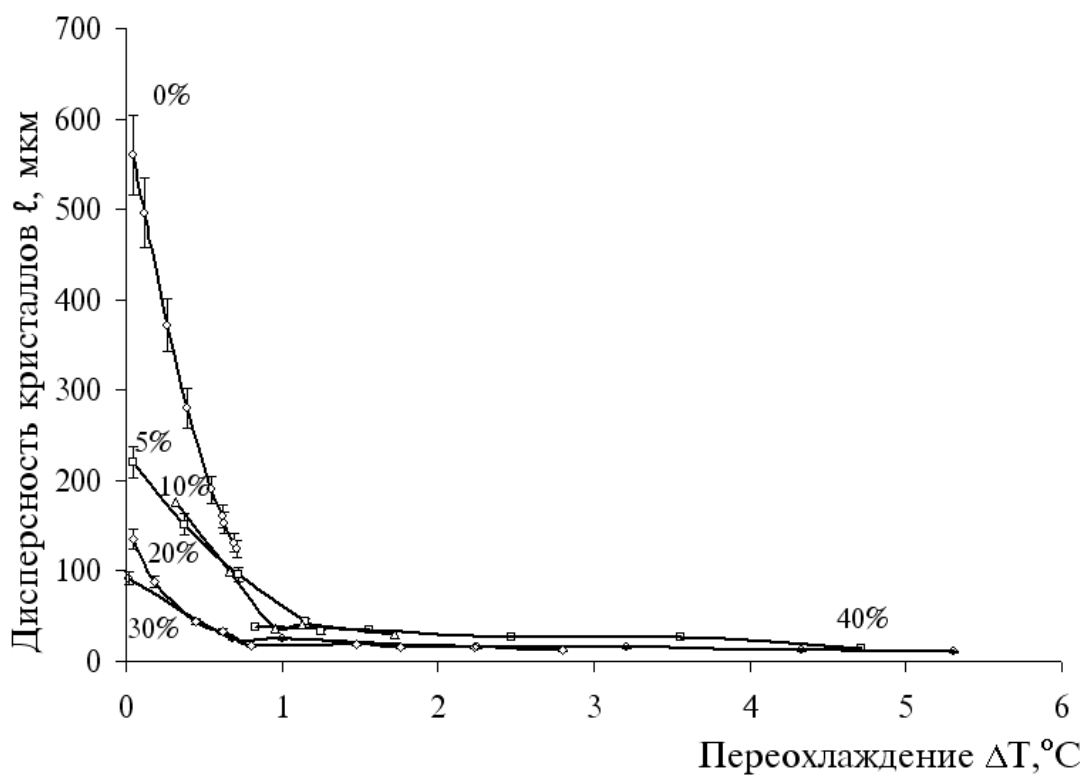


Рис. 3.12. Зависимость дисперсности кристаллов льда от переохлаждения при различной концентрации этиленгликоля в плазме крови.

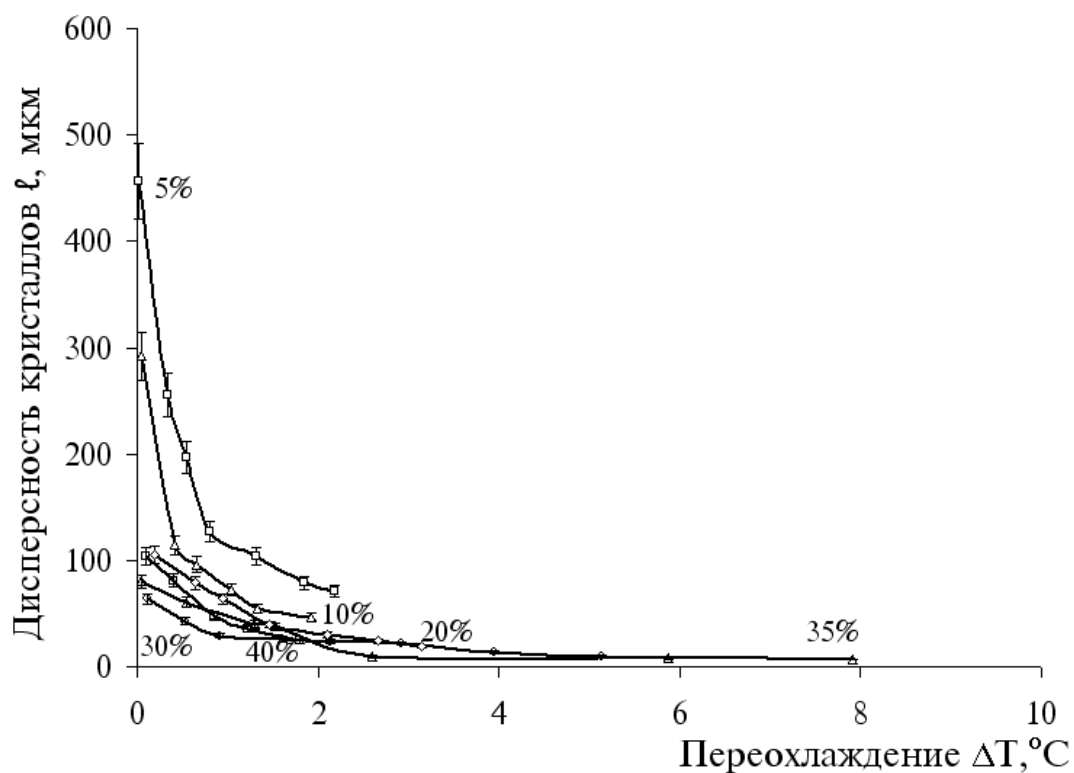


Рис. 3.13. Зависимость дисперсности кристаллов льда от переохлаждения при различной концентрации диметилсульфоксида в плазме крови.

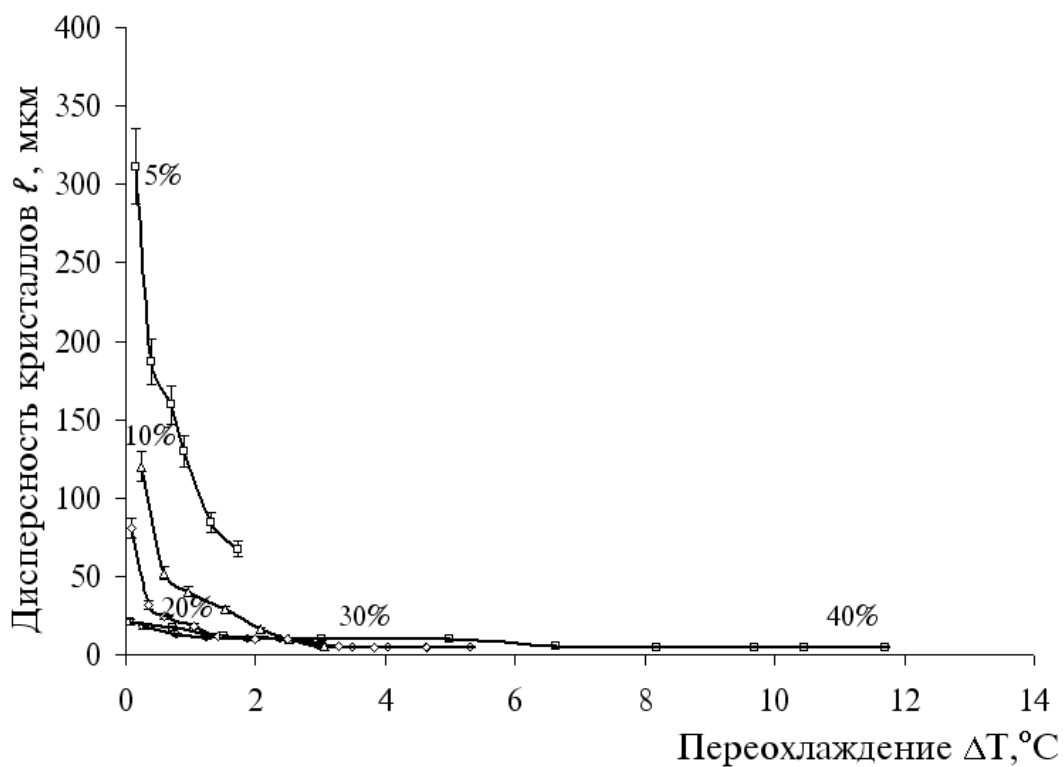


Рис. 3.14. Зависимость дисперсности кристаллов льда от переохлаждения при различной концентрации ПЭГ-1500 в плазме крови.

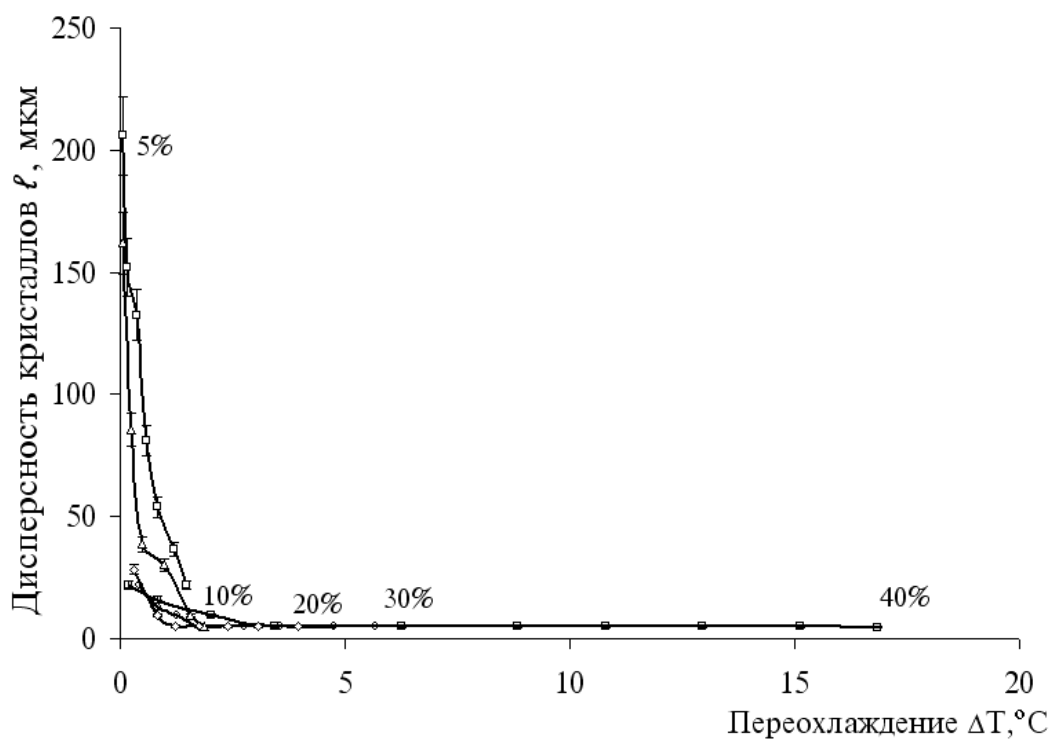


Рис. 3.15. Зависимость дисперсности кристаллов льда от переохлаждения при различной концентрации ПВП-12000 в плазме крови.

Таблица 3.7

Аналитические зависимости степени дисперсности кристаллов льда ($\frac{1}{\ell}$) от переохлаждения (ΔT).

Концентрация масс %	Этиленгликоль	Диметилсульфоксид	Полиэтиленгликоль м.м 1500	Поливинилпирролид. м.м 12000.
0	$1/\ell = 0,005\Delta T + 0,006(\Delta T)^2$	-	-	-
5	$1/\ell = 0,014\Delta T + 0,010(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,003\Delta T + 0,002(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,004\Delta T + 0,003(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,016\Delta T + 0,007(\Delta T)^2$
10	$1/\ell = 0,017\Delta T + 0,006(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,010\Delta T + 0,002(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,004\Delta T + 0,005(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,01\Delta T + 0,072(\Delta T)^2$
20	$1/\ell = 0,037\Delta T + 0,004(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,011\Delta T + 0,002(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,046\Delta T + 0,013(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,03\Delta T + 0,040(\Delta T)^2$
30	$1/\ell = 0,054\Delta T + 0,007(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,012\Delta T + 0,003(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,016\Delta T + 0,016(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,013\Delta T + 0,023(\Delta T)^2$
35	-	$1/\ell = 0,020\Delta T + 0,001(\Delta T)^2$	-	-
40	$1/\ell = 0,010\Delta T + 0,001(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,024\Delta T + 0,001(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,036\Delta T + 0,005(\Delta T)^2$	$1/\ell = 0,014\Delta T + 0,018(\Delta T)^2$

Таблица 3.8

Критические переохлаждения системы, при которых вклад линейного (ΔT) и квадратичного (ΔT^2) членов аналитических зависимостей в степень дисперсности кристаллической структуры льда ($1/\ell$) одинаков.

С, масс %	Критические переохлаждения, ΔT_k , °С			
	Этиленгликоль	ДМСО	ПЭГ-1500	ПВП-12000
0	0,83	0,83	0,83	0,83
5,0	1,40	1,50	1,33	2,28
10,0	2,83	5,00	0,80	0,14
20,0	9,25	-	3,54	0,91
30,0	7,71	4,00	1,00	0,57
40,0	10,00	24,00	7,20	0,78

в формировании кристаллической структуры льда различной дисперсности участвуют оба механизма роста реальных кристаллов.

Дисперсность кристаллической структуры является функцией двух конкурирующих процессов: скорости роста грани кристалла v и скорости образования на грани растущего кристалла центров роста I_u :

$$\ell = \frac{f(v)}{f(I_u)} \quad (3.9)$$

Если допустить, что указанные зависимости (3.9) являются линейными, то дисперсность кристаллической структуры можно оценить как

$$\ell = \frac{v}{I_u} \quad (3.10)$$

Используя выражение (3.10) и экспериментальные данные о зависимости линейной скорости роста кристаллов льда (рис. 3.4–3.7) и дисперсности кристаллической структуры (рис. 3.12–3.15) от переохлаждения мы рассчитали значения скорости образования центров роста на грани кристалла льда при переохлаждении $\Delta T = 1^\circ\text{C}$ (табл. 3.9). Анализ представленных в табл. 3.9 данных

Таблица 3.9

Расчетная зависимость скорости образования центров роста (I_u) на грани кристалла от концентрации криопротектора при переохлаждении $\Delta T = 1^\circ\text{C}$.

Концентрация С, масс%	Скорость образования центров роста (I_u) на грани кристалла льда, 1/с			
	Этиленгликоль	ДМСО	ПЭГ-1500	ПВП-12000
0	2,58	2,58	2,58	2,58
5,0	0,84	0,25	0,82	5,33
10,0	0,60	0,79	0,41	7,46
20,0	0,61	0,50	2,13	0,19
30,0	0,42	0,28	0,45	0,69
40,0	0,01	0,03	0,27	0,35

показывает, что при содержании в растворах 5% ЭГ, ДМСО и ПЭГ-1500 наблюдается резкое снижение скорости образования центров роста. С увеличением концентрации криопротекторов темп ингибирования скорости образования центров роста замедляется. В присутствии ПВП-12000 при концентрации 5 и 10%, наоборот, наблюдается существенное повышение скорости образования центров роста, а при дальнейшем увеличении концентрации она так же, как и для других криопротекторов, понижается. Полученные данные свидетельствуют о том, что влияние криопротекторов на скорость образования центров роста проявляется двояко: возможно как ингибирование, так и активизация этого процесса.

Для выяснения характера влияния концентрации криопротекторов на дисперсность кристаллической структуры при заданном переохлаждении экспериментальные данные о зависимости дисперсности кристаллической структуры от переохлаждения (рис. 3.12–3.15) были аппроксимированы полиномом вида $y = A + Bx + Cx^2$, где x – концентрация криопротектора. Полученные аналитические зависимости дисперсности кристаллов льда от концентрации криопротекторов при переохлаждении $\Delta T = 0,5^\circ\text{C}$ имеют

следующий вид:

$$\text{для этиленгликоля:} \quad \ell = 210,0 - 13,60C + 0,28C^2 \quad (3.11);$$

$$\text{для ДМСО:} \quad \ell = 232,0 - 11,80C + 0,20C^2 \quad (3.12);$$

$$\text{для ПЭГ-1500:} \quad \ell = 216,0 - 14,80C + 0,26C^2 \quad (3.13);$$

$$\text{для ПВП-12000:} \quad \ell = 180,6 - 14,00C + 0,26C^2 \quad (3.14)$$

Как видно, эти зависимости однотипны и имеют близкие значения коэффициентов регрессии, что свидетельствует об универсальном характере влияния концентрации криопротекторов на дисперсность образующейся в их присутствии кристаллической структуры льда. Из уравнений регрессии (3.11–3.14) следует, что при заданном переохлаждении ($\Delta T = 0,5^\circ\text{C}$) повышение концентрации ЭГ в растворе до 48,6%, ДМСО до 59,0%, ПЭГ-1500 до 56,9%, ПВП-12000 до 53,8% приводит к увеличению дисперсности кристаллов льда, а при дальнейшем повышении концентрации криопротекторов дисперсность уменьшается. По-видимому, превышение указанных значений концентраций меняет механизм ингибирующего влияния криопротекторов на кинетические процессы, определяющие дисперсность кристаллической структуры: до приведенных выше концентраций превалирует ингибирование скорости роста грани кристалла, а при больших концентрациях – ингибирование скорости образования центров роста.

Таким образом, повышение концентрации криопротекторов во внеклеточной среде, как правило, приводит к замедлению скорости роста кристаллов льда и к уменьшению их размера.

Исследованные нами криопротекторы можно рассматривать как примеси, которые представляют собой класс модификаторов процесса кристаллизации хорошо растворимых в жидкой фазе [303] и не растворимых в кристаллическом зародыше, то есть не встраивающихся в кристаллическую решетку льда. Следовательно, влияние этих криопротекторов на исследуемый процесс проявляется, в основном, вследствие изменения состава границы раздела “кристалл–раствор” [304]. Возможные эффекты такого влияния криопротекторов на кинетические характеристики внеклеточного льдообразования можно оценить,

исходя из флуктуационной теории зарождения и роста кристаллов.

Согласно флуктуационной теории [93–96, 233] скорость зарождения центров кристаллизации I_u в объеме переохлажденной жидкости представляет собой вероятностный процесс и определяется формулой:

$$I_u = K e^{-\frac{B\sigma^3}{T(\Delta T)^2}} = K e^{-\frac{U}{RT}} e^{-\frac{B\sigma^3}{T(\Delta T)^2}}, \quad (3.15)$$

где K – кинетический коэффициент, определяющийся подвижностью молекул кристаллизующегося вещества при переходе из переохлажденной жидкости в зародыш новой фазы; $\frac{B\sigma^3}{(\Delta T)^2}$ – работа образования зародыша критического размера (3.5). Величина поверхностного натяжения σ между зародышем и переохлажденной жидкостью входит в числитель показателя степени в выражении (3.15) в кубе и играет существенную роль, сдвигая зависимость скорости образования зародышей от переохлаждения в сторону больших или меньших переохлаждений в зависимости от увеличения или уменьшения своего значения. Зависимость частоты зарождения центров кристаллизации в переохлажденной жидкости от подвижности молекул вещества, образующего кристалл, учитывается в уравнении (3.15) множителем $e^{-\frac{U}{RT}}$. Взаимное влияние обоих указанных выше факторов (термодинамического и кинетического) и определяет скорость зарождения центров кристаллизации. Аналогичной формулой в соответствии с флуктуационной теорией, как указывалось выше, определяется и скорость роста кристаллов v (3.4).

Таким образом, количество возникающих центров кристаллизации и скорость их роста зависят как от параметров характеризующих кристаллизующееся вещество (B , σ , U), так и от внешних условий (T). Отвод тепла от кристаллизующегося раствора относится к тем внешним факторам, которые создают условия для зарождения и роста кристаллов. Наличие в жидкой фазе даже незначительного количества растворимых примесей может оказывать влияние на величину поверхностного натяжения σ и энергию активации U и тем самым смещать границу метастабильности, определять микроструктуру, размер и

форму образующихся кристаллов. Кинетический эффект влияния примеси таков, что если ее массовая концентрация в кристаллизующейся системе составляет всего $10^{-4}\%$ и даже меньше, скорость роста кристаллов нередко снижается в 2–3 раза [27]. Экспериментально установлено, что растворимые примеси способны как ускорять процесс возникновения зародышей новой фазы, так и затруднять его [305, 306].

Модифицирующее действие растворимых в жидкой фазе примесей на механизм и кинетику процессов кристаллизации, а также образующуюся кристаллическую структуру может быть обусловлено адсорбционной активностью примеси [27, 233]. Количество молекул примеси Γ , адсорбирующихся на единицу площади поверхности раздела фаз, определяется из уравнения адсорбции Гиббса:

$$\Gamma = -\frac{c}{RT} \frac{\partial \sigma}{\partial c}, \quad (3.16)$$

где, c – концентрация растворенной примеси. Производная $\frac{\partial \sigma}{\partial c}$ служит мерой способности примеси изменять поверхностное натяжение на межфазной границе, так называемая поверхностная активность вещества. В случае примесей, входящих в раствор и не встраивающихся в кристаллическую решетку, на поверхности кристалла происходит физическая адсорбция, при которой взаимодействие осуществляется водородными и другими более слабыми связями (1–5 ккал/моль) [27].

Поскольку рост кристаллического зародыша сопровождается вытеснением молекул растворимой примеси в жидкую фазу, у растущей грани кристалла образуется слой с повышенной концентрацией примеси. Толщина пограничного слоя определяется, прежде всего, соотношением между скоростью отвода растворимых молекул путем диффузии и скоростью пополнения вследствие роста зародыша. При определенных значениях коэффициента диффузии и скорости роста зародыша на распределение концентрации примеси в граничном слое будет оказывать влияние поверхностная активность растворенного вещества. Исходя из уравнения адсорбции Гиббса (3.16), при отрицательной поверхностной

активности ($\frac{\partial\sigma}{\partial c} < 0$) растворенные молекулы примеси должны концентрироваться около поверхности кристаллического зародыша, поскольку при этом понижается межфазная поверхностная энергия σ . Напротив, при положительной поверхностной активности ($\frac{\partial\sigma}{\partial c} > 0$) межфазная поверхностная энергия σ увеличивается с ростом концентрации примеси у поверхности раздела фаз и поэтому энергетически выгодно является удаление молекул примеси от поверхности кристаллического зародыша [306]. Таким образом, в условиях, когда кристалл растет, вытесняя растворимую примесь в жидкую фазу, примесь может не только понижать поверхностное натяжение σ , но и повышать его, если она характеризуется положительным значением величины $d\sigma/dc$.

Рост концентрации растворенных молекул примеси у грани растущего кристалла затрудняет поступление кристаллизующегося вещества из материнской фазы к зародышу. В свою очередь, это ведет к увеличению энергии активации U и, следовательно, к уменьшению скорости образования зародышей $I_{\text{ц}}$, что приводит к смещению границы метастабильности в сторону больших переохлаждений. Если растворимая примесь вблизи грани растущего зародыша имеет отрицательную поверхностную активностью $\frac{\partial\sigma}{\partial c} < 0$ то, адсорбируясь на грани кристалла, она способствует понижению межфазной энергии σ , и, следовательно, уменьшению работы образования зародышей критического размера W . В результате этого увеличивается скорость образования центров новой фазы $I_{\text{ц}}$, причем тем значительней, чем сильнее примесь понижает поверхностное натяжение на межфазной границе.

Из вышеизложенного следует, что при заданном переохлаждении формирование около растущей грани кристалла льда более концентрированного раствора криопротектора, чем в объеме маточного раствора, с одной стороны, может облегчать процесс двухмерного зародышеобразования на поверхности кристалла за счет адсорбции на ней молекул криопротектора, как это имеет место в случае 5 и 10% концентрации ПВП-1200. Вследствие увеличения скорости

образования зародышей на грани кристалла увеличивается скорость его роста. С другой стороны, концентрированный слой криопротектора ограничивает доступ молекул воды, который необходим для достройки кристаллической решетки льда, как из-за понижения скорости диффузии молекул воды к растущему кристаллу, так и за счет связывания молекул воды криопротектором, причем тем сильнее, чем прочнее эта связь. Суперпозиция указанных эффектов приводит к тому, что количество центров роста, возникающих в единицу времени в единице объема биологического раствора, возрастает, скорость их разрастания уменьшается, в результате чего происходит измельчение кристаллической структуры льда. Поскольку характер связей и атомная шероховатость растущих граней различных индексов различны, то и энергия адсорбции молекул или группы молекул на разных гранях имеют различное значение. Специфическая адсорбция молекул криопротектора на гранях первичных кристаллов льда с различными индексами приводит к анизотропии скорости роста кристалла, в результате чего в процессе кристаллизации искажается его форма. На условия массо – и теплообмена у растущей грани кристалла значительное влияние оказывает вязкость раствора, которая замедляет или даже полностью исключает концентрационные токи. В результате торможения концентрационных токов растущая поверхность кристалла не может быстро освободиться от выделяющейся при кристаллизации теплоты, которая накапливается и не только снижает скорость роста, но и обуславливает преимущественный рост кристалла по вершинам и ребрам, содействуя тем самым образованию дендритов [233]. При дендритном росте к измельчению структуры льда приводит возникновение осей высших порядков. Повышение концентрации криопротектора в растворе может привести к полному блокированию роста и зарождения кристаллов льда, как вследствие повышения вязкости раствора, так и вследствие связывания максимально возможного количества молекул воды и высокой прочности этой связи. В этом случае даже при наличии свободных молекул воды их количество может оказаться недостаточным для образования зародышей критического размера.

Таким образом, физико-химические свойства криопротекторов, такие, как вязкость, поверхностная активность, прочность связи криопротектор–вода молекулярная масса, влияют на кинетические характеристики процесса внеклеточного льдообразования и определяют его особенности для различных видов криопротекторов. Как известно понижение температуры нуклеации в водных растворах низкомолекулярных криопротекторов обусловлено коллигативным свойством. В то же время для водных растворов полимеров это свойство сохраняется только до молекулярной массы 600 [307]. Методом эмульсий Д. Н. Rasmussen с соавт. [308] показали, что специфическая способность веществ переохлаждаться может быть охарактеризована коэффициентом пропорциональности λ между депрессией температуры гомогенного зародышеобразования ΔT_{fhom} и депрессией температуры плавления ΔT_m ($\Delta T_{fhom} = \lambda \Delta T_m$). И если для водных растворов низкомолекулярных криопротекторов λ не более 2 [308], то для водных растворов полимеров λ около 4 – 5 [309]. Значение λ возрастает с увеличением молекулярной массы и зависит от вида полимера. Так, для полимеров ПЭГ, ПВП и декстрана, имеющих одинаковую молекулярную массу 10000, λ изменяется в следующей последовательности ПЭГ > ПВП > декстран. Как установлено, это связано с тем, что водный раствор ПЭГ-10000 имеет наибольшее значение вязкости. Существенную роль в специфической способности полимеров к значительному переохлаждению играет состояние молекулярной цепи полимера в растворе [307]. Молекулы полимеров с м.м. ниже 600 в водном растворе имеют высокую степень изгиба. При увеличении молекулярной массы форма молекулы приближается к цепи. А молекулы полимера с м.м. выше 600 принимают в растворе случайную конформацию спирали, что существенно повышает внутреннюю вязкость полимера и снижает коэффициент самодиффузии воды. В связи с этим снижается скорость образования критического зародыша льда и скорость его роста, что и приводит к существенному переохлаждению.

Сравнительный анализ влияния физико-химических свойств ряда криопротекторов на линейную скорость роста v и размер кристаллов льда ℓ ,

проведенный в работе [300], показал, что скорость роста кристаллов льда в большей степени зависит от вязкости раствора, а дисперсность структуры – от поверхностной активности. По данным авторов работы [300] ПВП-12000 по сравнению с ЭГ, ДМСО, ПЭГ-1500 обладает высокой энергией связи молекул с водой, наибольшими значениями вязкости ($5,21 \times 10^{-3}$ Па.с при °С) и поверхностной активности (159,0 Н/ м моль). Это позволяет утверждать, что установленное нами увеличение скорости образования центров роста на грани кристалла льда в присутствии 5 и 10% концентрации ПВП-12000 (табл. 3.9) может быть обусловлено именно повышенной адсорбционной активностью этого криопротектора, в результате которой снижается поверхностная энергия на межфазной границе “кристалл–раствор”. А резкое снижение скорости образования центров роста при концентрации ПВП-12000 в растворе выше 10% обусловлено увеличением энергетического барьера перехода молекул воды в кристалл, связанного как высокой вязкостью растворов ПВП-12000, так и с более выраженной способностью данного криопротектора прочно связывать воду.

Значительное снижение поверхностного натяжения σ на границе раздела “зародыш – переохлажденная жидкость” свойственно поверхностно-активным веществам (ПАВ) [306]. В зависимости от экспериментальных условий эти вещества способны как активировать, так и ингибировать кристаллизационные процессы [310]. По характеру влияния на кинетику кристаллообразования поверхностно-активные вещества делятся на две группы [311]. К первой группе относятся вещества, которые не изменяют форму кристаллов, но увеличивают степень их дисперсности (спирты, амины, фенолы). Ко второй группе относятся вещества, способные изменять форму кристаллов, что обусловлено необратимой адсорбцией этих поверхностно-активных веществ преимущественно гранями растущего кристалла определенного порядка (желатин, сапонин).

Нами с целью выявления наиболее эффективно влияющих на скорость образования центров роста и скорость роста кристаллов льда в растворе лиофилизированной плазмы крови человека поверхностно-активных веществ исследован ряд полимерных и мономерных ПАВ. Рост кристаллов льда изучали

при концентрации ПАВ 0,5 и 1,0 масс% и переохлаждении растворов равном 0,65°C.

Как следует из данных, приведенных в табл. 3.10, наличие в растворе лиофилизированной плазмы крови человека 0,5% концентрации поверхностно-активных веществ снижает скорость роста кристаллов льда и приводит к увеличению их размера. Исключением является поливиниловый спирт, в присутствии которого снижаются оба этих показателя. Повышение концентрации

Таблица 3.10

Влияние поверхностно-активных веществ на скорость роста (v) и размер кристаллов льда (ℓ) при переохлаждении системы $\Delta T=0,65^\circ\text{C}$.

Кинетические характеристики	v , мкм/с		ℓ , мкм	
лиофилизированная плазма	69±3,31		154±12,01	
Поверхностно-активные вещества	0,5%	1,0%	0,5%	1,0%
гидролизированный полиакрилонитрил	52±2,50	38±1,82	210±16,40	262±20,44
поливиниловый спирт	41±1,97	-	50±3,90	-
полиакриламид	21±1,01	-	230±17,90	-
карбоксиметилцеллюлоза	25±1,20	17±0,82	220±17,20	369±28,78
полиоксиацетиленсорбитоллаурат	70±3,37	-	158±12,32	-
ОС-20	68±3,26	-	152±11,86	-
алкилоламид	60±2,88	-	160±12,48	-
СВ-133	65±3,12	53±2,54	174±13,57	215±16,77
ОП-10	69±3,31	-	158±12,32	-
тетрамон	68±3,20	-	158±12,32	-
триамон	35±1,68	-	230±17,94	-
гексаметафосфат натрия	40±1,92	29±1,39	210±16,38	308±20,02

поверхностно-активных веществ в растворе до 1,0% приводит к аналогичным

эффектам. Наиболее значительному увеличению размеров кристаллов льда способствуют такие полимерные поверхностно-активные вещества, как полиакриламид, карбоксиметилцеллюлоза, гидрализированный полиакрилонитрил, а также такие мономерные поверхностно-активные вещества, как триамон и гексаметафосфат натрия.

Механизм влияния исследованных поверхностно-активных веществ на скорость роста и размер кристаллов льда в общем можно объяснить описанным выше двойственным проявлением адсорбции их молекул на грани растущего кристалла. С одной стороны, в результате адсорбции молекул поверхностно-активных веществ на грани кристалла снижается межфазная энергия, что повышает вероятность массового образования на ней двухмерных центров роста и, как следствие, увеличивается линейная скорость роста кристалла. Дисперсность же структуры образующегося льда, увеличивается, поскольку центров роста в единице объема растущего кристалла достаточно много. С другой стороны, сам адсорбционный слой молекул поверхностно-активных веществ у растущей грани кристалла затрудняет массообмен водой между кристаллом и окружающей его жидкой фазой, в результате чего снижается как скорость роста кристалла, так и скорость образования на его поверхности центров роста. В этом случае дисперсность структуры образующегося льда уменьшается, поскольку количество центров роста в единице объема растущего кристалла мало. Оба механизма влияния адсорбционного слоя молекул поверхностно-активных веществ на скорость роста кристалла и скорость образования центров роста могут проявляться в разных экспериментальных условиях в разной степени.

Из полученных результатов следует, что снижение скорости роста и увеличение размеров кристаллов льда в присутствии гидрализованного полиакрилонитрила, полиакриламида, карбоксиметилцеллюлозы, алкилоамида, СВ-133, триамона и гексаметафосфата натрия может быть обусловлено преобладающим ингибирующим действием адсорбционного слоя молекул этих веществ, как на скорость роста грани, так и на скорость образования центров

роста. Снижение скорости роста грани в присутствии поливинилового спирта, по-видимому, также связано с замедлением процессов массопереноса у растущей грани, тогда как уменьшение размеров кристаллов льда обусловлено значительным снижением поверхностной энергии на границе “кристалл–раствор”, следствием которого является активное образование центров роста.

Таким образом, анализ результатов показал, что наиболее выраженным ингибирующим влиянием на скорость образования центров роста и скорость роста грани кристалла обладает карбоксиметилцеллюлоза.

3.4. Сравнительный анализ влияния основных факторов на кинетические характеристики внеклеточного льдообразования

В соответствии с полученными в п.п. 3.2, 3.3 результатами скорость роста кристаллов льда и дисперсность кристаллической структуры в системе, моделирующей внеклеточную среду, существенно зависят от величины переохлаждения этой системы, а также от присутствия в ней криопротекторов и поверхностно-активных веществ. По-видимому, сила влияния данных факторов на кинетические характеристики внеклеточного льдообразования может быть разной и, кроме того, не исключено их взаимное влияние на процессы кристаллообразования.

С помощью быстрых методов статистического планирования и обработки многофакторных экспериментов нами был проведен сравнительный анализ влияния вышеуказанных факторов на кинетические характеристики льдообразования в модели внеклеточной среды на основе раствора лиофилизированной плазмы крови человека с целью определения силы их влияния [312]. В качестве наиболее эффективно влияющих на кристаллизационные процессы примесей были выбраны этиленгликоль и поверхностно-активное вещество карбоксиметилцеллюлоза.

В табл. 3.11 приведена матрица плана трехфакторного эксперимента. Факторы варьировали в следующих пределах: переохлаждение системы при

росте кристаллов льда (x_1) – 0,2–0,5°C; концентрация ЭГ (x_2) – 2,0–5,0 масс%; концентрация карбоксиметилцеллюлозы (x_3) – 0,25–1,0 масс%. Функциями отклика являлись скорость роста (y_1) и размер образующихся кристаллов льда (y_2). Обработка экспериментальных данных позволила получить адекватные уравнения, описывающие зависимость скорости роста и размера образующихся

Таблица 3.11

Матрица плана эксперимента и значения функций отклика.

N п.п.	уровни варьирования факторов			функции отклика	
	x_1	x_2	x_3	y_1	y_2
1	0,2	2,0	0,25	17	340
2	0,5	2,0	0,25	91	164
3	0,2	5,0	0,25	6	210
4	0,5	5,0	0,25	37	90
5	0,2	2,0	1,0	19	500
6	0,5	2,0	1,0	60	170
7	0,2	5,0	1,0	12	206
8	0,5	5,0	1,0	39	138

кристаллов льда от переохлаждения, концентрации ЭГ и поверхностно-активного вещества карбоксиметилцеллюлозы (3.17) и (3.18):

$$y_1 = 35,1 + 21,6x_1 - 11,6x_2 - 2,6x_3 - 7,1x_1x_2 - 4,6x_1x_3 + 4,6x_2x_3 \quad (3.17)$$

$$y_2 = 227,2 - 86,8x_1 - 66,2x_2 + 26,2x_3 + 39,7x_1x_2 - 12,8x_1x_3 - 15,2x_2x_3 \quad (3.18)$$

Уравнения (3.17) и (3.18) свидетельствует о значительном и сложном влиянии исследованных факторов на кинетические характеристики роста кристаллов льда. Как видно, существует не только выраженное одиночное, но и взаимное влияние всех факторов, как на скорость роста, так и на дисперсность формирующейся структуры. Анализ уравнений регрессии приводит к следующим заключениям.

Увеличение переохлаждения, которое коррелирует с увеличением скорости теплоотвода от охлаждаемой системы, значительно повышает скорость роста и уменьшает размеры образующихся кристаллов льда. Увеличение концентрации этиленгликоля уменьшает и скорость роста, и размер кристаллов льда. Повышение концентрации карбоксиметилцеллюлозы незначительно влияет на скорость роста кристаллов льда, однако существенно увеличивает их размеры. Таким образом, совместное влияние данных факторов на кинетические характеристики льдообразования согласуется с полученными нами ранее данными (см. п.п. 3.2, 3.3) о влиянии на исследуемый процесс каждого из факторов x_1 , x_2 , x_3 в отдельности.

Сравнительный анализ парного влияния исследованных факторов на кинетические характеристики льдообразования позволил установить следующее. Ингибирующее влияние этиленгликоля на скорость роста более существенно проявляется при повышенных значениях переохлаждения, и в то же время его влияние на уменьшение размера кристаллов льда более существенно при меньших переохлаждениях. Карбоксиметилцеллюлоза также ингибирует скорость роста льда более значительно при больших переохлаждениях, в то время как укрупнению кристаллов льда она способствует преимущественно при малых переохлаждениях. Взаимодействие между этиленгликолем и карбоксиметилцеллюлозой приводит к снижению эффективности их индивидуального влияния на ингибирование скорости роста и увеличение кристаллов. Например, как показывает расчет по уравнению (3.18), при повышении концентрации этиленгликоля до 6,6 масс% эффект укрупнения кристаллов льда 1 масс% карбоксиметилцеллюлозой падает до нуля.

Таким образом, сравнительная оценка значений коэффициентов одиночного и парного влияния факторов согласно уравнениям (3.17) и (3.18) показала, что в исследуемом диапазоне значений переохлаждения системы, концентрации этиленгликоля и карбоксиметилцеллюлозы наиболее существенно влияющим фактором на кристаллизационные процессы является переохлаждение. Влияние концентрации этиленгликоля и

карбоксиметилцеллюлозы является вторичным и менее выраженным.

3.5. Влияние режимов замораживания на структурные особенности льдообразования в водных растворах криопротекторов

Структурные особенности льдообразования в водных растворах глицерина, оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n=5$, сахарозы, полиэтиленоксидов со среднечисловой молекулярной массой 400, 3000 в зависимости от скорости охлаждения и концентрации криопротектора были исследованы методом низкотемпературной рентгенографии. Охлаждение растворов проводили от комнатной температуры 24°C до температуры -140°C по следующим программам: двухэтапно со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры фазового перехода с выдержкой на плато кристаллизации до завершения процесса выделения теплоты кристаллизации и далее со скоростью $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; одноэтапно медленно со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и одноэтапно быстро со скоростью $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Концентрацию криопротекторов варьировали в пределах 0–100 масс% [313, 314].

Рентгенограммы замороженных водных растворов криопротекторов были идентифицированы путем сопоставления рассчитанных на основании геометрических условий съемки и уравнения Вульфа-Брегга межплоскостных расстояний отражающих плоскостей, соответствующих определенным дебаевским кольцам, и известных из литературы данных о межплоскостных расстояниях, характерных для кристаллической решетки гексагонального льда [252, 253, 315]. Измеряя диаметры дебаевских колец D на рентгенограммах, находили соответствующие углы отражения из равенства $\text{tg}2\theta = D/2A$, где A – расстояние от пленки до образца. Затем из условия отражения Вульфа-Брегга $2d\sin\theta = n\lambda$ рассчитывали межплоскостные расстояния d . Приведенные в табл. 3.12 расчетные значения межплоскостных расстояний хорошо согласуются с литературными и свидетельствуют о том, что растворы криопротекторов кристаллизуются с образованием поликристаллического льда гексагональной

Таблица 3.12

Расчетные межплоскостные расстояния d отражающих плоскостей кристаллов льда в замороженных водных растворах криопротекторов.

Межплоскостные расстояния d , Å			Индексы отражающих плоскостей hkl [252, 253, 315].
расчетные	литературные		
	[252, 253]	[315]	
3,80	3,92	3,897	100
3,40	3,44	3,441	101
2,69	2,68	2,671	102
2,20	2,26	2,249	110
2,08	2,065	2,072	103
1,95	1,92	1,918	112

модификации.

Сравнение рентгенограмм, полученных при замораживании водных растворов криопротекторов в концентрационном диапазоне 0 – 20 масс% по двухэтапной и медленной одноэтапной программе, показало отсутствие существенных качественных различий между ними.

На рис. 3.16 – 3.21 приведены наиболее характерные рентгенограммы замороженных водных растворов исследованных криопротекторов в зависимости от концентрации и режимов охлаждения.

Рентгенограммы дистиллированной воды, замороженной по двухэтапной программе (рис. 3.16, 1) характеризуются хаотическим распределением рефлексов от кристаллических зерен размером до 74,2 мкм, что свидетельствует о возникновении крупнокристаллической структуры типа искаженного монокристалла [6, 252]. Присутствие криопротекторов в водных растворах приводит к формированию дебаевских колец, четкость границ которых усиливается по мере повышения концентрации криопротектора. Собственное рассеивание от молекул криопротекторов в замороженных водных растворах представляет собой размытое гало в области малых углов, интенсивность

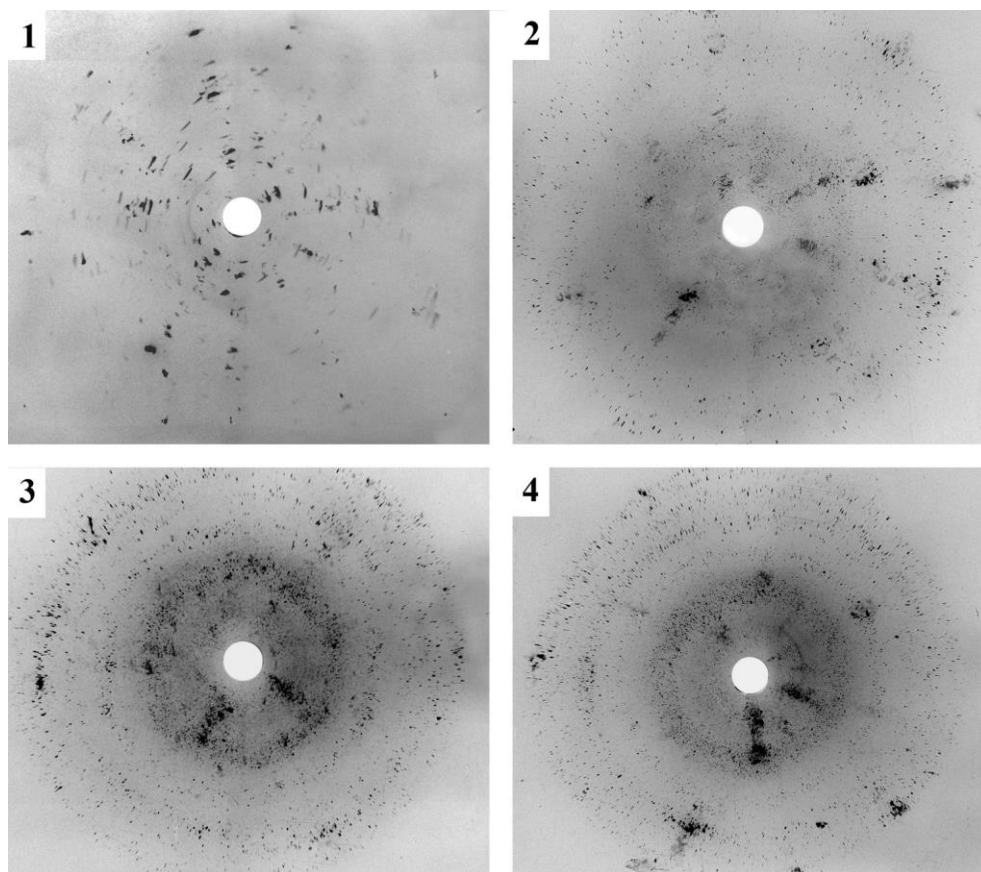


Рис. 3.16. Рентгенограммы воды и водных растворов сахарозы, замороженных по двухэтапной программе: 1 – дистиллированная вода; сахароза: 2 – 5%; 3 – 10%; 4 – 15%.

которого возрастает при повышении концентрации криопротекторов (рис. 3.16, 2–4).

В табл. 3.13 приведены средние линейные размеры кристаллов льда (ℓ , мкм), образующихся при замораживании растворов криопротекторов по двухэтапной программе в диапазоне концентраций от 5 до 15%, в котором рефлексy от кристаллических зерен дискретны и количественный анализ был достоверен. При дальнейшем увеличении концентрации криопротекторов дебаевские кольца становились более плотными, что затрудняло количественный подсчет рефлексов. Из данных табл. 3.13 следует, что присутствие криопротекторов в растворе только в 5% концентрации уже измельчает структуру по сравнению с дистиллированной водой в среднем в 3 раза (рис. 3.16, 2, рис.

3.17, 1,4 рис. 3.18, 1, 4). Дисперсность кристаллов льда зависит как от вида криопротектора, так и его концентрации в растворе.

Таблица 3.13

Дисперсность кристаллов льда (ℓ , мкм) в зависимости от концентрации криопротекторов в растворе.

Концентрация, С, масс%	Криопротекторы				
	ПЭО-400	сахароза	глицерин	ОЭГ(n=5)	ПЭО-3000
5,0	28,9	27,6	23,1	20,5	18,9
10,0	22,5	21,0	18,7	17,8	16,2
15,0	17,6	17,4	16,6	15,4	-

Качественный анализ наиболее характерных структурных особенностей замороженных по двухэтапной программе водных растворов исследованных криопротекторов показал следующее. При возрастании концентрации криопротекторов в растворах на рентгенограммах отмечается расширение рефлексов в радиальном направлении, свидетельствующее о наличии внутри зерен неоднородных микронапряжений (рис. 3.16, 4, рис. 3.17, 4, рис. 3.18, 2, 4) [252]. Имеются достаточно крупные, яркие рефлексы от слившихся кристаллов с малой разориентацией (рис. 3.17, 2, 5, рис. 3.18, 5). Встречается расщепление рефлексов (рис. 3.17, 6, рис. 3.18, 3) характерное для так называемой “мозаичной структуры” или субструктуры, представляющей собой отдельные совершенные по структуре кристаллические блоки, повернутые относительно друг друга на очень небольшие углы [27, 316]. Все это свидетельствует о значительной дефектности кристаллов льда, которая возникает в процессе роста как в связи с наличием молекул растворимой примеси – криопротектора, препятствующей нормальному росту, так и с возникновением температурных и концентрационных градиентов. По мере повышения концентрации криопротекторов в растворе плотность рефлексов в сферической проекции значительно возрастает. Наблюдается неравномерное распределение интенсивности вдоль колец, свидетельствующее о появлении неэквивалентных направлений роста, и,

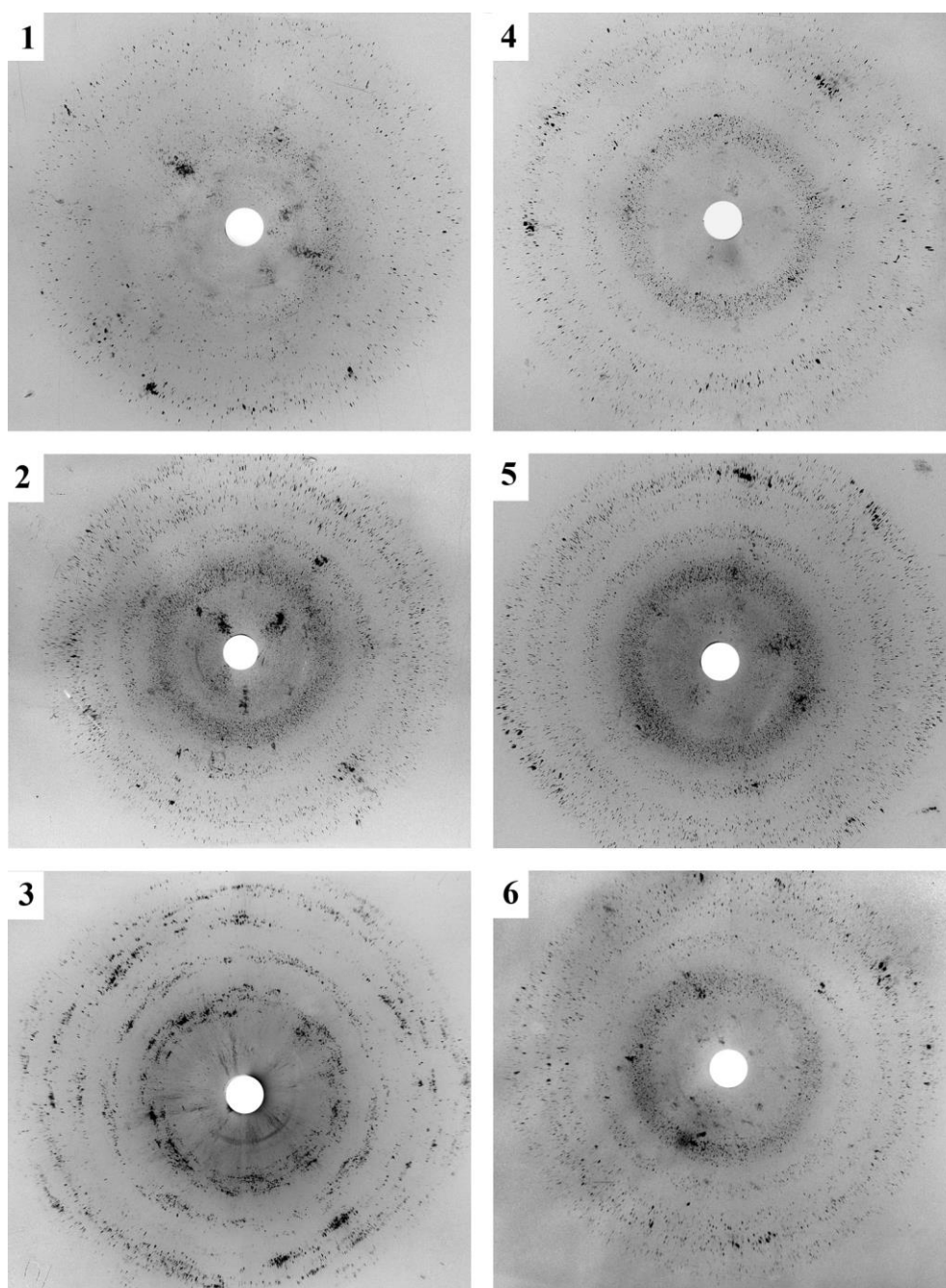


Рис. 3.17. Рентгенограммы водных растворов глицерина (1–3) и ОЭГ_{n=5} (4–6), замороженных по двухэтапной программе: 1, 4 – 5%; 2, 5 – 10%; 3, 6 – 15%.

следовательно, об исчезновении беспорядка в ориентациях кристаллов и возникновении преимущественных кристаллографических ориентаций. Рефлексы, хотя еще и дискретны, но частично перекрываются, создавая плотные участки, и идентификация их усложняется (рис. 3.17, 3, рис. 3.18, 6). Формирование сплошных и тонких колец свидетельствует о возникновении

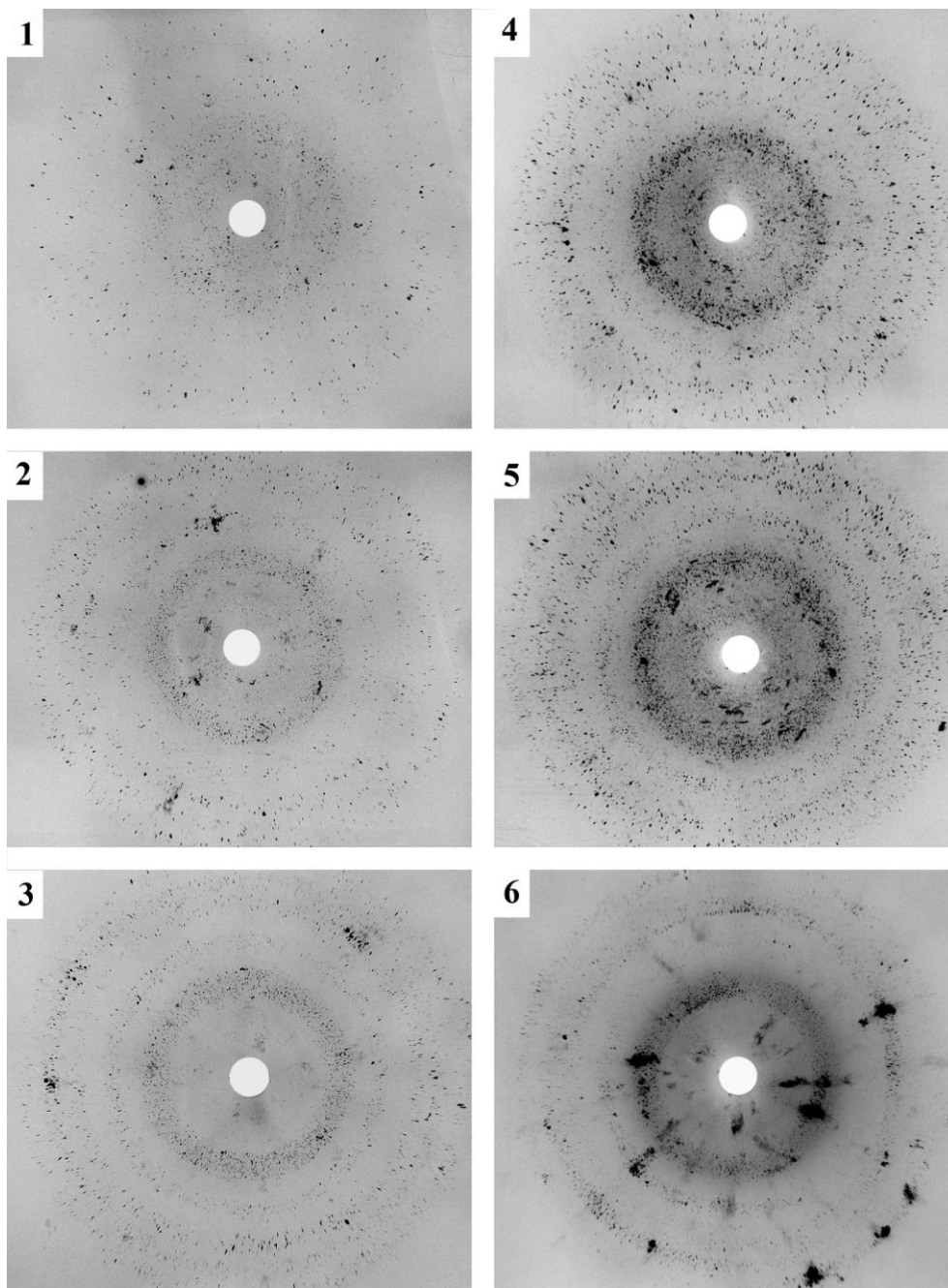


Рис. 3.18. Рентгенограммы водных растворов ПЭО-400 (1–3) и ПЭО-3000 (4–6), замороженных по двухэтапной программе: 1, 4 – 5%; 2, 5 – 10%; 3, 6 – 15%.

кристаллических структур, дисперсность которых лежит в пределах от 10 до 1 мкм (рис. 3.19, 1)

Для растворов ПЭО-400 была определена критическая концентрация, при которой кристаллическая структура теряет трехмерное упорядоченное состояние (рис. 3.19). Как показал анализ рентгенограмм, при 56%

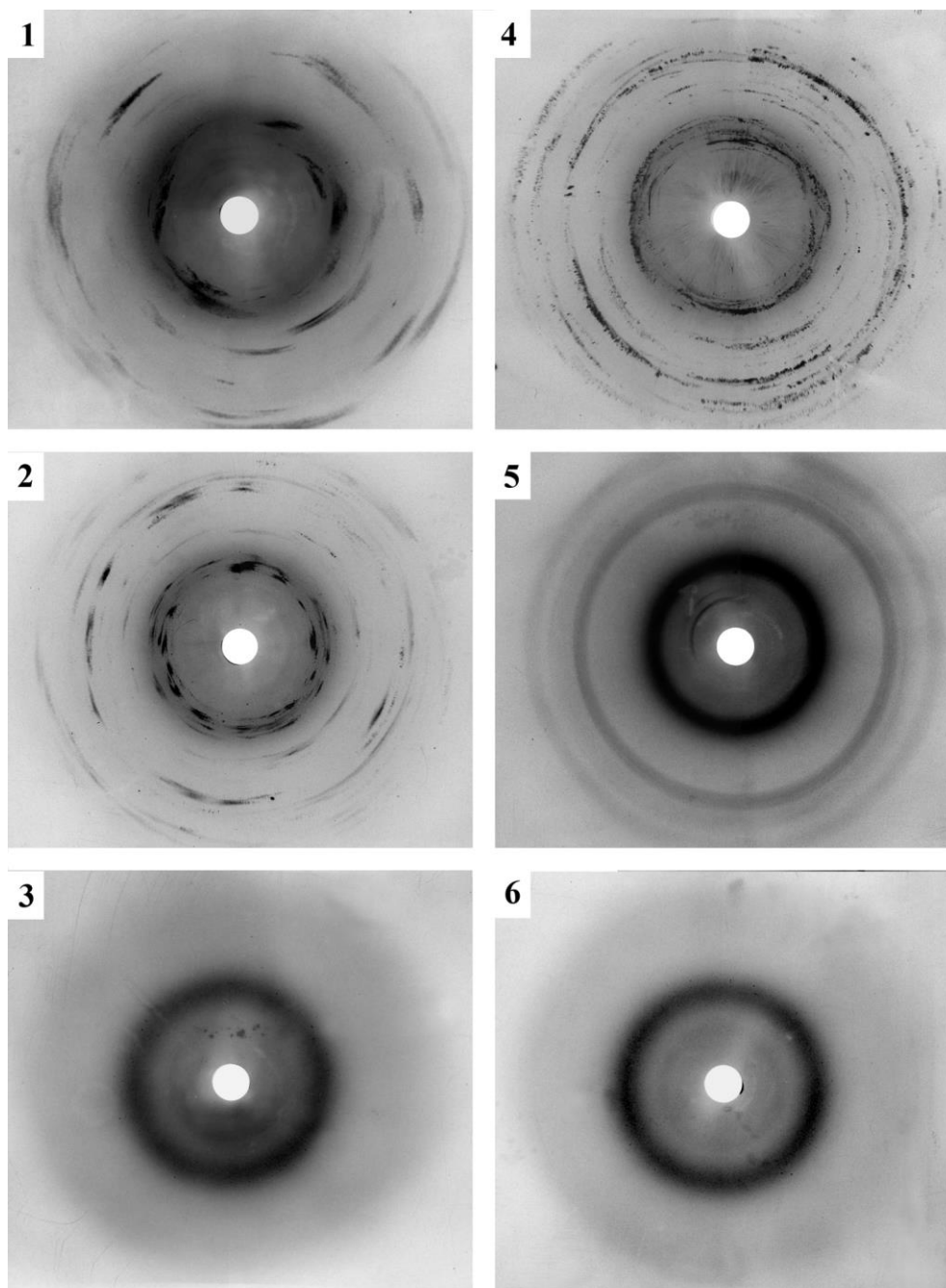


Рис. 3.19. Влияние режимов охлаждения (1–3 – двухэтапная программа, 4–6 – одноэтапная $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) на структурное состояние замороженных водных растворов ПЭО-400 в области больших концентраций: 1 – 50%; 2 – 56%; 3 – 57%; 4 – 40%; 5 – 48%; 6 – 50%.

концентрации ПЭО-400 в растворе дебаевские кольца еще сплошные и тонкие (рис. 3.19, 2). Исчезновение колец и появление диффузного гало при 57% концентрации ПЭО-400 указывает на отсутствие дальнего порядка, который характерен для кристаллических структур (рис. 3.19, 3). В этой

концентрационной зоне система переходит в аморфное состояние. При дальнейшем уменьшении содержания воды в растворе (60% ПЭО-400) гало приобретает более четкие границы, что свидетельствует об уменьшении количества аморфной фазы и увеличении степени ближнего порядка (рис. 3.21, 4).

Одной из причин стабилизации аморфного состояния водных растворов веществ при низких температурах является малая стационарная частота нуклеации, другой – сильное замедление линейной скорости роста. Переход в аморфное состояние характерен для жидкостей с большой вязкостью, препятствующей упорядочению частиц, а также для растворов веществ, представляющих собой длинные и сложные по форме молекулы, содержащие в своем составе большое количество полярных групп, способных формировать водородные связи с водой. Степень связи криопротекторов с водой играет существенную роль в механизме криозащиты биологических объектов при низкотемпературном консервировании, поскольку увеличение количества связанной воды, не участвующей в образовании кристаллов льда, способствует ослаблению действия повреждающих факторов при замораживании. Вполне естественно, что при определенной концентрации криопротекторов в растворе насыщение их гидрофильных связей может привести к отсутствию достаточного количества молекул свободной воды, и кристаллизация в системе происходить не будет. Значительное варьирование критических скоростей охлаждения и отогрева необходимых для формирования стабильного аморфного состояния в 45% (вес/вес) водных растворах ряда веществ, относящихся к классу криопротекторов [317–319], является косвенным подтверждением зависимости этого процесса как от структуры веществ, так и от их физико-химических свойств и, прежде всего, от вязкости и степени гидратации молекул растворенного вещества.

Методом ЯМР в приближении бесконечного разведения было установлено [320], что 1 молекула ПЭО-400 связывает 16 молекул H_2O . В процентном отношении это соответствует ~58% концентрации ПЭО-400 в растворе. Центрами гидратации в молекуле ПЭО-400 ($HOCH_2-(CH_2-CH_2-O)_7CH_2OH$) являются

атом кислорода в оксиэтиленовой группе и 2 концевые группы ОН. Методом ультразвуковой интерферометрии установлено, что в молекуле ПЭО оксиэтиленовое звено гидратирует по 2, а ее концевые группировки по 2-3 молекулы воды [321]. Следовательно, в молекуле ПЭО-400 кислород связывает 14 молекул воды и 2 молекулы воды связывают концевые группы ОН.

Из вышесказанного следует, что определенная нами по характеру рентгенограмм концентрация ПЭО-400 равная 57% соответствует насыщению его гидрофильных связей и обуславливает формирование стабильного аморфного состояния системы на этапе охлаждения.

Проведенные нами методом ДСК и криомикроскопии исследования физических состояний замороженных водных растворов оксиэтилированного глицерина различной степени полимеризации, [322–329], позволили установить, что переход в стабильное аморфное состояние ОЭГ_{n=5} происходит при 71% концентрации. При этой концентрации было рассчитано число молекул воды, приходящихся на одну молекулу ОЭГ_{n=5}, из нижеследующего соотношения

$$\frac{N_{H_2O}}{N_{OEG_{n=5}}} = \frac{m_{H_2O} M_{OEG_{n=5}}}{m_{OEG_{n=5}} M_{H_2O}},$$

где m_{H_2O} , $m_{OEG_{n=5}}$ – соответственно масса воды и ОЭГ_{n=5} в системе; M_{H_2O} , $M_{OEG_{n=5}}$ – соответственно молярная масса воды 18 г/моль и молярная масса ОЭГ_{n=5} 312 г/моль. Оценка показала, что при 71% концентрации раствора для насыщения гидрофильных связей одной молекулы ОЭГ_{n=5} необходимо 7 молекул воды. Стабильное аморфное состояние в замороженных водных растворах сахарозы реализуется при 77% концентрации сахарозы [303]. Аналогичная оценка показывает, что на одну молекулу сахарозы ($M = 342,3$ г/моль) при этой концентрации приходится около 5 прочно связанных молекул воды.

Из приведенных оценок количества прочно связанных молекул воды следует, что в растворах ОЭГ_{n=5} и сахарозы кристаллизационные процессы могут развиваться более активно, чем в растворах ПЭО-400, поскольку в одних и тех же концентрационных зонах ниже перехода в стабильное аморфное состояние в этих растворах количество молекул воды, свободно участвующих в формировании

кристаллической структуры всегда больше.

Быстрое одноэтапное охлаждение со скоростью $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ приводит к смещению концентрационной зоны аморфизации растворов ПЭО-400 в область меньших концентраций. Так, формирование сплошных дебаевских колец ($\ell < 10$ мкм) фиксируется уже в диапазоне концентраций ПЭО-400 45–48% (рис. 3.19, 5), а переход в аморфное состояние отмечается при 50% концентрации ПЭО-400 (рис. 3.19, 6). При двухэтапном же режиме охлаждения при 50% концентрации ПЭО-400 формируется кристаллическая структура размером менее 10 мкм (рис. 3.19, 1). Таким образом, при увеличении скорости охлаждения до $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ кристаллизационные процессы в 50% растворе ПЭО-400 не успевают реализоваться, система переходит в нестабильное аморфное или частично кристаллическое состояние, и, следовательно, вероятность зародышеобразования и роста кристаллов льда при медленных скоростях отогрева в этом случае достаточно высока.

Одноэтапное охлаждение растворов исследованных криопротекторов со скоростью $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в области концентраций до 20% приводит к анизотропии роста кристаллов, т.е. к появлению направлений преимущественного роста, что отражается на рентгенограммах в неравномерном распределении рефлексов в дебаевских кольцах от крупных кристаллических конгломератов (рис. 3.20, 1, 2, 4, 5). Это свидетельствует о том, что при быстром охлаждении в системе возникают значительные концентрационные и температурные градиенты, создающие неравновесные условия роста кристаллов льда. Однако, при 20% концентрации криопротекторов в растворах на рентгенограммах фиксируются дебаевские кольца с равномерным плотным распределением рефлексов от кристаллических зерен размером 10–15 мкм (рис. 3.20, 3, 6), что, по-видимому, связано с возникновением большого числа зародышей льда не имеющих в данном случае условий для интенсивного роста, что приводит к измельчению структуры.

Влияние скоростей охлаждения на структуру замороженных водных растворов криопротекторов в области высоких концентраций хорошо иллюстрируют рис. 3.21,1–3 на примере 45%-х растворов ПЭО - 400.

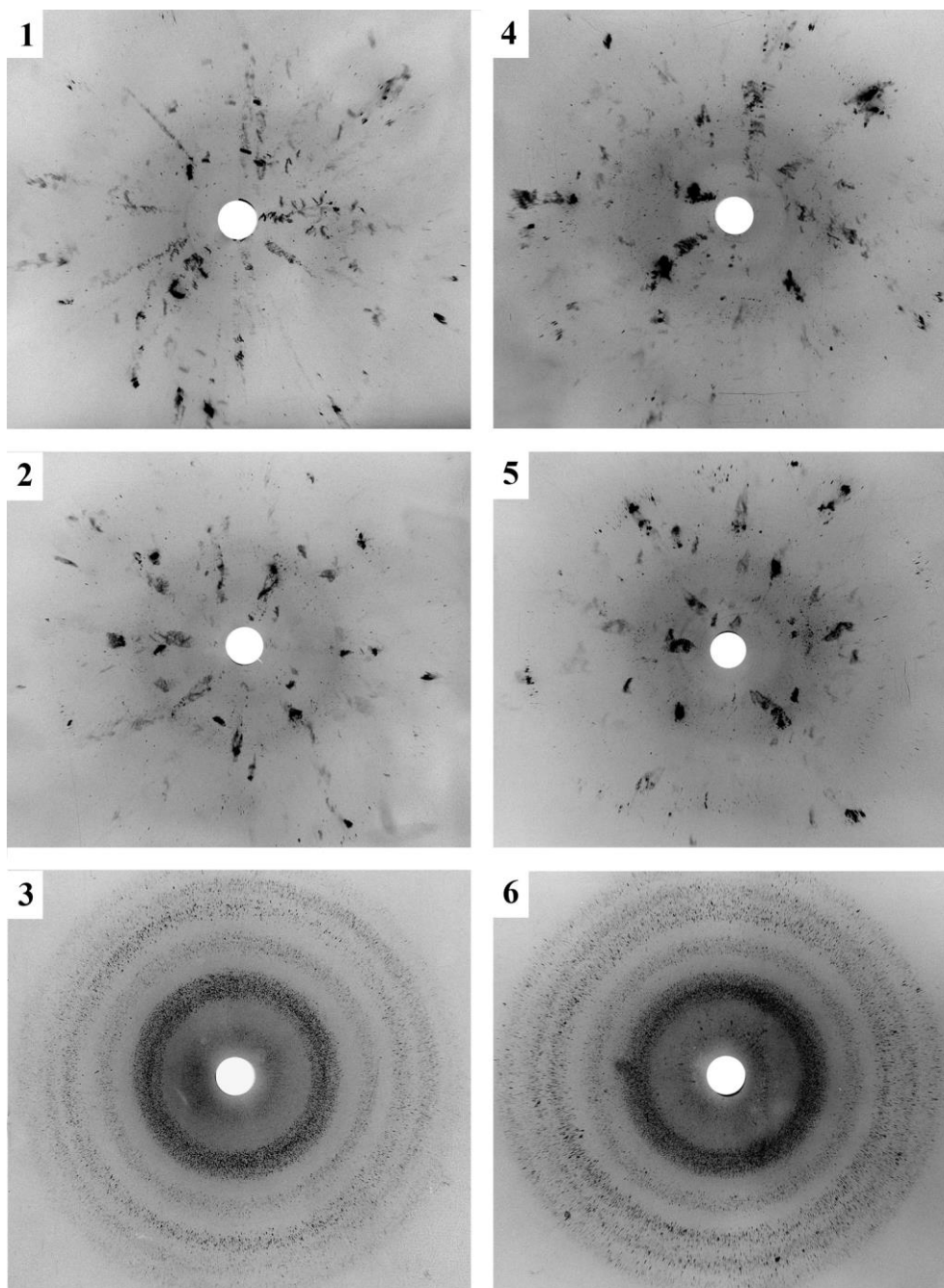


Рис. 3.20. Влияние быстрого ($100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) одноэтапного охлаждения на структурное состояние водных растворов сахарозы (1–3) и глицерина (4–6): 1, 4 – 10%; 2, 5 – 15%; 3, 6 – 20%.

При медленном одноэтапном охлаждении ($1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) рефлексy дискретны и равномерно укладываются на дебаевские кольца (рис. 3.21, 1), что указывает на равновесные условия роста кристаллов льда во всем объеме образца. Увеличение скорости охлаждения на втором этапе (для ПЭО-400 около -21°C) до $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ обуславливает формирование широких сплошных колец равномерной

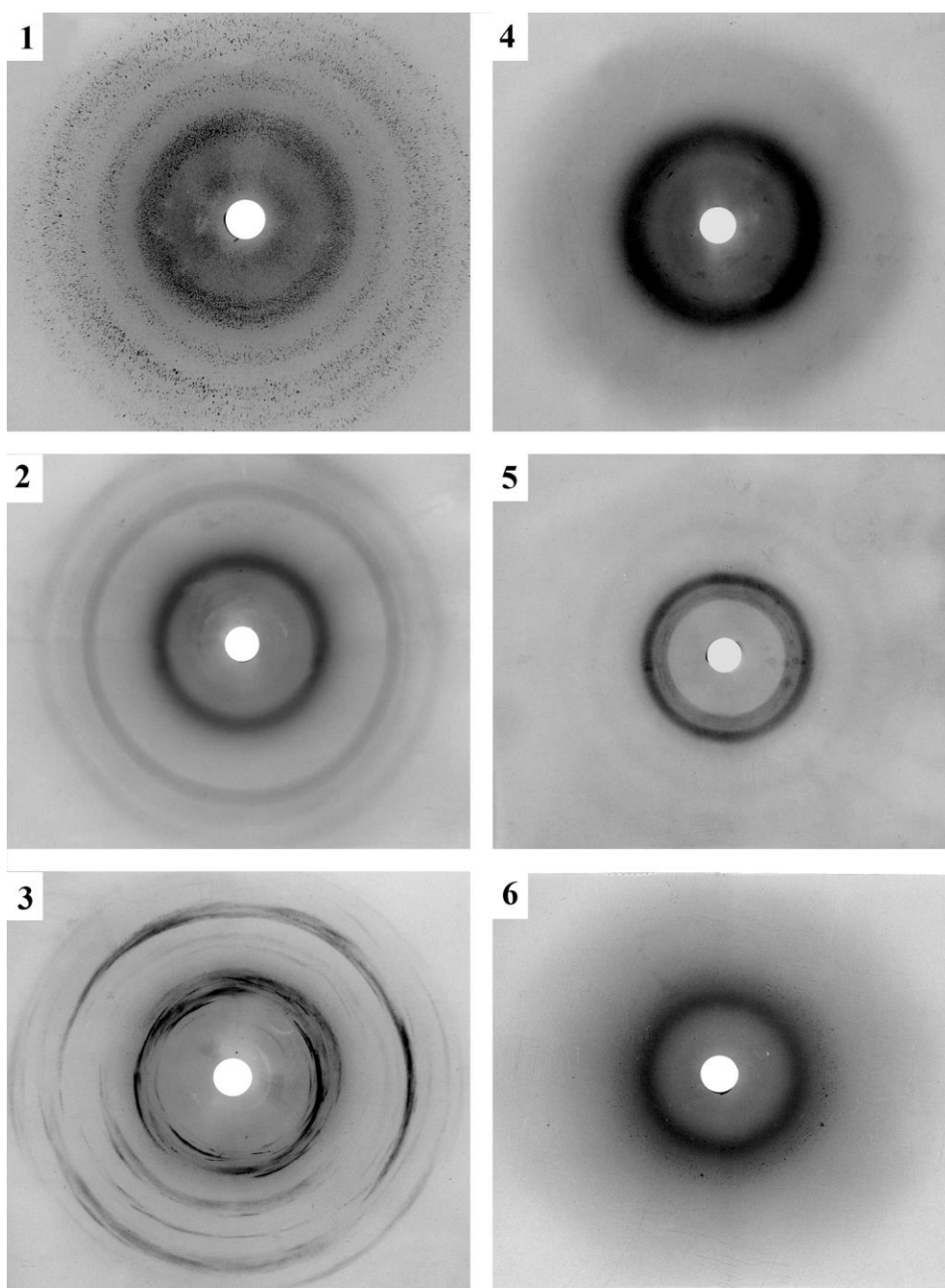


Рис. 3.21. Рентгенограммы замороженных водных растворов ПЭО-400: 1 – 45%, одноэтапное охлаждение $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; 2 – 45%, двухэтапное охлаждение; 3 – 45%, одноэтапное охлаждение $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; 4 – 60%, аморфное состояние при всех режимах; 5 – 100% при температуре -140°C ; 6 – 100% при температуре $+24^{\circ}\text{C}$.

интенсивности (рис. 3.21, 2). Это свидетельствует о том, что сформировавшаяся однородная кристаллическая структура, не имея условий для дальнейшего роста, оказалась как бы зафиксированной (дисперсность структуры $\cong 10$ мкм). Быстрое

одноэтапное охлаждение со скоростью $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ приводит возникновению тонких сплошных дебаевских колец неравномерной интенсивности, что указывает на возникновение преимущественных направлений роста (рис. 3.21, 3). Дисперсность кристаллической структуры в этом случае лежит в интервале от 10 до 1 мкм.

Рентгенограммы замороженных 100% глицерина, ОЭГ_{n=5}, ПЭО-400 (рис. 3.21, 5) соответствуют рассеянию рентгеновских лучей аморфными структурами, дающими гало в области малых углов с периодами 4,5 Å, 4,1 Å, 3,8 Å, соответственно. Такое состояние для полимерных веществ можно назвать квазикристаллическим и говорить о наличии “кристаллитов” менее 1 мкм. Последние представляют собой участки с более или менее совершенным трехмерным порядком в расположении молекулярных цепей. Степень порядка в такой структуре значительно меньше, чем в кристалле [252]. Рентгенограммы 100% глицерина, ОЭГ_{n=5} и ПЭО-400 (рис. 3.21, 6) при температуре 24°C представляют собой диффузное гало с периодами 4,6 Å, 4,3 Å, 4,3 Å, соответственно.

Таким образом, качественный анализ рентгенограмм показал, что присутствие криопротекторов в замораживаемых растворах обуславливает возникновение в кристаллической структуре льда дефектов различных типов. Поскольку атомные размеры криопротектора и льда различны, то изменение концентрации криопротектора может привести к искажению периода решетки льда и возникновению упругих напряжений, приводящих к смещению атомов из узлов кристаллической решетки [316]. Неравномерное перераспределение молекул криопротекторов при их адсорбции на растущих гранях кристалла льда обуславливает возникновение упругих напряжений, как между соседними гранями роста, так и в пределах одной из них. Возникающие напряжения релаксируют за счет дефектов различного типа, таких как вакансии, дислокации, межзеренные границы и др. Ростовые дислокации и межзеренные границы, имеющие крупные области нерегулярности, характеризуются высокой энергией образования (от 10 до 100 эВ) и потому являются неравновесными. Внутренние

напряжения в кристалле вынуждают дислокации перемещаться и перегруппировываться. Энергетически выгодным оказывается расщепление дислокаций в процессе роста кристалла на группу дислокаций, суммарная энергия которых меньше исходной дислокации.

Формирование неравновесных дефектов самым непосредственным образом зависит от условий кристаллизации. Температурные градиенты, возникающие при быстром охлаждении, также являются причиной дефектности кристаллической структуры. При резком охлаждении в кристаллах образуется повышенная концентрация вакансий (порядка $10^{17} - 10^{20} \text{ см}^{-3}$), которые имеют тенденцию коалесцировать, создавая полости, которые затем могут превращаться в дислокационные петли. По расчетам для отмеченной выше концентрации вакансий возникает $10^6 - 10^9 \text{ см}^{-2}$ дислокаций [290]. Характерное неравномерное распределение интенсивности вдоль сплошных колец на рентгенограммах, возникающее, как при высоких концентрациях криопротекторов, так и больших скоростях охлаждения, свидетельствует о наличии в формирующейся структуре льда так называемых текстур, кристаллы в которых расположены не хаотично, а имеются направления, вдоль которых преимущественно находятся узловые плоскости роста. Возникновение текстур свидетельствует о значительных деформациях в кристаллах льда, а также выраженных рекристаллизационных процессах [252].

3.6. Выводы

В результате проведенных в данном разделе исследований количественно доказано, что процесс нуклеации льда в плазме крови человека в исследованном диапазоне переохлаждений и скоростей охлаждений практически полностью протекает по гетерогенному механизму, вклад которого составляет 98,7%. Увеличение степени переохлаждения системы повышает активность твердых примесей, способствующих зародышеобразованию. Снижение скорости процесса зародышеобразования при уменьшении скорости охлаждения модельной системы

обусловлено более полным развитием структур воды и органических составляющих плазмы крови человека. Увеличение числа активных примесей и их активности при увеличении скорости охлаждения связано с кинетическими ограничениями развития таких структур.

Аналитическая зависимость линейной скорости роста кристаллов льда от переохлаждения в сложных биологических растворах преимущественно имеет вид $v = a\Delta T + b\Delta T^2$, что указывает на одновременную реализацию двух механизмов роста реальных кристаллов: нормального ($v \sim \Delta T$) и дислокационного ($v \sim \Delta T^2$). Обе составляющие роста кристаллов льда ингибируются при увеличении концентрации криопротекторов в маточном растворе, причем дислокационная составляющая роста является более чувствительной к наличию в системе криопротекторов, чем нормальная. При 20% концентрации криопротекторов в системе по степени ингибирования нормальной составляющей роста криопротекторы располагаются в ряд: этиленгликоль > ПЭГ-1500 > ДМСО > ПВП-12000; а дислокационной составляющей – этиленгликоль > ДМСО > ПВП-12000 > ПЭГ-1500. Поскольку при дислокационном механизме линейная скорость роста кристаллов льда больше, чем при нормальном, чрезмерно быстрое нарастание осмотического градиента между вне- и внутриклеточной средой может вносить значительный вклад в повреждение клеток за счет их чрезмерно быстрого обезвоживания уже в зоне образования первичных кристаллов льда.

Установлено, что в механизме формирования кристаллической структуры льда различной дисперсности также одновременно участвуют обе составляющие механизма роста реальных кристаллов. Влияние криопротекторов на скорость образования центров роста может проявляться двояко. С одной стороны, за счет связывания молекул воды криопротектором и диффузионных ограничений возможно ингибирование скорости этого процесса. С другой стороны, частота образования центров роста может активизироваться за счет адсорбции молекул криопротекторов на растущей грани кристалла, в результате которой уменьшается поверхностная энергия границы раздела фаз “кристалл–раствор”. Реализация того или иного механизма зависит от экспериментальных условий и

физико-химических свойств криопротекторов таких, как вязкость, поверхностная активность, способность формировать прочные водородные связи. Повышение концентрации криопротекторов во внеклеточной среде, как правило, приводит к замедлению скорости роста кристаллов льда и к уменьшению их размера. Показано, что при заданном переохлаждении существуют критические концентрации криопротекторов, при которых меняется механизм их ингибирующего влияния: если $C < C_{\text{крит.}}$, то превалирует ингибирование скорости роста грани кристалла, если $C > C_{\text{крит.}}$, – ингибирование скорости образования центров роста.

Сравнительный анализ влияния переохлаждения, криопротекторов и ПАВ на кинетические характеристики внеклеточного льдообразования показал, что наиболее надежным способом управления скоростью роста и размером образующихся кристаллов льда во внеклеточной среде является режим теплоотвода от кристаллизующей системы.

Качественный анализ рентгенограмм показал, что присутствие криопротекторов в растворах обуславливает возникновение в структуре льда неравновесных дефектов, таких как вакансии, дислокации, межзеренные границы и др. Вполне вероятно, что кинетические процессы, обусловленные релаксацией деформационных напряжений в местах локализации неравновесных дефектов, могут явиться источником механического повреждения клеток в зоне низких температур.

Материалы раздела 3 опубликованы в работах [284, 295, 296, 302, 312–314, 322–329].

РАЗДЕЛ 4

КРИОМИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ЛДООБРАЗОВАНИЯ НА СОХРАННОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Скорость охлаждения криобиологической системы в зоне фазового перехода определяет интенсивность внеклеточных кристаллизационных процессов, которая в свою очередь определяет особенности морфологической структуры льда и характер взаимодействия с ним биологических объектов. Неоднородность распределения клеток в структуре льда создает различные физико-химические условия, в которые попадают клетки, а, следовательно, вероятность реализации того или иного механизма их повреждения и, таким образом, вызывает соответствующий ответ клеток на замораживание – отогрев [330, 331, 332].

Проведенный ранее нами [21, 26, 141] криомикроскопический анализ дисперсности формирующихся при фазовом переходе внеклеточных кристаллических структур льда при различных условиях охлаждения клеточной суспензии позволил условно выделить три типа кристаллов льда: 1. $\ell > 15$ мкм; 2. $5 \text{ мкм} < \ell < 15 \text{ мкм}$; 3. $\ell < 5 \text{ мкм}$. В равновесных условиях наблюдается медленный рост кристаллов льда дендритного типа, размер которых превышает 15 мкм. При этом клетки оттесняются в образующиеся между кристаллами льда каналы, где происходит их обезвоживание. С повышением скорости охлаждения увеличивается степень разветвленности осей дендрита высших порядков, при этом размер кристаллов льда изменяется в интервале $5 \text{ мкм} < \ell < 15 \text{ мкм}$. Наблюдается обрастание клеток кристаллами и замыкание их в структуре льда. В условиях еще больших скоростей охлаждения и значительных переохлаждений, когда фазовый переход происходит с неконтролируемой скоростью, первоначально образуется мелкокристаллическая структура ($\ell < 5 \text{ мкм}$), которая в

процессе дальнейшего охлаждения может рекристаллизоваться. Клетки в этом случае захватываются растущими кристаллами льда.

Задачами исследований данного раздела явилось изучение влияния характера развития внеклеточных кристаллизационных процессов на сохранность клеток, а также поиск возможных путей исключения или снижения их неблагоприятного действия.

4.1. Рекристаллизационные явления как один из факторов повреждения клеток в зоне фазовых превращений

Для изучения влияния режимов замораживания и внеклеточных кинетических процессов на сохранность клеток в качестве объекта исследования нами были выбраны спермии человека как клетки, имеющие специфическое морфологическое строение [333]. Спермии представляют собой длинную нитевидную клетку, характеризующуюся значительными линейными размерами: спермии человека имеют небольшой размер головки $4 \times 3 \times 1,8$ мкм и тонкий хвост длиной в 50–60 мкм.

В экспериментах исследовали свежезаготовленный эякулят. Исходная подвижность спермиев составляла в среднем $65,9 \pm 3,25\%$. В качестве криозащитной среды был использован 1,37 М глицерин. Известно, что спермии млекопитающих проявляют чрезвычайную чувствительность к процедурам при подготовке к криоконсервированию. В частности, они могут повредиться в пипетке, при перемешивании и центрифугировании в результате мягкого механического давления, при добавлении в суспензию проникающих в спермии криопротекторов – в результате осмотического шока [154, 168]. Поэтому для исключения вероятности осмотического шока спермиев человека глицерин вводили в эякулят по каплям. При криомикроскопии сохранность спермиев оценивали по морфологическим признакам и характеру движения клеток.

Эякуляты замораживали рабочей камерой криомикроскопа от температуры 24°C до -140°C . С целью воздействия на кинетику кристаллизационных

процессов зону фазового превращения в замораживаемых препаратах проходили с различными скоростями: медленно со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ или быстро со скоростью $20\text{--}25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Кроме того, в режимы замораживания были включены температурные остановки в области положительных температур при 5°C и в области отрицательных температур при -15°C . Таким образом, на морфофункциональное состояние спермиев человека было исследовано влияние четырех различных программ: охлаждение со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температурной остановки при 5°C в течение 30 мин и далее – со скоростью $20\text{--}25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (программа 1); охлаждение со скоростью $20\text{--}25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ во всем температурном диапазоне (программа 2); охлаждение со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температурной остановки при -15°C в течение 30 мин и далее – со скоростью $20\text{--}25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (программа 3); охлаждение со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ во всем температурном диапазоне (программа 4). Скорость отогрева была постоянна и составляла $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Анализ охлаждения как незащищенного эякулята, так и под защитой глицерина показал, что по мере снижения температуры активная хаотическая подвижность спермиев существенно снижается и при температуре 5°C носит в основном колебательный характер. По истечении 25–30 мин экспозиции при этой температуре движение спермиев практически прекращается. При охлаждении суспензии клеток до температуры 2°C и ниже движение спермиев полностью отсутствует. В случае благоприятного исхода цикла замораживания-отогрева подвижность клеток восстанавливается в этой же температурной зоне $2\text{--}5^{\circ}\text{C}$.

Интактный эякулят представляет собой вязкую среду, что обуславливает его значительное переохлаждение даже в отсутствие криопротектора. Так, если при охлаждении незащищенной суспензии спермиев температура начала кристаллизации составляла -11°C , то в эякуляте, содержащем 1,37 М глицерина, фазовый переход смещался в область более низких температур.

В отсутствие в суспензионной среде криопротектора кристаллизация эякулята происходит из переохлажденного состояния и сопровождается формированием мелкокристаллической структуры льда независимо от

программы охлаждения. При этом рекристаллизационные изменения структуры при медленном охлаждении (программы 3, 4) более выражены, чем при быстром охлаждении (программы 1, 2). После отогрева в препаратах наблюдается фрагментация спермиев, увеличение размеров их головок в результате набухания, что является морфологическими признаками повреждения клеток. При всех вариациях режимов охлаждения спермии полностью утрачивают двигательную активность.

Анализ особенностей замораживания-отогрева спермиев человека под защитой 1,37 М глицерина показал следующее. При замораживании эякулята по программе 1 (рис. 4.1) образовавшаяся при фазовом переходе первичная мелкокристаллическая структура льда (рис. 4.1, 2) не претерпевает видимых рекристаллизационных изменений вплоть до температуры -140°C (рис. 4.1, 3).

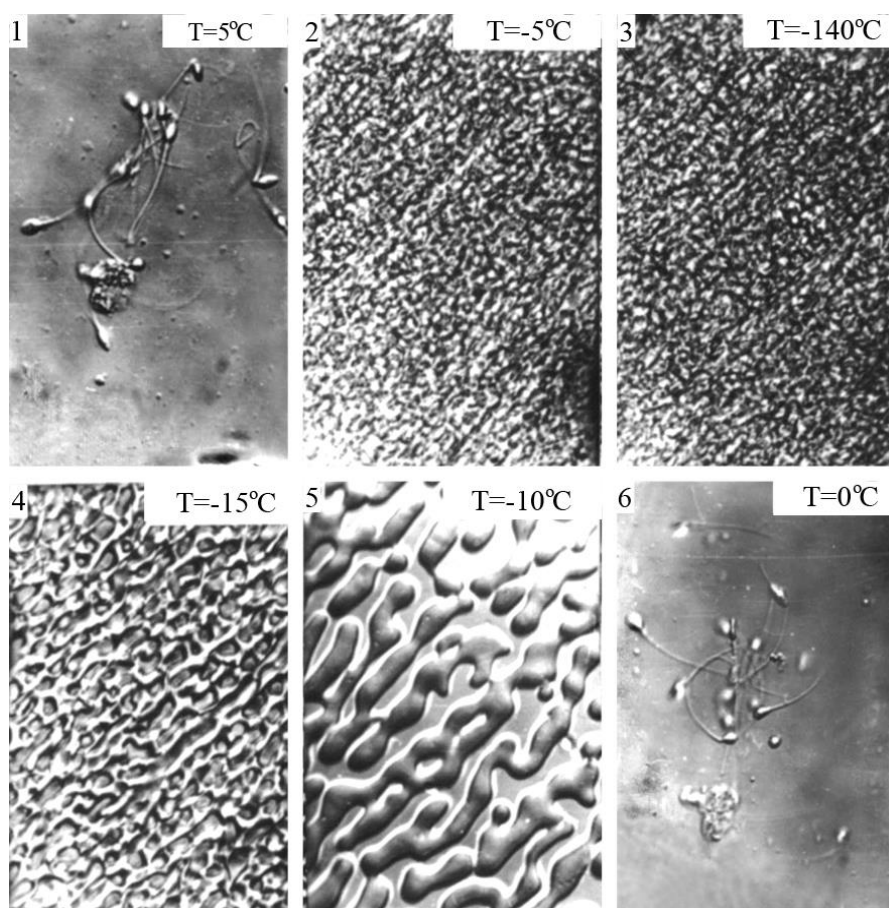


Рис. 4.1. Кинетика процесса замораживания – отогрева спермиев человека под защитой 1,37 М глицерина по программе 1: 1-3 – охлаждение; 4-6 – отогрев. Увеличение при съемке $\times 120$.

При отогреве в области температур от -40°C до -30°C , превышающих эвтектическую температуру водного раствора глицерина (порядка $-45,5^{\circ}\text{C}$), наблюдаются рекристаллизационные перестройки. Ввиду наличия в образцах в этой зоне температур жидкой фазы процесс рекристаллизации, по-видимому, не вызывает значительных повреждений клеток. Интенсивное плавление кристаллов льда начинается при -15°C (рис. 4.1, 4, 5) и завершается при -5°C . Первые признаки движения спермиев отмечаются при температуре $2-4^{\circ}\text{C}$. По мере повышения температуры движение спермиев становится более интенсивным. При 24°C оно полностью восстанавливается и носит активно-поступательный характер, что не позволяет получить четкое изображение клеток.

При замораживании эякулята по программе 2 (рис. 4.2) сформировавшаяся при фазовом переходе мелкокристаллическая структура льда (рис. 4.2, 2) также подвергается слабо выраженной рекристаллизации (рис. 4.2, 6). Однако после отогрева отмечается менее интенсивное движение спермиев, которое носит, в основном, колебательный характер.

При замораживании эякулята по программе 3 (рис. 4.3) рекристаллизационные явления активно протекают в течение температурной остановки при -15°C (рис. 4.3, 2–3), так что при -140°C структура льда значительно укрупняется (рис. 4.3, 5). После отогрева спермии слабо подвижны, некоторые из них имеют увеличенные размеры головок. В поле зрения встречаются фрагменты разрушенных клеток (рис. 4.3, 9).

При медленном замораживании эякулята по программе 4 (рис. 4.4) процессы рекристаллизации также существенно выражены (рис. 4.4, 2–5). После отогрева при 24°C количество подвижных спермиев незначительно. Движение носит колебательный характер. Основная масса клеток имеет увеличенные головки, часть спермиев фрагментированы.

Плазматическая мембрана, покрывающая головку спермиев, осуществляет сложные функции, в частности, регулирует транспорт воды и различных веществ. Набухание головок спермиев, которое наблюдается после медленного охлаждения в зоне внеклеточного льдообразования, по-видимому, обусловлено,

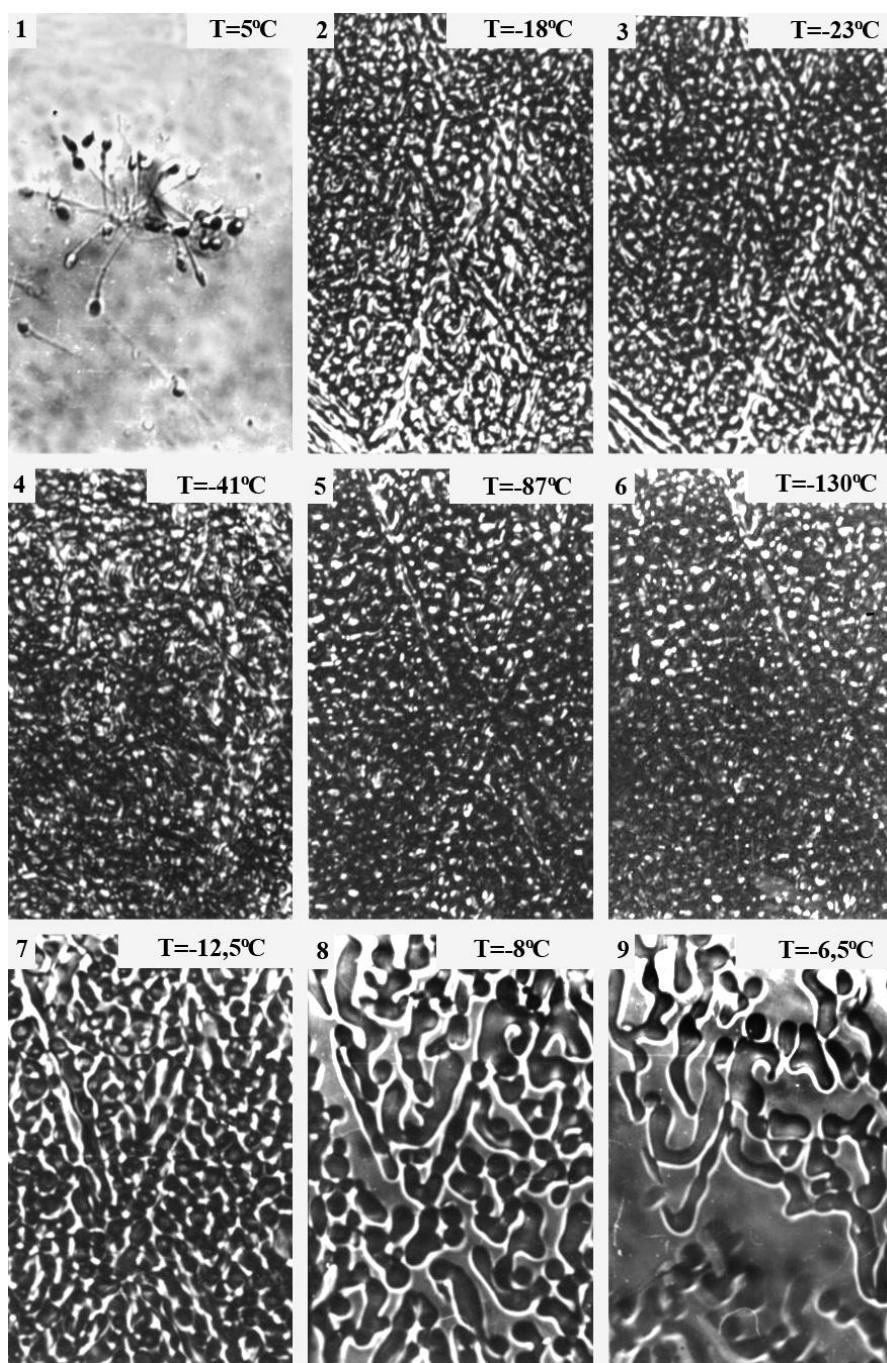


Рис. 4.2. Кинетика процесса замораживания – отогрева спермиев человека под защитой 1,37 М глицерина по программе 2: 1-6 – охлаждение; 7-9 – отогрев. Увеличение при съемке $\times 120$.

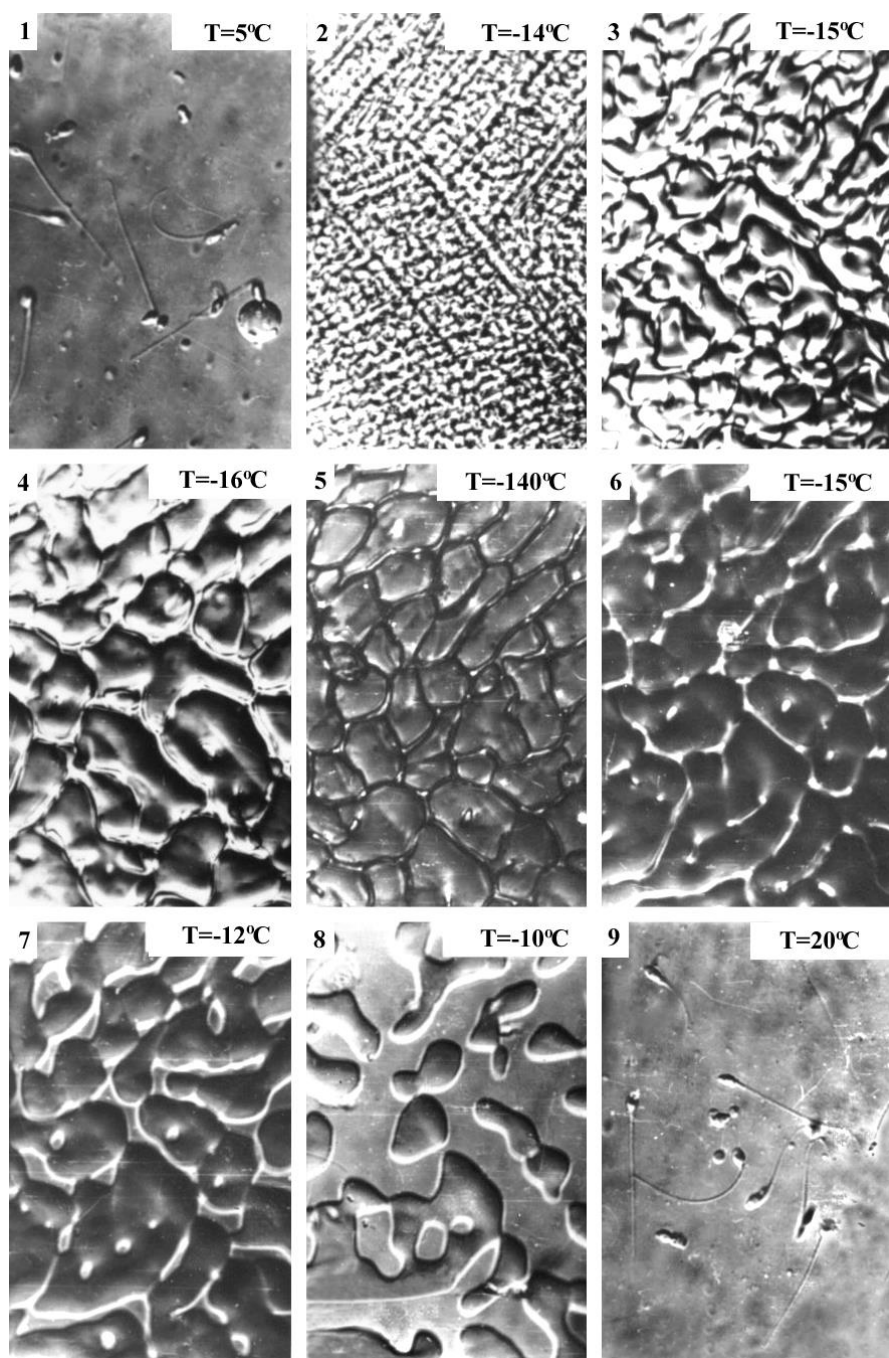


Рис. 4.3. Кинетика процесса замораживания – отогрева спермиев человека под защитой 1,37 М глицерина по программе 3: 1-5 – замораживание; 6-9 – отогрев. Увеличение при съемке $\times 120$.

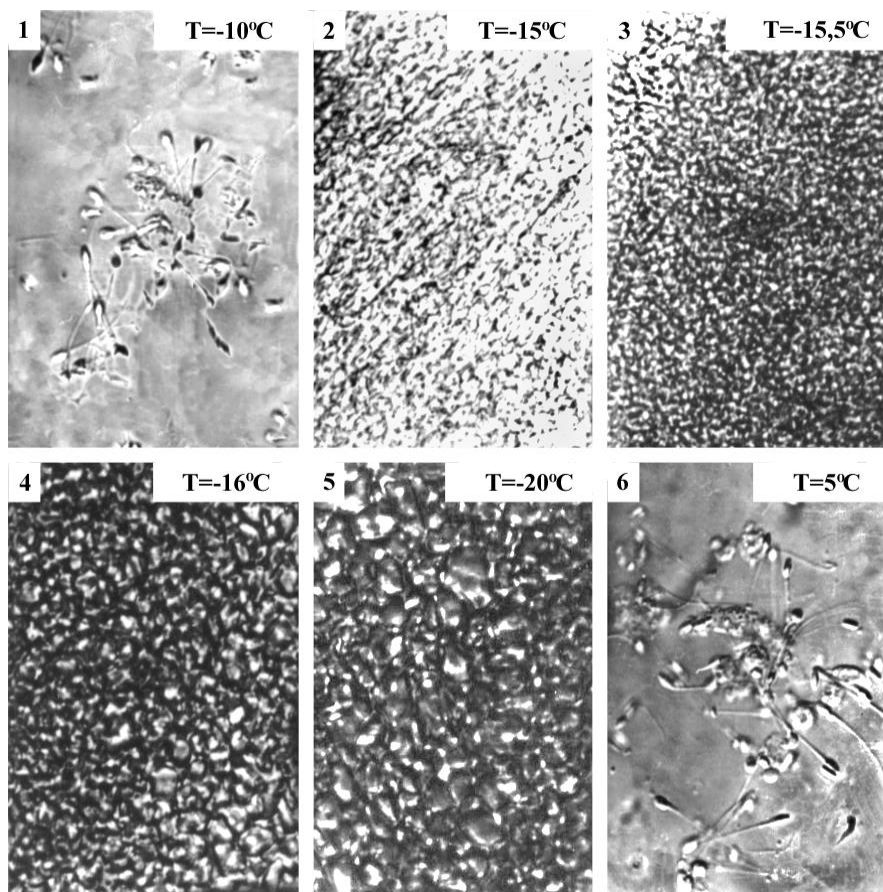


Рис. 4.4. Кинетика процесса замораживания – отогрева спермиев человека под защитой 1,37 М глицерина по программе 4: 1-5 – охлаждение; 6 – отогрев. Увеличение при съемке $\times 120$.

нарушением избирательной проницаемости плазматической мембраны, возможно, как в результате значительной дегидратации клеток, так и в результате действия механического фактора. Следует подчеркнуть, что количество фрагментированных спермиев при замораживании эякулятов по программам 1 и 2 в средах, содержащих 1,37 М глицерина, было заметно ниже, чем при замораживании по программам 3 и 4. Подвижность спермиев, оцененная по спермограммам после криоконсервирования под защитой 1,37 М глицерина, в процентном отношении относительно исходной подвижности составила $43,7 \pm 2,5$, $39,8 \pm 1,4$, $30,3 \pm 4,2$, $10,1 \pm 3,6$ соответственно указанным программам замораживания.

Из проведенного криомикроскопического анализа следует, что

оптимальной скоростью прохождения области фазового перехода при замораживании спермиев человека под защитой 1,37 М глицерина является скорость 20–25°C/мин (программы 1 и 2). Несомненным преимуществом первой программы является медленное охлаждение эякулятов при положительных температурах и наличие температурной остановки при 5°C.

Как показали электронно-микроскопические исследования, представленные в работе [334], при криоконсервировании спермиев человека по первой программе существенные изменения структурных элементов спермиев (головки, шейки, тела и хвоста) отсутствуют: плазматическая мембрана спермиев имеет обычную форму и строение, ультраструктура хвоста без видимых повреждений. В то же время при замораживании по второй программе, при которой температурная остановка при 5°C отсутствовала, ультраструктура некоторых клеток претерпевает выраженные повреждения: плазматическая мембрана теряет свою целостность, ядерная мембрана не определяется. Обычная структура тела спермиев нарушена. Эти данные хорошо коррелируют с полученными нами.

Таким образом, результаты криомикроскопических исследований показывают, что существенный вклад в повреждение спермиев человека как при замораживании, так и при отогреве вносят внеклеточные рекристаллизационные явления. С термодинамической точки зрения состояние поликристаллической структуры, имеющей большую протяженность границ, энергетически невыгодно (расчеты показывают, что поверхностная энергия границ зерен составляет около 500 эрг/см² [232]), а потому нестабильно. При медленном охлаждении и при отогреве в области температур близких к температуре плавления происходит рекристаллизация – поглощение мелких кристаллов более крупными, что приводит к уменьшению суммарной протяженности границ, и, соответственно, к понижению поверхностной энергии. Поскольку спермии имеют специфическое морфологическое строение (протяженный хвост), активные процессы структурной перестройки могут явиться механическим фактором повреждения клеток, приводящим к их фрагментации. Увеличение скорости охлаждения в зоне фазового перехода на этапе замораживания и скорости отогрева на этапе

деконсервации клеток позволяет исключить неблагоприятное воздействие этого фактора.

При резком охлаждении спермиев в области положительных температур в результате холодового шока в клетках возникает температурный метаболический дисбаланс, а также происходит разрегуляция ионтранспортирующих систем мембран клеток, необходимых для обеспечения динамической энергии спермиев [335]. Как показано в работе [336], холодовой шок существенно влияет на поведение сперматозоидов при криоконсервировании, так как изменяет транспортные свойства плазматической мембраны для молекул воды при субнулевых температурах. Следовательно, медленное ($1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) охлаждение спермиев в области выше 0°C позволяет ослабить влияние данного отрицательного фактора. Кроме того, введение в программу замораживания температурной остановки при 5°C в течение 30 мин (температуры “адаптации”) способствует постепенному прекращению двигательной активности спермиев, что также положительно сказывается на их сохранности после отогрева. Целесообразность дальнейшего охлаждения эякулята со скоростью $20\text{--}25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ обусловлена тем, что в этих условиях рекристаллизационные процессы угнетены. Если же после этапа температурной адаптации замораживание осуществлять медленно ($1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$), то укрупнение кристаллической структуры в результате рекристаллизации приводит к повреждению спермиев. Температурная остановка в области отрицательных температур (-15°C) способствует более активному развитию рекристаллизационных процессов и поэтому неблагоприятно сказывается на результатах криоконсервирования.

Таким образом, проведенные нами криомикроскопические исследования замораживания спермиев человека позволяют утверждать, что наиболее вероятным фактором повреждения данного типа клеток, может быть непосредственное физическое действие внеклеточного льда при его рекристаллизации. Это заключение нашло свое подтверждение при изучении влияния замораживания на жизнеспособность спермиев мышей [25, 174]. Так, при исследовании подвижности спермиев мышей после замораживания до

промежуточных температур в интервале между $0^{\circ}\text{C} \dots -10^{\circ}\text{C}$ и $-30^{\circ}\text{C} \dots -70^{\circ}\text{C}$ со скоростью $21^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ было установлено, что основная потеря подвижности (до 42%) происходит при замораживании до -10°C [25]. Поскольку проницаемость спермиев мышей для молекул воды достаточно высока и спермии имеют высокое поверхностно-объемное отношение, авторы считают, что в данных условиях замораживания термодинамическое равновесие с внеклеточным раствором поддерживается дегидратацией клеток и внутриклеточная кристаллизация маловероятна. Поэтому потеря активности может быть результатом прямого физического давления, возникающего при образовании внеклеточных кристаллов льда. В работе [174] также указывается, что при скоростях охлаждения в интервале от $27^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $130^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в сперматозоидах мышей в течение охлаждения внутриклеточный лед не образуется. Потерю подвижности спермиев мышей при медленном отогреве авторы работы [174] связывают с рекристаллизацией или девитрификацией внеклеточной среды.

Таким образом, криомикроскопические исследования позволили выявить наиболее эффективную программу замораживания спермиев человека под защитой 1,37 М глицерина, которая по сравнению с другими известными методами криоконсервирования повышает выживаемость клеток после деконсервации на 10%, что является существенным для их клинического применения в программах искусственной инсеминации [337].

4.2. Влияние предварительной дегидратации и насыщения клеток проникающим криопротектором на их устойчивость к замораживанию

Фазовый переход “вода–лед” сопровождается целой цепочкой физико-химических явлений, вызывающих повреждение клеток в зоне формирования внеклеточных кристаллов льда, к которым, прежде всего, следует отнести дегидратацию и внутриклеточную кристаллизацию.

Разность химических потенциалов вне – и внутри клетки, возникающая при образовании и развитии внеклеточных кристаллов, является не только

термодинамической силой, вызывающей обезвоживание клеток, но и мерой пересыщения внутриклеточного раствора по отношению к внеклеточному, от которой зависит вероятность образования кристаллов льда внутри клеток [338]. Количество льда в клетке и степень эффективного переохлаждения цитоплазмы в процессе кристаллизации зависят от скорости охлаждения, поверхностно-объемного отношения и гидравлической проницаемости клеток.

При поиске способов подготовки клеток к неблагоприятным факторам, вызванным внеклеточным льдообразованием нами были использованы эмбрионы мышей ранних стадий развития, которые являются удобной моделью, поскольку эти клетки имеют большие размеры (диаметр ооцитов мыши составляет около 70 мкм), так что визуализация их реакций весьма наглядна.

Плазматические мембраны эмбрионов млекопитающих характеризуются низкой проницаемостью для молекул воды [173, 339]. В связи с этим оптимальные скорости охлаждения эмбрионов составляют 0,1-0,5°C/мин [340–342]. При скоростях охлаждения выше 0,5°C/мин возрастает вероятность внутриклеточного льдообразования. Проникающие в эмбрионы криопротекторы, замещая или частично связывая внутриклеточную воду, снижают вероятность образования внутриклеточных кристаллов, способствуют измельчению кристаллической структуры, что коррелирует с повышением сохранности клеток.

Известно, что эмбрионы мышей на ранних стадиях развития очень чувствительны к действию различных физико-химических факторов [343], что может быть обусловлено высокой интенсивностью процессов синтеза в них. На стадии двух бластомеров осуществляется переход контроля от материнского генома к эмбриональному [344], в результате чего резко увеличивается белковый синтез и появляются характерные белки [345]. На этой стадии эмбрионального развития начинается также синтез РНК. Поэтому криоконсервирование эмбрионов мышей на ранних стадиях развития является весьма сложной задачей.

Как один из способов адаптации клеток к замораживанию нами изучено влияние предварительного обезвоживания эмбрионов мышей ранних стадий развития и их насыщения высокой концентрацией проникающего криопротектора

на вероятность внутриклеточного льдообразования [346].

Материалом исследований служили одно – и двухклеточные эмбрионы мышей линии СВА. Различный уровень дегидратации клеток достигали экспозицией эмбрионов в течение 10 мин при 22°C в 0,5 и 1,0 М растворах сахарозы или NaCl. Насыщение эмбрионов проникающим криопротектором – этиленгликолем проводили путем ступенчатого повышения его концентрации в среде инкубации [347]. На первом этапе эмбрионы выдерживали 10 мин в 1,8 М растворе ЭГ, а затем на 1,5 мин переносили в среду замораживания, представляющую смесь 100% ЭГ и 1,0 М сахарозы в соотношении 3:7 (5,37 М ЭГ и 0,7 М сахарозы) [348]. Уровень дегидратации клеток в исследуемых средах контролировали методом волюмометрии. Растворы готовили на физиологической среде Дюльбекко. Предварительную дегидратацию и насыщение клеток криопротектором проводили в эмбриональных стеклах под микроскопом МБС-9. Затем 2–3 эмбриона со средой инкубации переносили в специально сконструированную ячейку, которую помещали в рабочую камеру криомикроскопа. Ячейка предохраняла препарат от высыхания и обеспечивала оперативный поиск клеток в поле зрения. Суспензию клеток охлаждали со скоростью 5°C/мин до –30°C. Для исключения переохлаждения в ячейку вносили затравочные кристаллы AgI. Температуру контролировали в рабочей камере криоприставки. Скорость отогрева составляла 5°C/мин.

При замораживании зигот мыши в физиологической среде Дюльбекко фазовый переход происходит одновременно во вне – и внутриклеточной среде (рис. 4.5, 2). Внеклеточный лед представляет собой мелкокристаллическую структуру, которая рекристаллизуется при дальнейшем понижении температуры (рис. 4.5, 3). Рекристаллизационные процессы внутри клетки отсутствуют. Постепенное просветление зигот на этапе отогрева свидетельствует об укрупнении внутриклеточных кристаллов (рис. 4.5, 4). В зоне интенсивного плавления (рис. 4.5, 5) полное исчезновение внутриклеточного льда предшествует плавлению внеклеточного кристаллического матрикса. Повреждение зигот прослеживается сразу же после плавления внутриклеточных

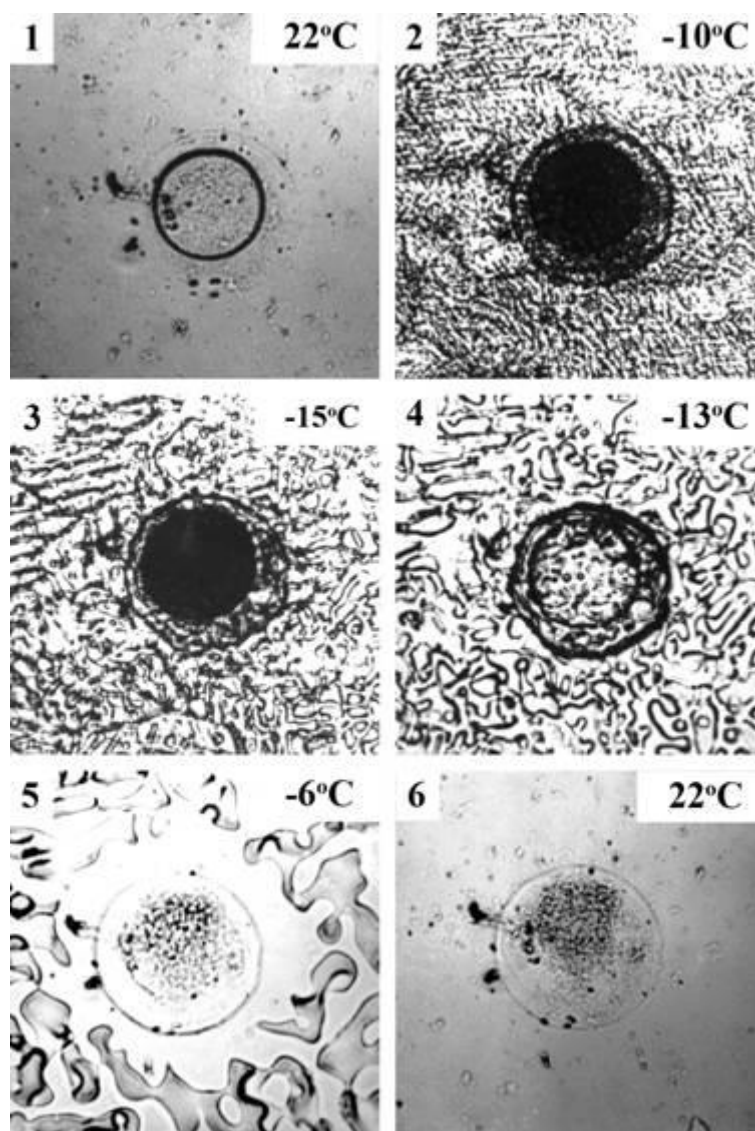


Рис. 4.5. Кинетика замораживания–оттаивания зиготы мыши в физиологической среде Дюльбекко: 1 – интактная клетка; 2,3 – охлаждение; 4-6 – отогрев. Увеличение при съемке $\times 100$.

кристаллов (рис. 4.5, 5) и сопровождается полным разрывом плазматических мембран и выходом внутриклеточного содержимого из клетки (рис. 4.5, 6). Аналогичные эффекты наблюдаются и при замораживании в физиологической среде двухклеточных эмбрионов мышей. Таким образом, внутриклеточная кристаллизация в незащищенных зиготах и 2-клеточных эмбрионах, возникающая на этапе замораживания, при отогреве вызывает значительные деструктивные изменения клеток, затрагивающие цитоматрикс и клеточную

мембрану.

В табл. 4.1 приведены данные об относительных объемах эмбрионов мышей в дегидратирующих растворах, которые обеспечивают различный уровень обезвоживания клеток. Как следует из табл. 4.1, предварительное обезвоживание зигот мышей в 0,5 и 1,0 М растворах NaCl приводит к уменьшению их объема максимум в 2 раза (рис. 4.6, 1, 2, рис. 4.7, 1, 2). Охлаждение клеток в данных растворах сопровождается разрыхлением цитоматрикса зигот и незначительным увеличением их объема, который при температуре ниже 0°C составляет 0,60 от исходного объема. Фазовый переход в растворах NaCl, как и в среде Дюльбекко, также происходит одновременно как во вне –, так и во внутриклеточной среде. В 0,5 М растворе NaCl льдообразование сопровождается высыпанием мелких кристаллов (рис. 4.6, 3), в то время как в 1,0 М растворе NaCl формируются разнонаправленные структуры линейные структуры (рис. 4.7, 3). Рекристаллизационные процессы в обоих случаях приводят к укрупнению кристаллических зерен (рис. 4.6, 4, рис. 4.7, 4). При отогреве повреждения плазматических мембран зигот мышей также наблюдаются сразу же после завершения плавления внутриклеточных кристаллов. В 0,5 М растворе NaCl цитоматрикс зиготы хотя и сохраняет некоторую компактность, однако имеет неправильные очертания, и единичные гранулы выходят из клетки (рис. 4.6, 7). В 1,0 М растворе NaCl отмечается полная дезорганизация внутриклеточных структур зиготы (рис. 4.7, 7). При температуре 22°C в 0,5 М растворе NaCl *zona pellucida* визуально остается неповрежденной (рис. 4.6, 8), в то время как в 1,0 М растворе NaCl она полностью разрушается (рис. 4.7, 8). По-видимому, повреждения ранних эмбрионов мышей связаны не только с образованием внутриклеточных кристаллов льда, но и с непосредственным длительным химическим воздействием на клеточные структуры высоких концентраций электролита.

В растворах 0,5 и 1,0 М сахарозы уровень обезвоживания зигот и двухклеточных эмбрионов ниже, чем в растворах NaCl (табл. 4.1, рис. 4.8, 2, рис. 4.9, 2, рис. 4.10, 2), что вполне естественно, поскольку эти растворы менее

Таблица 4.1

Относительный объем клеток в дегидратирующих растворах.

Концентрация раствора, моль/л	Натрий хлор	Сахароза		Этиленгликоль		Среда замораживания.
	зигота	зигота	двухклеточный эмбрион	зигота	двухклеточный эмбрион	двухклеточный эмбрион
0,5	0,47±0,009	0,77±0,012	0,79±0,011	-	-	-
1,0	0,50±0,010	0,61±0,010	0,63±0,009	-	-	-
5,37	-	-	-	0,37±0,011	0,33±0,008	-
5,37М ЭГ и 0,7М сахарозы	-	-	-	-	-	0,40±0,007

Примечание: результаты достоверны для (P<0,05)

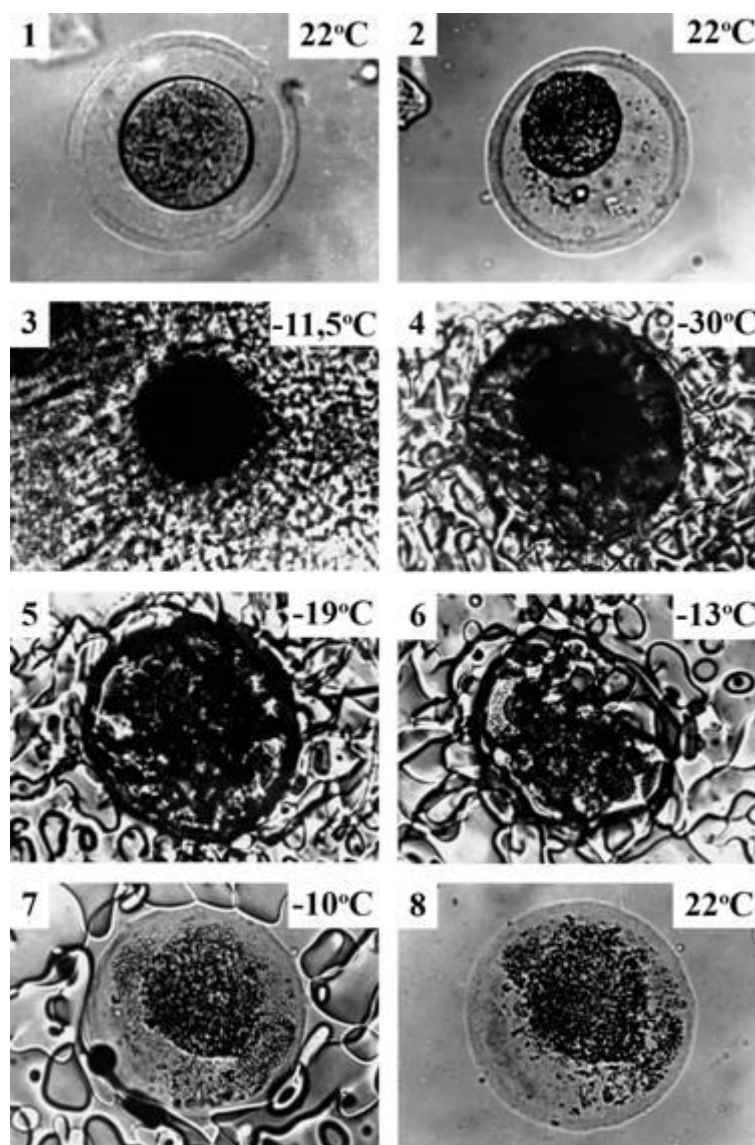


Рис. 4.6. Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в 0,5 М растворе NaCl: 1 – интактная клетка; 2 – обезвоживание зиготы мыши в 0,5 М растворе NaCl; 3,4 – охлаждение; 5-8 – отогрев. Увеличение при съемке $\times 100$.

осмотически активны. При охлаждении размер и морфология дегидратированных клеток сохраняется. Льдообразование во внеклеточном растворе сопровождается формированием более измельченной структуры (рис. 4.8, 4, рис. 4.9, 3, рис. 4.10, 3), чем в солевом растворе, что обусловлено повышенной вязкостью криозащитной среды, содержащей сахарозу. По сравнению с солевым раствором, при замораживании в данных средах, как зигот, так и двухклеточных эмбрионов отмечается смещение температуры внутриклеточного фазового перехода

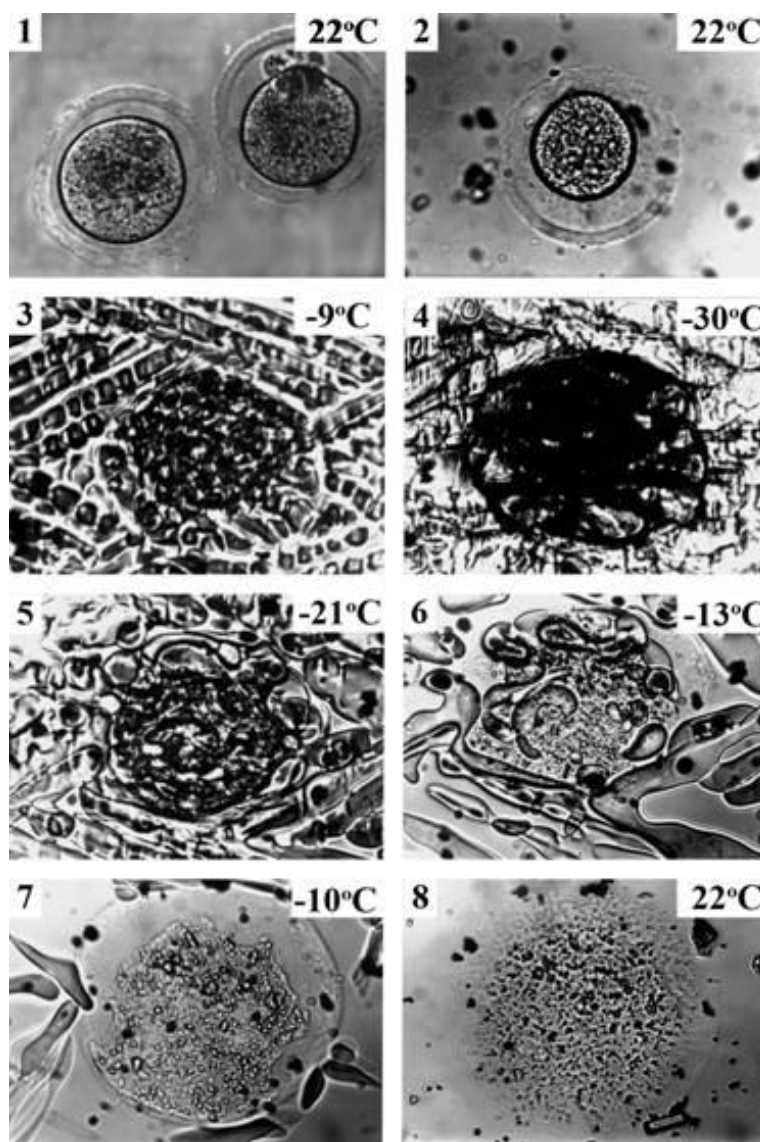


Рис. 4.7. Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в 1,0 М растворе NaCl: 1. – интактная клетка; 2. – обезвоживание зиготы мыши в 1,0 М растворе NaCl; 3,4 – охлаждение; 5-8 – отогрев. Увеличение при съемке $\times 100$.

относительно температуры кристаллизации во внеклеточном растворе. Переохлаждение цитоплазмы составляет не более 1°C (рис. 4.8. 5, рис. 4.9. 4, рис. 4.10. 4). Важно отметить, что внутриклеточная кристаллизация в двухклеточных эмбрионах происходит последовательным закристаллизовыванием бластомеров, что является следствием как различной степени переохлаждения их цитоплазмы, так и вероятностного характера внутриклеточного льдообразования (рис. 4.9, 3, рис. 4.9, 4). На этапе отогрева в зоне фазового перехода “лед – вода” плавление

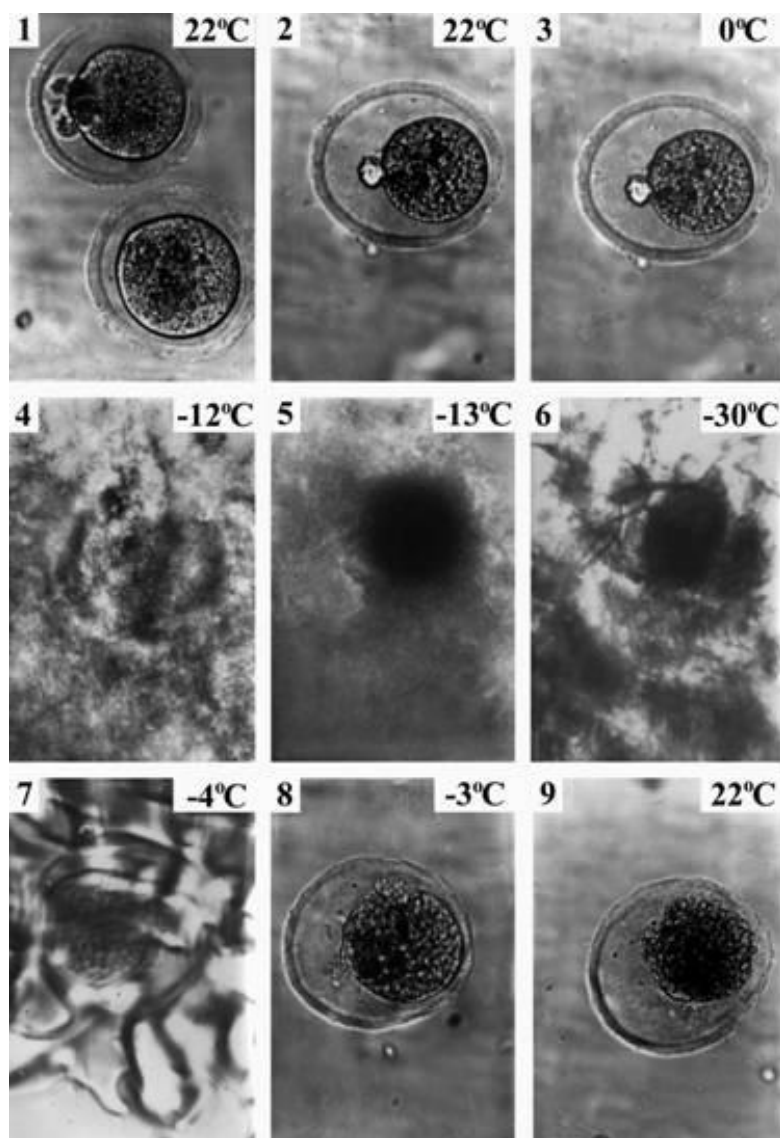


Рис. 4.8. Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в 0,5 М растворе сахарозы: 1 – интактная клетка; 2 – обезвоживание зиготы мыши в 0,5 М растворе сахарозы; 3-6 – охлаждение; 7-9 отогрев. Увеличение при съемке $\times 100$.

внутриклеточных кристаллов льда закономерно завершается быстрее, чем внеклеточных кристаллов (рис. 4.8, 7, рис. 4.9, 7, рис. 4.10, 7). Повреждения зигот и двухклеточных эмбрионов, замороженных в 0,5 М растворах сахарозы, фиксируются еще в зоне плавления внеклеточных кристаллов (рис. 4.8, 7, рис. 4.9, 7) и усугубляются по мере повышения температуры (рис. 4.8, 8, рис. 4.9, 8). При температуре 22°C *zona pellucida* зигот имеет нерегулярные границы, а плазматические мембраны – локальные разрывы. Тем не менее, внутриклеточное

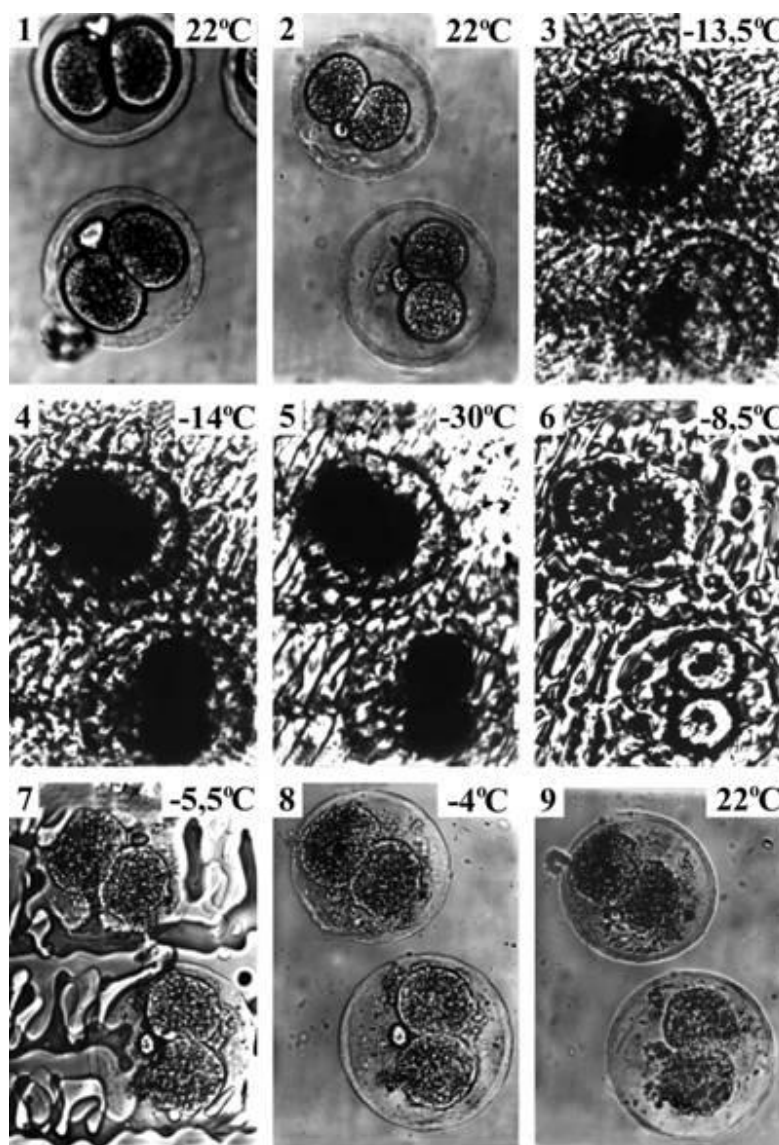


Рис. 4.9. Кинетика замораживания-оттаивания двухклеточных эмбрионов мыши в 0,5 М растворе сахарозы: 1 – интактные клетки; 2 – обезвоживание двухклеточных эмбрионов мыши в 0,5 М растворе сахарозы; 3-5 – охлаждение; 6-9 – отогрев. Увеличение при съемке $\times 100$.

содержимое зигот остается компактным (рис. 4.8, 9). Повреждения двухклеточных эмбрионов мыши сопровождаются потерей границ между бластомерами, множественными разрывами плазматических мембран и нарушением компактности гранулоплазмы (рис. 4.9, 8, рис. 4.9, 9).

В зиготах, замороженных в 1,0 М растворах сахарозы, после плавления внутриклеточных кристаллов грубые повреждения плазматической мембраны

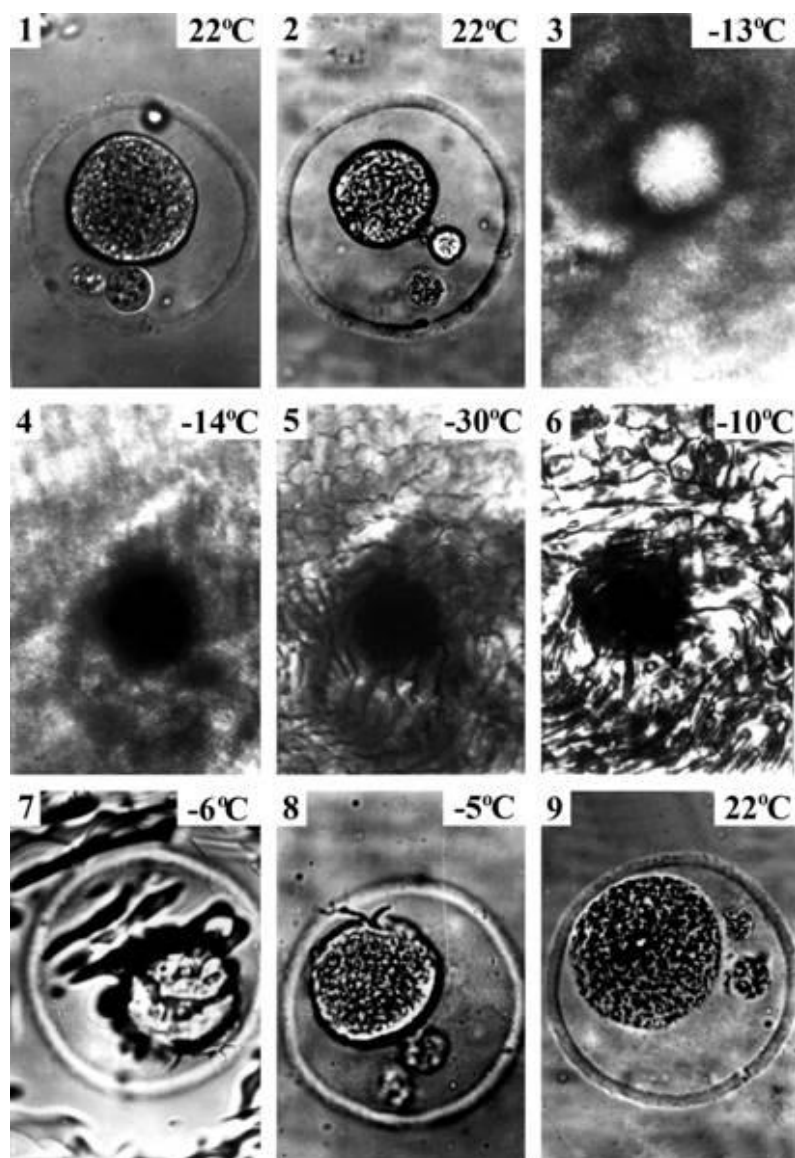


Рис. 4.10. Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в 1,0 М растворе сахарозы: 1 – интактная клетка; 2 – обезвоживание зиготы мыши в 1,0 М растворе сахарозы; 3-5 – охлаждение; 6-9 – отогрев. Увеличение при съемке $\times 100$.

отсутствуют. Однако по мере повышения температуры отмечается постепенное набухание клеток. Так, уже при -5°C объем зиготы сравним с объемом интактной клетки (рис. 4.10, 8), а при 22°C он превышает его в 1,27 раза. Морфологически внутриклеточное содержимое выглядит несколько разрыхленным. Видимых повреждений *zona pellucida* и плазматической мембраны не наблюдается (рис. 4.10, 9). Двухклеточные эмбрионы, замороженные в 1,0 М растворе сахарозы, имеют такие же характерные морфологические повреждения, как и при

замораживании в 0,5 М растворе сахарозы.

Таким образом, предварительное обезвоживание эмбрионов мышей ранних стадий развития в растворах непроникающих веществ (сахароза и NaCl) не позволяет предотвратить внутриклеточную кристаллизацию, которая неизбежно приводит к выраженным повреждениям клеток. В связи с этим было исследовано сочетанное воздействие двух факторов: одновременного обезвоживания и насыщения эмбрионов мышей проникающим криопротектором в высококонцентрированных растворах. В качестве криозащитного раствора была применена криоконсервирующая среда на основе этиленгликоля и сахарозы.

Этиленгликоль в высоких концентрациях, обеспечивая витрификацию как вне – так и внутриклеточной среды, успешно используется для криоконсервирования различными методами ооцитов и эмбрионов многих млекопитающих [349, 350]. Смесь сахарозы и ЭГ оказалась эффективной при замораживании эмбрионов пони [351]. Одним из преимуществ ЭГ является его наименьшая токсичность по сравнению с другими проникающими криопротекторами. Этот факт подтвержден в работе [352] при исследовании влияния проникающих криопротекторов (ДМСО, ЭГ, 1,2–пропандиола, глицерина и ацетамида), входящих в состав витрифицирующейся смеси (40% проникающего криопротектора + 30% Ficoll + сахароза), на сохранность деконсервированных эмбрионов. Максимальная сохранность клеток была достигнута при использовании ЭГ и глицерина. Как считают авторы [352], все другие криопротекторы в таких высоких концентрациях оказывают токсическое действие на внутриклеточные органеллы эмбрионов, нарушая функции последних. Известно, что эмбрионы мышей выдерживают экспозицию в растворах ЭГ с концентрацией до 7,0 М [353]. Ооциты мышей, в отличие от эмбрионов, выдерживают лишь непродолжительную экспозицию в 7,0 М растворе ЭГ, а увеличение времени экспозиции до 5 мин в растворах ЭГ с концентрацией более 4,0 М приводит к формированию пузырей (блебов) и нарушению микрофиламентов.

Исходя из вышеизложенного, попытка использовать при подготовке к

замораживанию эмбрионов мышей ранних стадий развития в качестве дегидратирующего раствора высокоосмотичную среду на основе 5,37 М ЭГ и 0,7 М сахарозы явилась вполне обоснованной. Это позволило уменьшить объем клетки, при котором она входила в процесс замораживания, до объема, составляющего 0,40 от исходного значения (табл. 4.1), одновременно частично заместив внутриклеточную воду проникающим криопротектором.

Кинетика замораживания двухклеточного эмбриона мыши в криозащитной смеси представлена на рис. 4.11. Видно, что охлаждение двухклеточных эмбрионов мыши до температуры -100°C не сопровождается видимыми изменениями как во внеклеточной, так и во внутриклеточной средах. Криозащитная смесь остается оптически прозрачной, а бластомеры сохраняют исходную оптическую плотность (рис. 4.11, 3), что свидетельствует об отсутствии рассеивающих свет частиц в виде кристаллических зерен как во вне —, так и во внутриклеточной среде. Этот факт дает основание считать, что данная криозащитная смесь способна стекловаться. Однако на этапе отогрева в области температур $-62...-60^{\circ}\text{C}$ во внеклеточной среде регистрируется немногочисленное высыпание кристаллических зародышей в виде дендритных розеток (рис. 4.11, 4). При дальнейшем повышении температуры кристаллические структуры, не успев развиваться, постепенно расплавляются (рис. 4.11, 5, рис. 4.11, 6), что исключает вероятность непосредственного контакта клеток с образовавшимися кристаллами льда. Эмбрионы сохраняют свою морфологию в области отрицательных температур вплоть до 0°C (рис. 4.11, 7). При температуре выше 0°C отмечается постепенное просветление бластомеров, сопровождающееся увеличением их размера (рис. 4.11, 8). При достижении 22°C объем бластомеров превосходит интактный практически в 1,22 раза, что свидетельствует о проникновении внеклеточного раствора в клетки (рис. 4.11, 9). Тем не менее, граница между бластомерами остается четкой, а плазматическая мембрана и *zona pellucida* не имеет разрывов.

Таким образом, исследования процесса замораживания эмбрионов мышей ранних стадий развития показали, что наиболее эффективным способом

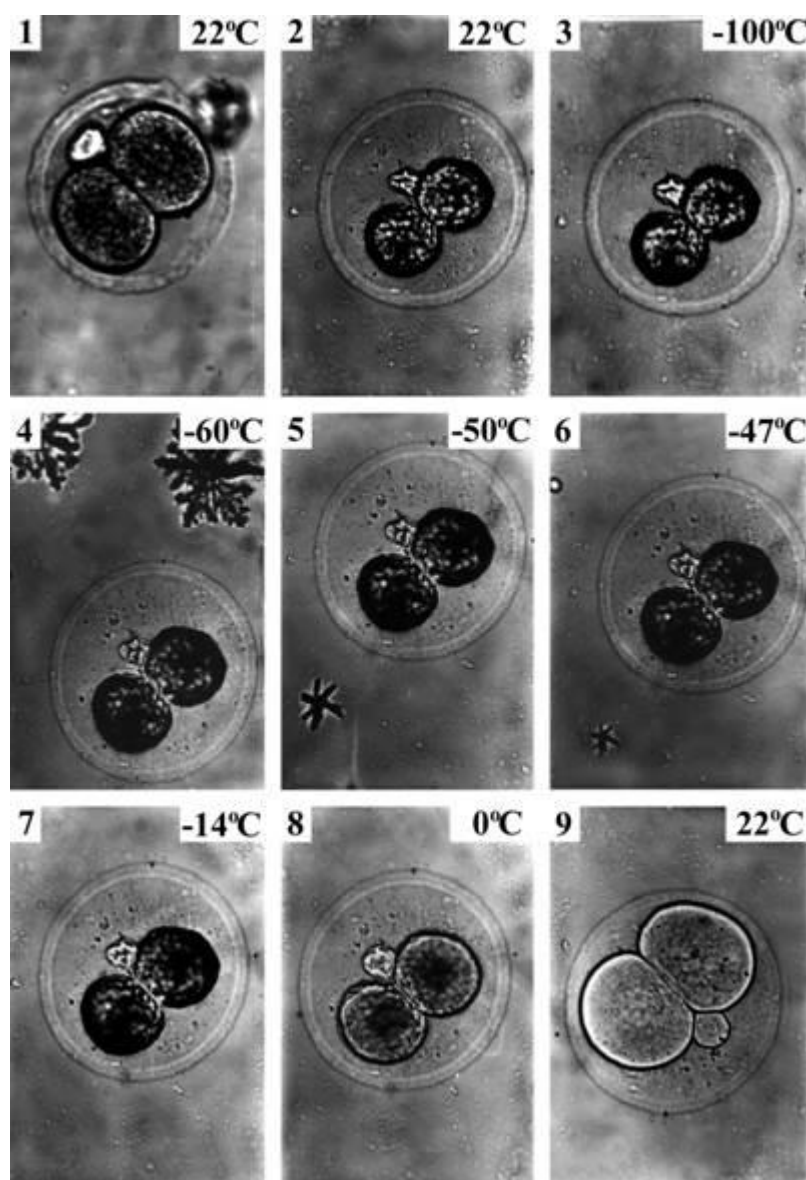


Рис. 4.11. Кинетика замораживания–оттаивания двухклеточного эмбриона мыши в этиленгликоль – сахарозной среде: 1 – интактная клетка; 2 – обезвоживание двухклеточного эмбриона мыши в этиленгликоль – сахарозной среде; 3 – охлаждение; 4-9 – отогрев. Увеличение при съемке $\times 100$.

исключения повреждений клеток, обусловленных кристаллообразованием, является применение криозащитной среды, содержащей 5,37 М ЭГ и 0,7 М сахарозы склонной к стеклованию даже при медленных скоростях охлаждения ($5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). Формирование кристаллической структуры наблюдаемое в данной среде при отогреве не является опасным. Его вполне возможно полностью

исключить прохождением этого температурного интервала с несколько большей скоростью, чем была в наших исследованиях.

Указанная этиленгликоль – сахарозная среда была использована автором работы [354] при криоконсервировании двухклеточных эмбрионов мышей в пластиковых соломинках методом прямого погружения в жидкий азот (-196°C). Клетки к замораживанию готовили согласно рекомендациям, приведенным в работе [348]. Соломинки отогревали 20 с на водяной бане при 37°C . Культивирование клеток в условиях *in vitro* показало, что после размораживания жизнеспособными остаются не менее 60% эмбрионов.

4.3. Выводы

В результате проведенных в данном разделе исследований показано, что вовлечение спермиев человека в процесс активной структурной перестройки внеклеточного льда при рекристаллизации может привести к повреждению клеток в результате действия механического фактора.

Установлено, что предварительное обезвоживание эмбрионов мышей ранних стадий развития в растворах непроникающих веществ не позволяет предотвратить внутриклеточную кристаллизацию, которая неизбежно приводит к выраженным повреждениям клеток. Наиболее эффективным способом исключения повреждений клеток, обусловленных вне – и внутриклеточным кристаллообразованием, является сочетание предварительного обезвоживания и насыщение клеток проникающим криопротектором.

С точки зрения особенностей развития внеклеточных кристаллизационных процессов обоснована двухэтапная программа замораживания спермиев человека под защитой 1,37 М глицерина, предусматривающая прохождение зоны фазового перехода со скоростями ($20\text{--}25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) угнетающими, рекристаллизацию, а также эффективность использования для криоконсервировании ранних эмбрионов мышей высокоосмотичной этиленгликоль–сахарозной среды способной стекловаться даже при медленных ($5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) скоростях замораживания.

Материалы раздела 4 опубликованы в работах [330–333, 338, 346].

РАЗДЕЛ 5

ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В РАСТВОРАХ НЕЭЛЕКТРОЛИТОВ РЯДА Н–СПИРТОВ КАК ИНДИКАТОР ТРАНСМЕМБРАННОГО МАССОПЕРЕНОСА ВЕЩЕСТВ В СИСТЕМЕ “КЛЕТКА–СРЕДА”

Сложность успешной реализации низкотемпературного консервирования биологических объектов обусловлена многостадийностью метода. Каждый из его этапов, создавая стрессовую ситуацию, вызывает определенную адаптационную клеточную реакцию. Последовательное наложение изменений в клетке, связанных с осмотическим, температурным шоком, явлениями фазового перехода, на завершающем этапе может привести к необратимым структурным повреждениям клетки и к потере ею функциональной активности. Естественно, что первичным звеном, прежде всего отвечающим на внешнее воздействие, является плазматическая мембрана. Сохранение условий внутренней среды клетки обеспечивается не только механической прочностью мембраны, но и устойчивостью ее функции как селективного барьера для ионов и неэлектролитов. Все плазматические мембраны, несмотря на некоторые структурно-функциональные отличия, зависящие от особенностей их деятельности, имеют одинаковую принципиальную схему строения, что, несомненно, обуславливает наличие некоторых общих механизмов их повреждения. Одной из стереотипных реакций биомембран считается изменение структурно-функциональных свойств липидного бислоя, следствием чего могут быть разносторонние сдвиги в активности мембранных белков и клетки в целом. Именно перестройка липидного бислоя мембран и изменение его фазового состояния приводит либо к адаптации клетки к внешнему воздействию, либо к ее повреждению.

Криозащитные среды, которые используются при подготовке клеточных

суспензий к криоконсервированию, имеют сложный состав и, как правило, гипертоничны. Поскольку изменение осмотических условий среды предшествует дальнейшему понижению температуры, важно оценить исходное состояние клеток, причем обусловленное не только гипертоничностью среды, но и специфическим воздействием на клетки ее компонентов, в частности криопротекторов и солей, тем более что в условиях внеклеточного льдообразования повышение концентрации этих веществ в каналах усиливает их действие.

Уникальной криобиологической моделью для изучения возможных механизмов криоповреждения и криозащиты является эритроцит, поскольку проявляет чрезвычайную чувствительность к внешним воздействиям любой природы, отражением которой является его трансформация.

Известно, что физические, биофизические и биохимические показатели зависят от продолжительности жизни эритроцитов в физиологических условиях, а их форма тесно связана с функциональным состоянием [214, 355]. Геометрические параметры (отношения площади поверхности к объему S/V , толщины к диаметру) и двояковогнутая форма эритроцита обеспечивают ему не только эластичность и пластичность, т.е. способность к деформации, но и полноценное выполнение его основной физиологической функции – быстрый газообмен с плазмой. Любой сдвиг геометрических параметров снижает пластичность эритроцитов, которые становятся жесткими, не способными изменять свою форму при прохождении через кровеносные капилляры, что приводит к патологическому гемолизу. Сфера, которая является предельным предгемолитическим состоянием эритроцита, обладает максимальной жесткостью. Трансформация эритроцитов “диск – сфера” может протекать с образованием либо наружных спикул на мембране, кренирования (эхиноцитоз), либо инвагинированных клеток чашевидной формы (стоматоцитоз). Оба пути трансформации эритроцитов осуществляется через ряд промежуточных форм: двояковогнутый диск (нормоцит) – дискоэхиноцит – сфероэхиноцит – неполная сфера – полная сфера или двояковогнутый диск – стоматоцит – неполная сфера –

полная сфера [262, 265].

Наличие в молекулах амфифильных соединений гидрофобной и гидрофильной части позволяет им проникать в плазматическую мембрану и, определенным образом распределяясь в ней, влиять на форму эритроцитов [356–358]. Характер морфологических изменений эритроцитов может указывать на особенности распределения экзогенного интеркалирующего соединения во внутримембранном пространстве [359, 360]. Получение такого рода информации крайне необходимо для понимания механизмов биологического действия таких активных химических соединений, как криопротекторы.

В связи с вышеизложенным в задачу исследований данного раздела входило изучение характера взаимосвязи между трансформацией эритроцитов человека в присутствии криопротекторов ряда *N*-спиртов и особенностями распределения их молекул в системе “клетка – окружающая среда” при подготовке клеточных суспензий к консервированию.

5.1. Трансформация эритроцитов человека в присутствии различных классов амфифильных соединений

Для идентификации спектра морфологических изменений эритроцитов человека нами были изучены особенности их трансформации в присутствии следующих представителей амфифильных соединений: анионных – децилсульфата натрия; катионных – хлорпромазина; неионных – додецил- β ,*D*-мальтозида и цвиттерионных – 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната [361].

Растворы амфифильных соединений готовили на 0,01 М фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl, pH 7,4. Конечный гематокрит составлял 0,4%. Реакцию эритроцитов на введение амфифильных соединений проводили в “живой капле” непосредственно под световым микроскопом, что позволяло наблюдать за трансформацией клеток, начиная с 30 с взаимодействия.

В связи с тем, что в данной серии экспериментов, а также и в последующих

исследованиях использовали эритроциты, отмытые физиологическим раствором, было проанализировано состояние клеток до введения реагентов. В плазме популяция эритроцитов представлена двояковогнутыми дисками, которые формируют монетные столбики, встречаются единичные эхиноциты (рис. 5.1, 1). Перенос клеток из плазмы в физиологический раствор приводит к кренированию

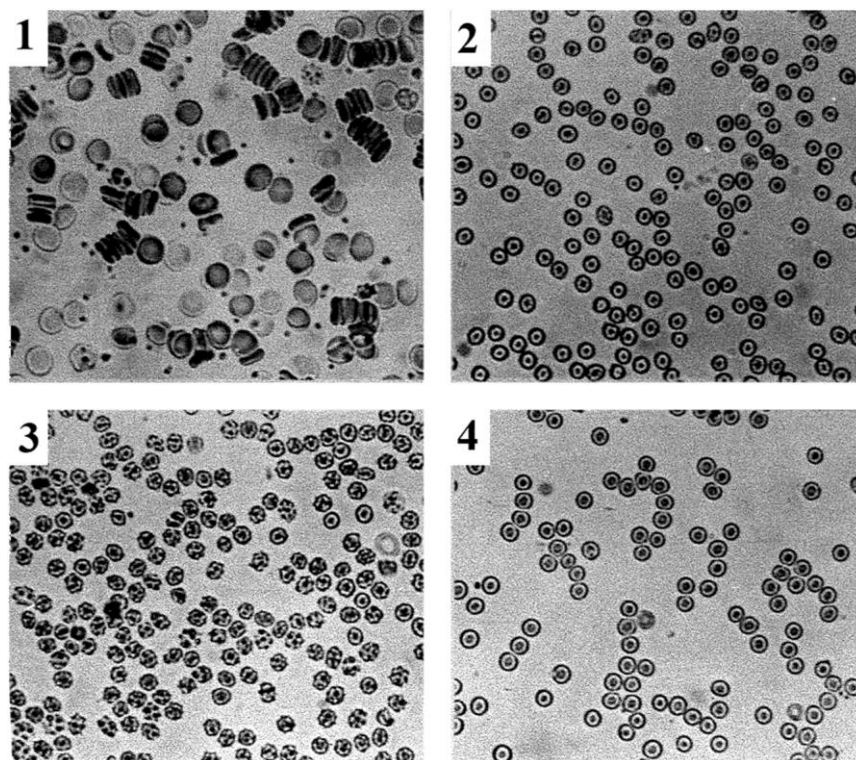


Рис. 5.1. Морфозэритрограммы донорской крови человека: 1 – цельная кровь; 2 – замена плазмы фосфатным буфером; 3 – замена плазмы физиологическим раствором; 4 – замена физиологического раствора фосфатным буфером. Увеличение при съемке $\times 200$.

эритроцитов (рис. 5.1, 3). Клетки значительно уменьшаются в размере, что свидетельствует об их трансформации в сфероэхиноциты. Перенос эритроцитов из плазмы в фосфатный буфер также сопровождается резким уменьшением поперечного сечения клеток, однако эхиноцитоз не отмечается. Клетки имеют сглаженную поверхность мембраны с четко выраженной центральной ямкой (рис. 5.1, 2), наличие которой характерно для куполообразных форм эритроцитов – стоматоцитов. При переносе эритроцитов из физиологического раствора в

фосфатный буфер наблюдается исчезновение мембранных спикул (рис. 5.1, 4). Клетки принимают форму аналогичную, приведенной на рис. 5.1, 2. Таким образом, предварительный морфологический анализ состояния эритроцитов показал, что последующие исследования проводили на исходно кренированных клетках. Наличие же в среде фосфат ионов нивелирует эхиноцитоз отмытых физиологическим раствором эритроцитов, трансформируя их в инвагинированные формы. В связи с этим возникновение нерегулярности мембраны эритроцитов можно рассматривать как специфическое действие исследуемых соединений.

При введении в суспензию отмытых эритроцитов катионного амфифила хлорпромазина (160 мкМ) основная масса клеток трансформируется в стоматоциты и сферостоматоциты (рис. 5.2, 1). Реакция клеток на введение в среду анионного соединения децилсульфата натрия (40 мкМ) (рис. 5.2, 2) и неионного соединения додецил- β ,D-мальтозида (12 мкМ) (рис. 5.2, 4) сопровождается формированием сферозхиноцитов. Присутствие в суспензионной среде цвиттерионного амфифила 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната (8 мкМ) (рис. 5.2, 3) индуцирует сферуляцию эритроцитов. Морфологические изменения клеток устойчивы при экспозиции до 30 мин.

Известно, что плазменные белки, в частности, альбумин, который содержится в плазме в довольно больших концентрациях, играют важную роль в стабилизации двояковогнутой формы эритроцитов [362]. Учитывая это, была исследована трансформирующая активность амфифильных соединений при суспендировании эритроцитов в плазме. Как оказалось, в этом случае анионное и неионное амфифильные соединения не вызывают трансформацию клеток, несмотря на то, что их концентрация в суспензии была в 8-9 раз выше, чем при исследовании форм эритроцитов в физиологическом растворе: эритроциты сохраняют способность к формированию монетных столбиков, отмечается незначительное количество эхиноцитарных форм (рис. 5.3, 1, рис. 5.3, 3). В то же время, цвиттерионный амфифил 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат в концентрации 40 мкМ (против 8 мкМ в физиологическом растворе) приводит к

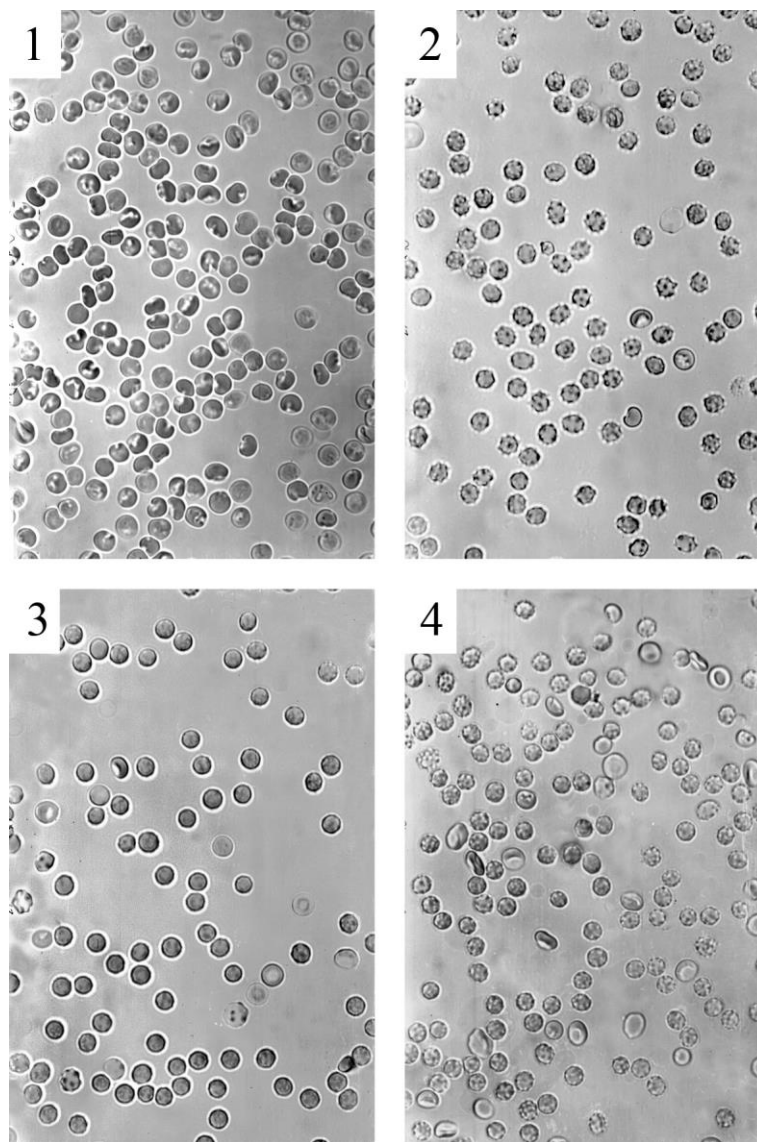


Рис. 5.2. Реакция отмытых эритроцитов человека на введение амфифильных соединений: 1 – хлорпромазин (катионное); 2 – децилсульфат натрия (анионное); 3 – 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат (цвиттерионное); 4 – додецил- β ,D-мальтозид (неионное). Увеличение при съемке $\times 200$.

сфероэхиноцитозу (рис. 5.3, 2), а катионный амфифил хлорпромазин, как и в физиологическом растворе, вызывает появление стоматоцитов, но только при концентрации выше 360 мкМ (против 160 мкМ в физиологическом растворе) (рис. 5.3, 4)

Таким образом, среда суспендирования эритроцитов определяет степень трансформирующей активности исследованных амфифильных соединений.

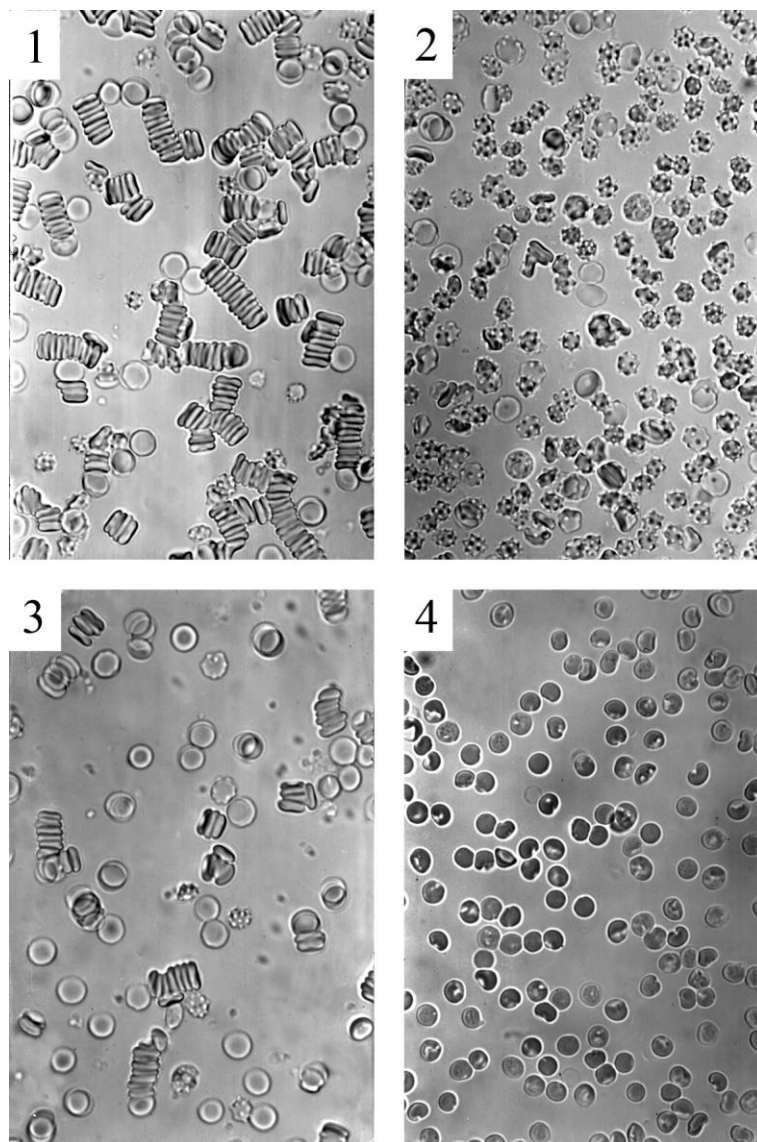


Рис. 5.3. Реакция эритроцитов человека в плазме на введение амфифильных соединений: 1 – додецил- β ,D-мальтозид (неионное); 2 – 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат (циттерийонное); 3 – децилсульфат натрия (анионное); 4 – хлорпромазин (катионное). Увеличение при съемке $\times 200$.

В физиологическом растворе, в котором клетки исходно кренированы, трансформирующей активностью обладают все исследуемые амфифильные соединения. Наличие плазменных белков, по-видимому, играет роль своеобразного экрана, ограничивающего доступ молекул амфифилов к эритроцитарной мембране. В связи с этим в цельной крови только катионное и цвиттерийонное соединения вызывают трансформацию клеток, причем в

концентрациях значительно более высоких, чем в физиологическом растворе.

Теоретическое объяснение многообразия форм эритроцитов, обусловленных действием различных факторов основаны на представлении о мембране как об упругой оболочке, которая при изгибе запасает упругую энергию, т.е. обладает упругостью изгиба [358, 363]. Упругие свойства мембраны эритроцита характеризуются двумя параметрами: коэффициентом упругости изгиба D и спонтанной кривизной K_s , которую имеет мембрана в ненапряженном состоянии [364]. Большая часть поверхности нормальной клетки (дискоцита) имеет отрицательную спонтанную кривизну. Если же спонтанная кривизна мембраны K_s отрицательна, но по абсолютной величине не превосходит некоторое критическое значение, то клетка приобретает форму стоматоцита. Если же большая часть мембраны имеет положительную спонтанную кривизну, т.е. стремится выгнуться выпуклостью наружу, то эритроцит трансформируется в эхиноцит. Возникновение отличной от бесконечности спонтанной кривизны мембраны в соответствии с гипотезой “бислойной пары” M. Sheetz и S. Singer [365, 366] может быть обусловлено различием площадей монослоев бислойной мембраны. При этом, если площадь внешнего монослоя больше внутреннего, то спонтанная кривизна K_s в основном положительна, в противном случае – в основном отрицательна. Другими словами, если молекулы воздействующего на эритроциты вещества способны встраиваться во внешний мембранный монослой, то увеличивается его площадь и кривизна имеет тенденцию к увеличению, и поэтому эритроцит приобретает эхиноцитарную форму. Если же молекулы вещества встраиваются во внутренний монослой, спонтанная кривизна бислоя сдвигается в сторону меньших значений, что приводит к стоматоцитозу. Теоретический расчет показывает [367], что величина разницы площадей внешнего S и внутреннего S_{in} монослоев эритроцитов составляет для дискоцита – $0,41 \text{ мкм}^2$, для сфероцита – $0,42 \text{ мкм}^2$, для стоматоцита – $0,39 \text{ мкм}^2$, для сфероэхиноцита – $0,93 \text{ мкм}^2$. Следовательно, при увеличении разности $S - S_{in}$ на мембране возникают спиккулы, а при уменьшении – инвагинации. Для того, чтобы трансформировать дискоцит в стоматоцит путем изменения разности площадей

монослоев мембраны, нужно включить в цитоплазматический монослой около 4×10^4 амфифильных молекул средних размеров (с площадью, занимаемой на мембране, $0,5 \text{ нм}^2$). Для трансформации дискоцита в эхиноцит требуется включение в наружный монослой значительно большего числа таких молекул – порядка 10^6 (приблизительно 1 молекула включаемого в мембрану вещества на 200 молекул ее липидов) [355].

Возникновение спонтанной кривизны может быть обусловлено также асимметричной эффективной формой молекул, входящих в состав мембраны, изменением конформации белковых молекул, взаимодействующих с липидным матриксом мембраны, а также асимметричным распределением электрического заряда между внешней и внутренней поверхностью мембраны [364]. В работе [262] указывается, что трансформация эритроцитов контролируется осмотическим давлением спектринового геля и поверхностным натяжением наружной и цитоплазматической части липидного бислоя мембраны. При большом положительном отношении поверхностных натяжений двух частей бислоя и большой положительной или отрицательной величине осмотического давления наиболее вероятно образование эхиноцитарных форм, при небольших абсолютных значениях всех трех величин – чашевидной или двояковогнутой формы.

Существенную роль в поддержании формы эритроцитов играют также вязкопластические свойства мембраны и состояние спектрин – актиновой сети, которая придает мембране значительное сопротивление на изгиб. При трансформациях эритроцита спектрин – актиновая сеть может разрушаться и восстанавливаться вновь, на что указывают перемещения интегральных белков, подвижность которых в обычных условиях весьма ограничена [363].

Исходя из сказанного, эхиноцитоз и сфероэхиноцитоз эритроцитов, обработанных представителями неионных, цвиттерионных и анионных амфифильных соединений, свидетельствует о локализации их молекул во внешнем монослое липидного бислоя. Стоматоцитоз эритроцитов, обусловленный присутствием в среде катионного амфифильного соединения

хлорпромазина, является следствием распределения его молекул во внутреннем монослое. Положительно заряженные молекулы хлорпромазина проникают в мембрану и связываются с цитоплазматическим монослоем липидов в мембране вследствие подавляющего содержания в нем отрицательно заряженных молекул фосфатидилсерина [368, 369], уменьшая таким образом разницу $S-S_{in}$ площадей внешнего и внутреннего монослоев. Характерно, что стоматоциты имеют меньший объем, но такую же площадь поверхности мембраны, как и двояковогнутые диски [362].

Нами были проанализированы последовательные стадии развития стоматоцитоза эритроцитов человека в плазме при действии катионного амфифильного соединения хлорпромазина [370, 371]. Раствор хлорпромазина с исходной концентрацией 10 мМ готовили на физиологическом растворе. Экспериментально была подобрана максимальная концентрация хлорпромазина, при которой основная масса клеток в суспензии трансформировалась в сфероциты или неполные сферы – сферостоматоциты, у которых сохранялась небольшая центральная ямка, однако гемолиз еще отсутствовал. Такая концентрация при использованном в эксперименте гематокрите $\cong 30\%$ составила 1 мМ ($1,8 \times 10^8$ молекул хлорпромазина на эритроцит). Минимальная исследуемая концентрация хлорпромазина, при которой форма эритроцитов заметно не изменялась, была 0,125 мМ, что составляет $2,3 \times 10^7$ молекул хлорпромазина на эритроцит.

На рис. 5.4 приведены микрофотографии, иллюстрирующие трансформацию эритроцитов при возрастании концентрации хлорпромазина в суспензии. На рис. 5.5 схематически изображены последовательные стадии стоматоцитоза, соответствующие приведенным микрофотографиям. Видно (рис. 5.4, 2), что при концентрации хлорпромазина равной 0,125 мМ клетки сохраняют способность к формированию монетных столбиков. Диаметр эритроцитов не изменяется, однако встречаются единичные эритроциты, у которых сглажена одна центральная ямка. Клетки находятся в начальной стадии трансформации (рис. 5.4, 2, рис. 5.5, б). При увеличении концентрации хлорпромазина до 0,25 мМ

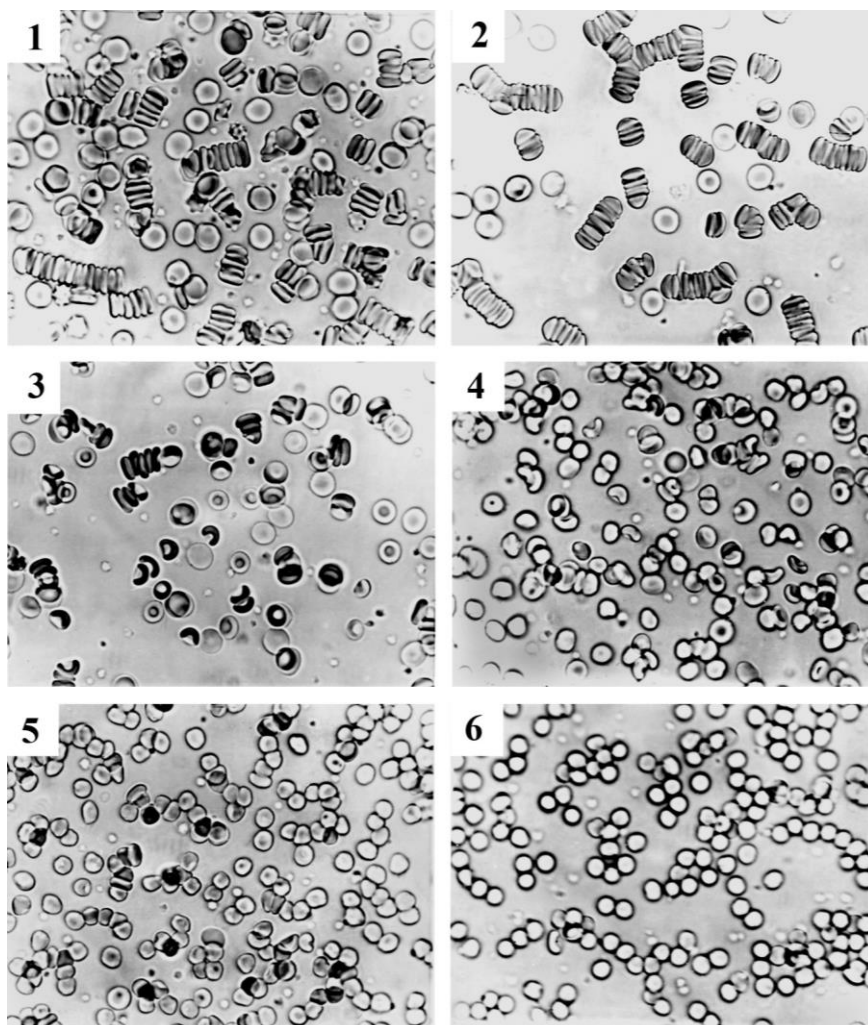


Рис. 5.4. Трансформация эритроцитов человека при введении в суспензию хлорпромазина: 1 – норма; 2 – 0,125 мМ; 3 – 0,25 мМ; 4 – 0,5 мМ; 5 – 0,75 мМ; 6 – 1,0 мМ. Увеличение при съемке $\times 200$.

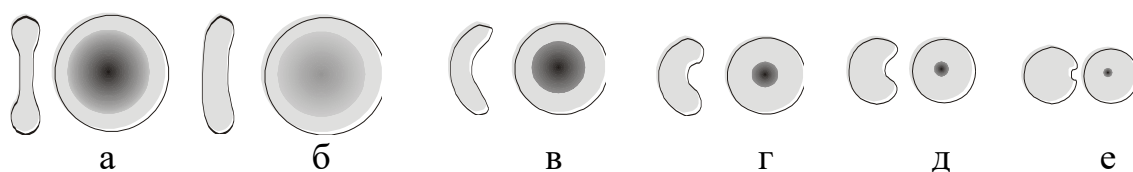


Рис. 5.5. Схематические стадии трансформации эритроцитов человека: а – нормоцит (дискоцит) с диаметром 7–8 мкм; б – дискоцит со сглаженной одной лункой без изменения диаметра; в – стоматоцит – I с диаметром $\cong 6$ мкм; г – стоматоцит – II с диаметром $\cong 5$ мкм; д – стоматоцит – III с диаметром $\cong 4$ мкм; е – сферостоматоцит с диаметром $\cong 3,2$ – $3,4$ мкм. Стоматоциты I, II и III степени – куполообразные (инвагинированные) клетки с разной глубиной и формой центральной ямки.

заметно уменьшаются диаметр поперечного сечения эритроцитов и диаметр центральной ямки, который у нормоцита составляет 35–55% от диаметра клетки [265]. Популяция эритроцитов представлена, в основном, стоматоцитами первой степени (стоматоциты–I) (рис. 5.4, 3, рис. 5.5, в). Изредка встречаются стоматоциты второй степени (стоматоциты–II), у которых еще более выражено уменьшение диаметра поперечного сечения и центральной ямки (рис. 5.5, г). При концентрации хлорпромазина 0,5 мМ (рис. 5.4, 4.) и 0,75 мМ (рис. 5.4, 5) наблюдается дальнейшее сглаживание центральной ямки: основная масса клеток представляет собой стоматоциты третьей степени (стоматоциты – III) и сферостоматоциты или неполные сферы, у которых центральная ямка едва различима (рис. 5.5, д, е). При концентрации хлорпромазина 1 мМ инвагинация мембраны исчезает, и эритроциты приобретают сферическую форму (рис. 5.4, 6).

Таким образом, морфологические изменения эритроцитов человека в присутствии реагентов, обладающих различными свойствами, позволяет качественно оценить характер их взаимодействия с мембраной.

5.2. Морфологические изменения эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда Н-спиртов при их трансмембранном перераспределении

Наиболее часто применяемые в практике криоконсервирования криопротекторы представляют собой неэлектролиты различной молекулярной массы. Нами была изучена взаимосвязь морфологических изменений эритроцитов человека, обусловленных влиянием на плазматическую мембрану неэлектролитов ряда Н-спиртов этанола, 1,2-пропандиола, глицерина, полиэтиленгликолей с молекулярной массой 400, 600, 1500 и характером распределения их молекул в системе “клетка-среда” при 25°C [372–375]. Растворы криопротекторов готовили на 0,015 М фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl (рН 7,4). Для исключения влияния собственно тоничности среды на форму эритроцитов эксперименты проводили в условиях постоянства

внеклеточного осмотического давления в пределах 750 ± 50 мОсм/л. Регистрацию морфологической картины взаимодействия отмытых эритроцитов с растворами неэлектролитов проводили через 10 мин после начала контакта клеток с ними.

Серия микрофотографий, приведенная на рис. 5.6, иллюстрирует морфологический ответ эритроцитов в растворах неэлектролитов ряда Н-спиртов. Как следует из рис. 5.6, 1 и 5.6, 2, реакция эритроцитов на введение в суспензию

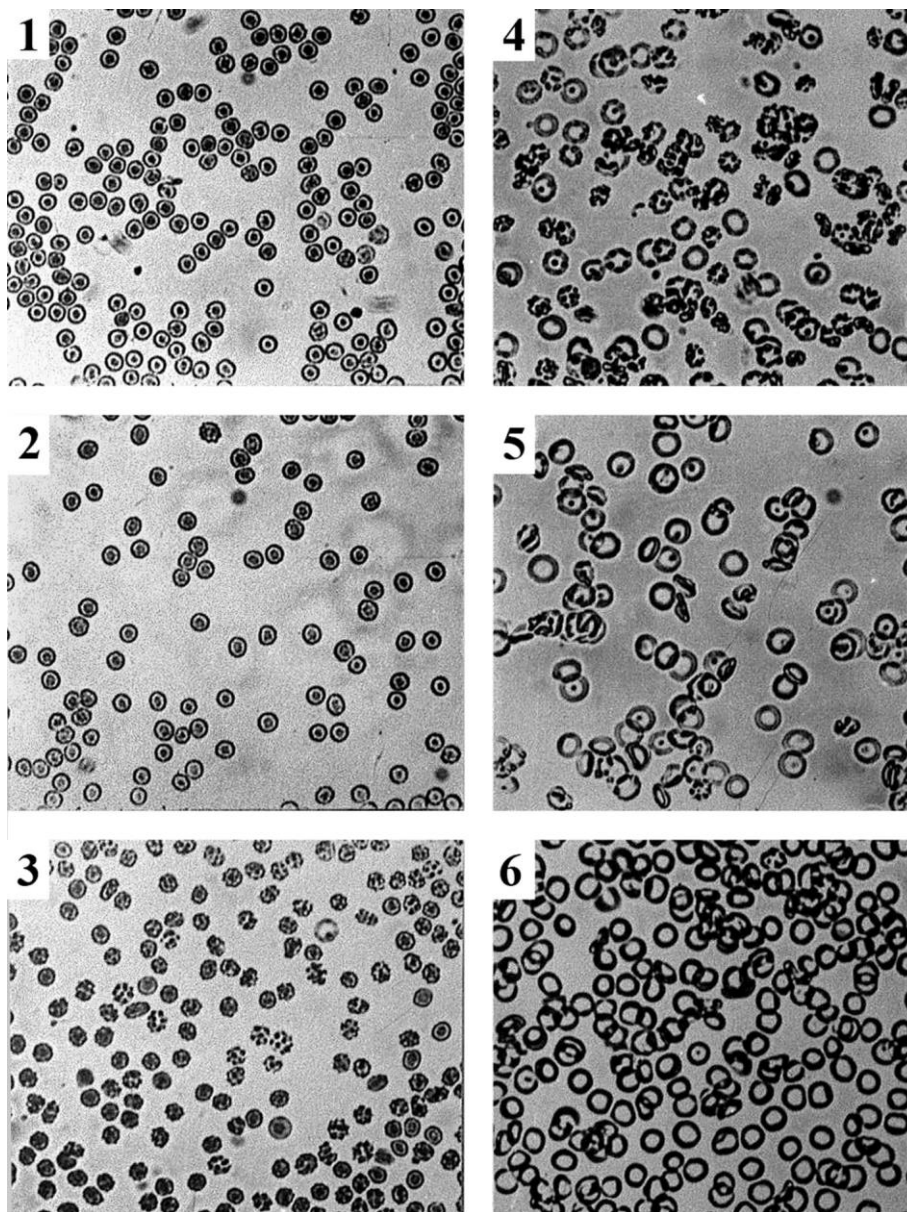


Рис. 5.6. Трансформация эритроцитов человека в растворах Н-спиртов после 10 мин взаимодействия (рН 7,4, $\pi = 750$ мОсм/л): 1 – 2,0% этанол; 2 – 2,7% 1,2-пропандиол; 3 – 3,3% глицерин; 4 – 8,4% ПЭГ-400; 5 – 10,2% ПЭГ-600; 6 – 15,0% ПЭГ-1500. Увеличение при съемке $\times 200$.

клеток 2,0% раствора этанола и 2,7% раствора 1,2-пропандиола практически идентична. Клетки трансформируются в куполообразные формы с существенным уменьшением поперечного сечения эритроцитов и различной глубиной и геометрией центральной ямки (сферостоматоцитоз). Реакция эритроцитов на введение 3,3% раствора глицерина сопровождается не только уменьшением размера клеток, но и формированием на поверхности мембраны многочисленных спикул, что указывает на выраженный сфероэхиноцитоз (рис. 5.6, 3). В поле зрения встречается также незначительное количество сферостоматоцитов.

Качественно иной оказалась реакция клеток на введение в суспензию растворов полиэтиленгликолей различной молекулярной массы. Так, суспендирование эритроцитов в 8,4% растворе ПЭГ-400 (рис. 5.6, 4) приводит к уплощению клеток (паноцитоз) и их обезвоживанию, о чем свидетельствует увеличение поперечного сечения клеток, истончение тороидального ободка и увеличение диаметра центральной ямки. У преобладающего большинства эритроцитов отмечается нерегулярность мембраны в виде многочисленных спикул на тороидальном ободке – дискоэхиноцитоз (или акантоцитоз). Встречаются единичные инвагинированные формы – стоматоциты – I. Суспендирование эритроцитов в 10,2% растворе ПЭГ-600 также приводит к уплощению и обезвоживанию клеток. Эхиноцитоз практически отсутствует, трансформация в основной массе сопровождается образованием инвагинированных форм – стоматоцитов I (рис. 5.6, 5). Существенными отличиями реакции эритроцитов на введение 15,0% раствора ПЭГ-1500 (рис. 5.6, 6) явились отсутствие при обезвоживании деформированных клеток, а также сглаженность мембран. Клетки в основном чашевидной формы (стоматоцитоз – I).

Таким образом, сравнительный анализ реакции эритроцитов на введение в суспензию клеток низкомолекулярных (этанол, 1,2-пропандиол, глицерин) и высокомолекулярных (ПЭГ-400, ПЭГ-600, ПЭГ-1500) Н-спиртов выявил принципиальные различия в их морфологическом ответе. При взаимодействии эритроцитов с проникающими спиртами прослеживается сферуляция клеток с

формированием как спикул на поверхности мембран, сфероэхиноцитоз (глицерин), так и сглаженных форм, сферостоматоцитоз (этанол, 1,2-пропандиол). Для непроникающих спиртов наблюдается обезвоживание эритроцитов, дискоэхиноцитоз (ПЭГ-400), стоматоцитоз первой степени (ПЭГ-600, ПЭГ-1500). Полученные морфологические данные, безусловно, свидетельствуют о различном механизме действия исследованных Н-спиртов на клеточную мембрану.

Поскольку изменение физико-химических свойств цитоплазматических мембран и состояния спектрин – актиновой сети при суспендировании эритроцитов в растворах различных веществ, приводящих к трансформации клеток, может быть как следствием прямого взаимодействия веществ с мембраной, так и развиваться в процессе их проникновения внутрь клеток [359, 360, 376–378], нами методом ^1H -ЯМР спектроскопии был исследован характер перераспределения исследованных Н-спиртов между клеткой и средой.

В таблице 5.1. приведены рассчитанные численные значения коэффициентов распределения Q исследованных неэлектролитов в системе “клетка-среда”. Как следует из данных таблицы для низкомолекулярных веществ (этанол, 1,2-пропандиол, глицерин) значения Q близки к 1 и составляют соответственно 1,23, 0,95, 0,85. Это означает, что в стационарных условиях концентрации неэлектролитов в клетке и во внеклеточной среде практически совпадают. Следовательно для данного ряда веществ термодинамическое равновесие в условиях внеклеточной гипертоничности после 20-30 мин экспозиции устанавливается за счет проникновения веществ в клетку. При этом, как показано выше морфологическими исследованиями, эритроциты трансформируются в сфероэхиноциты (глицерин) и сферостоматоциты (стоматоциты III – этанол, 1,2-пропандиол).

Величины коэффициентов распределения Q для высокомолекулярных спиртов ПЭГ-400, ПЭГ-600, ПЭГ-1500 составляют 0,53, 0,52, 0,40 соответственно. Следует отметить, что относительно высокие значения Q обусловлены низким содержанием свободной растворяющей клеточной воды, по

Таблица 5.1

Значения коэффициентов распределения Q неэлектролитов ряда Н-спиртов в системе "клетка-среда".

Вещество	Отношение интенсивности сигнала вещества к сигналу воды		Остаточный объем межклеточной жидкости в плотной суспензии эритроцитов, %	Коэффициент распределения Q
	Надосадочная жидкость	Эритромаасса		
Этанол (n=5)	0,081±0,004	0,097±0,005	5-10	1,23±0,12 ¹
1,2-ПД (n=5)	0,067±0,004	0,064±0,003	6-10	0,95±0,10 ²
Глицерин (n=6)	0,081±0,005	0,070±0,004	5-10	0,85±0,09 ³
ПЭГ-400 (n=5)	0,229±0,010	0,127±0,019	1-5	0,53±0,09 ⁴
ПЭГ-600 (n=5)	0,246±0,012	0,134±0,017	1-5	0,52±0,09 ⁵
ПЭГ-1500 (n=5)	0,308±0,013	0,127±0,021	1-2	0,40±0,08 ⁶

Примечания: ^{2,3}; ^{4,5}; ^{5,6} – различия между значениями статистически недостоверны ($P < 0,95$); остальные вариации сравнения значений Q в ряду низкомолекулярных и в ряду высокомолекулярных Н-спиртов достоверны ($P > 0,95$).

отношению к которой определяется концентрация веществ в клетке, и вовсе не означают, что данные соединения проникают в клетку в больших количествах. Напротив, увеличение количества оксиэтильных групп в молекулах ПЭГ, т.е. увеличение их молекулярной массы, приводит к уменьшению коэффициента распределения Q, что свидетельствует об уменьшении вероятности проникновения данных соединений в клетки. Трансформация эритроцитов при взаимодействии с высокомолекулярными спиртами сопровождается планоцитозом, обусловленным обезвоживанием, что подтверждает преимущественную локализацию данных соединений во внеклеточной среде.

Как следует из данных табл. 5,1 коэффициент распределения Q

исследованных низкомолекулярных Н-спиртов между вне – и внутриклеточной средой имеет тенденцию к снижению в следующей последовательности: этанол > 1,2-пропандиол > глицерин. Следовательно, в единицу времени в клетку поступает различное количество вещества, что обусловлено различной проницаемостью мембран эритроцитов для данных соединений. Как известно [355], существенную роль в проницаемости веществ через клеточную мембрану играют их гидрофобно–гидрофильные свойства. Коэффициент распределения K_p , характеризующий гидрофобно–гидрофильные свойства Н-спиртов, в системе H_2O –хлороформ для глицерина, 1,2-пропандиола, ПЭГ-400, ПЭГ-1500 составляет соответственно $1,0 \times 10^{-5}$, $2,0 \times 10^{-3}$, $2,7 \times 10^{-1}$, 3,5, т.е. гидрофильность соединений падает в указанной последовательности [379]. Казалось бы, обладая наибольшей гидрофильностью, глицерин должен был бы иметь и наибольшую проницаемость, если допустить, что его массоперенос в эритроциты осуществляется по гидрофильным белковым каналам. Однако результаты работы [380] показали, что коэффициент проницаемости нативных эритроцитов для молекул 1,2-пропандиола $P = (1,6 \pm 0,24) \times 10^{-6}$ м/с значительно выше, чем для молекул глицерина $P = (0,038 \pm 0,003) \times 10^{-6}$ м/с. При этом, если при блокировании белковых каналов сульфгидрильным реагентом рСМBS, проницаемость мембран эритроцитов для молекул 1,2-пропандиола падает до $P = (0,664 \pm 0,18) \times 10^{-6}$ м/с, проницаемость для молекул глицерина не изменяется $P = (0,038 \pm 0,008) \times 10^{-6}$ м/с. Автор работы [380] делает принципиально важный вывод о том, что белковые каналы эритроцитарных мембран не доступны для молекул глицерина. Массоперенос же 1,2-пропандиола осуществляется как через липидную часть бислоя, так и по белковым порам ($P_n = 0,936 \times 10^{-6}$ м/с). Важным фактором, определяющим транспортные характеристики веществ, являются, безусловно, геометрические параметры их молекул. По оценкам работы [380] диаметр молекулы глицерина составляет 4,7 Å, ее длина – 5,2 Å, а объем – 90,2 Å³, что не позволяет ей проникать в эритроцит по белковым каналам (диаметр белковой поры эритроцита $\cong 4$ Å). В то же время размеры молекулы 1,2-пропандиола

(диаметр молекулы составляет $3,7 \text{ \AA}$, длина – $5,0 \text{ \AA}$, объем – $53,7 \text{ \AA}^3$) сопоставимы с размерами белковой поры, что и обуславливает наличие для этого вещества двух транспортных путей – липидного и через белковую пору. Вполне логично предположить, что именно с особенностями механизма перераспределения молекул глицерина и 1,2-пропандиола в мембране эритроцитов связан различный морфологический ответ клеток на контакт с ними. Проницаемость глицерина осуществляется путем диффузии по липидной части бислоя и в силу повышенной гидрофильности вещества этот процесс протекает медленно. Начальной стадией мембранного транспорта молекул глицерина является их интеркаляция во внешний монослой эритроцитарной мембраны. Это приводит к увеличению его площади по отношению к площади поверхности внутреннего монослоя. В результате возникшего дисбаланса площадей происходит трансформация дискоцитов в эхиноциты. Эхиноцитоз эритроцитов в растворе глицерина можно рассматривать как промежуточный этап в процессе его медленного проникновения в клетку. Следующим этапом является проникновение молекул глицерина во внутренний монослой, с чем, по-видимому, и связано появление единичных стоматоцитов. Поскольку проницаемость для молекул 1,2-пропандиола по липидному пути мембраны на порядок выше, чем для глицерина, стоматоцитоз эритроцитов в растворах 1,2-пропандиола обусловлен быстрым распределением его молекул во внутреннем монослое. Известно, что действие неразветвленных короткоцепочечных Н-спиртов на клеточные мембраны сопровождается изменением их текучести, поверхностного заряда, толщины диэлектрической проницаемости [381–384]. Быстро проникая в клетку, связывая и заменяя внутриклеточную воду, низкомолекулярные Н-спирты уменьшают количество растворяющей свободной воды, что приводит к изменению коллоидных свойств протоплазмы в целом, в том числе и свойств спектринового геля, а это, несомненно, также отражается на форме эритроцитов.

Высокомолекулярные Н-спирты обладают не только повышенной лиотропностью [379], но и значительной поверхностной активностью [385], которая возрастает при увеличении молекулярной массы. Так, если

поверхностная активность этиленгликоля и ПЭО-100 в диапазоне концентраций до 0,1% составляет соответственно только 7,0 эрг/см²моль и 30 эрг/см²моль, то поверхностная активность ПЭО-400 и ПЭО-1500 в той же концентрационной зоне составляет соответственно 115,0 эрг/см²моль и 176,0 эрг/см²моль [385]. В связи с этим молекулы высокомолекулярных Н-спиртов способны как адсорбироваться на поверхности мембраны, так и встраиваться в ее наружный липидный бислой, значительно модифицируя ее свойства. Изменение текучести липидного бислоя и фазовых переходов в нем при исследовании влияния полиэтиленгликолей на липосомы подтверждает возможность такого характера взаимодействия [386–388]. По мнению авторов [389] увеличение времени водного диффузионного обмена эритроцитов с ростом молекулярной массы полиэтиленгликолей, установленное методом ЯМР–спиновое эхо, обусловлено именно непосредственным взаимодействием высокомолекулярных неэлектролитов с мембраной. Количество ПЭГ-1500, прочно связывающегося с эритроцитами на этапе экспозиции клеток в растворе этого вещества в зависимости от температуры и способа добавления раствора к суспензии клеток составляет от нескольких сотых до 1,5% от общего количества молекул полимера, вводимого в среду суспендирования [390]. Молекулы ПЭГ-400 могут не только адсорбироваться на поверхности клетки, но и благодаря наличию в его молекулярно – массовом распределении низкомолекулярных фракций, распределяться в липидном бислое [379, 385]. Результатом взаимодействия высокомолекулярных неэлектролитов с клеточной мембраной может быть изменение соотношения площадей липидных бислоев, полиморфные превращения в липидной фазе, связанные с нарушением бислойной ламеллярной структуры, а также дегидратация головок фосфолипидов и усиление разделения бислоев [381, 391–393]. Изменения свойств мембран эритроцитов, обусловленные структурно – конформационными переходами в мембранных белках при действии криопротекторов, обнаружены и исследованиями методом ЭПР [394].

Наблюдаемый нами дискоэхиноцитоз эритроцитов в растворах ПЭГ-400 подтверждает вероятность встраивания молекул его низкомолекулярных фракций

во внешний бислой. Высокомолекулярные Н-спирты, по-видимому, могут действовать и как детергенты, экстрагируя из наружного бислоя часть липидов и белков и уменьшая таким образом его площадь, что приводит к стоматоцитозу [363]. Показано [364], что при обработке эритроцитов нейраминидазой, удаляющей гликокаликс, клетки действительно принимают форму, близкую к форме стоматоцитов. Авторами работы [395] установлено, что на этапе предобработки эритроцитов человека криозащитным раствором, содержащим ПЭГ-1500, уже через 5 мин в среде обнаруживается белок, экстрагируемый из мембран клеток, количество которого зависит от температуры и времени инкубации. Именно с потерей части примембранных белков, вероятнее всего, и связано появление инвагинированных форм эритроцитов в растворе ПЭГ-600 и ПЭГ-1500. Стоматоцитоз в растворах ПЭГ-1500 является универсальной и устойчивой морфологической реакцией эритроцитов, поскольку характерен не только для эритроцитов человека, но и для эритроцитов животных. Как показали наши исследования морфологии эритроцитов лошади, быка и собаки, перенос клеток всех видов животных в плазму после криоконсервирования под защитой 30% раствора ПЭГ-1500 не устраняет стоматоцитоз, имевший место на этапе подготовки клеток к криоконсервированию [396, 397].

Локализация высокомолекулярных Н-спиртов во внеклеточной среде способствует усилению действия на клетку осмотических сил. Существенная дегидратация клетки приводит к изменению осмотического давления спектринового геля, а молекулы ПЭГ, интеркалированные в мембрану изменяют поверхностное натяжение мембранных белков. Дегидратация и изменение ионной силы, сопровождающие добавление высокомолекулярных Н-спиртов к клеткам, могут также привести к структурным нарушениям белков цитоскелета, в частности сократительного белка, супермолекулярный комплекс которого преимущественно содержит мембранный актин и миозин, от активности которого во многом зависит форма эритроцита.

Таким образом, на этапе подготовки эритроцитов человека к криоконсервированию присутствие криозащитных веществ в суспензии

стимулирует адаптационную реакцию клеток, внешним проявлением которой в зависимости от вида криопротектора является специфическая трансформация.

5.3. Выводы

Проведенные в данном разделе исследования показали, что особенности трансформации эритроцитов человека в присутствии различного класса амфифильных соединений определяются характером распределения этих веществ в плазматической мембране. Это позволило обосновать использование морфологических изменений эритроцитов в присутствии криопротекторов, обладающих различными свойствами, в качестве теста характера их взаимодействия с мембраной.

Выявлены особенности трансформации эритроцитов человека, индуцированные взаимодействием и перераспределением в их мембранах низкомолекулярных (этанол, глицерин, 1,2-пропандиол) и высокомолекулярных (ПЭГ-400, ПЭГ-600, ПЭГ-1500) криопротекторов. Установлено, что в исследованном ряду неэлектролитов существует однозначная связь между коэффициентом их распределения Q в системе “клетка-среда” и формой эритроцитов. В растворах низкомолекулярных Н-спиртов преобладают явления кренирования (глицерин) и сферуляции эритроцитов (этанол, 1,2-ПД). Коэффициент распределения веществ между клеткой и средой в этом случае близок к 1,0, что свидетельствует о выравнивании химических потенциалов в системе путем проникновения веществ в клетку. В растворах высокомолекулярных Н-спиртов трансформация эритроцитов сопровождается планоцитозом и образованием преимущественно дискоэхиноцитов (ПЭГ-400) и инвагинированных форм (ПЭГ-600, ПЭГ-1500). В этом случае коэффициент распределения веществ между клеткой и средой близок к 0,5, что свидетельствует о выравнивании химических потенциалов в системе за счет обезвоживания клеток.

Значения коэффициентов распределения Q свидетельствуют о том, что

термодинамическое равновесие между вне – и внутриклеточной средой в присутствии 1,2-пропандиола достигается быстрее, чем в присутствии глицерина, несмотря на его повышенную гидрофильность. Это может быть обусловлено тем, что в связи с геометрическим несоответствием молекулы глицерина и белковой поры, проникновение глицерина в эритроцит осуществляется путем медленной диффузии по липидной части бислоя. В то же время проникновение 1,2-пропандиола может осуществляться как через липидный слой, так и сквозь белковую пору.

Материалы раздела 5 опубликованы в работах [361, 370–375, 396, 397].

РАЗДЕЛ 6

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИПЕРТОНИЧНОСТИ СРЕДЫ И ОХЛАЖДЕНИЯ НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

В зоне интенсивного развития внеклеточных кристаллов льда клетки подвергаются сочетанному воздействию непрерывно понижающейся температуры и возрастающей гипертоничности внеклеточного раствора. Скорость охлаждения следует рассматривать как еще один фактор влияния, определяющий время пребывания клеток в неблагоприятных условиях. Выделить специфические эффекты в повреждении клеток при замораживании каждого из этих стрессовых воздействий не представляется возможным. Моделирование данной криобиологической ситуации может реализоваться поэтапным изучением времени действия на клетки возрастающей концентрации электролита или других непроникающих веществ при комнатных температурах и последующего охлаждения до температур, при которых еще не возникают внеклеточные кристаллы.

В задачу исследований данного раздела входило изучение зависимости гипертонической устойчивости и криорезистентности эритроцитов человека от времени экспозиции клеток в растворах хлорида натрия, морфологический анализ их трансформации в условиях солевой гипертонии, а также выявление возможной первопричины гипертонического криогемолиза.

В качестве объектов исследования были использованы эритроциты взрослых доноров и эритроциты пуповинной крови человека, которые в настоящее время рассматриваются в клиническом аспекте как гемотрансфузионная среда, обогащенная стволовыми клетками.

6.1. Гипертоническая устойчивость эритроцитов пуповинной крови человека в электролитной среде NaCl

Гипертонический криогемолиз эритроцитов взрослых доноров (далее донорских эритроцитов) исследован достаточно обстоятельно, что позволило сформулировать биофизическую модель этого явления, объясняющую некоторые его закономерности [398, 399]. Установлено, что при охлаждении донорских эритроцитов в физиологической среде до 0°C гемолиз практически отсутствует. А при экспозиции эритроцитов в диапазоне температур 45–25°C в гипертонических растворах NaCl, сахарозы и других непроникающих через клеточную мембрану веществ гемолиз значительно меньше, чем при последующем охлаждении клеток в этих растворах до температуры ниже 13–8°C. Эритроциты становятся особенно чувствительными к охлаждению ниже этих температур, если охлаждению предшествует экспозиция клеток гипертонических растворах, осмолярность которых превышает критическое значение 1200–1400 мОсм/л [400, 401]. В связи с этим было высказано предположение, что предварительная экспозиция эритроцитов в гипертонических растворах повышает их чувствительность к последующему охлаждению. Однако ясного понимания первопричин и возможного механизма этого явления, позволяющего охватить все многообразие эффектов его проявления, пока нет.

Известно, что пуповинная кровь после рождения и отделения ребенка генетически по морфофункциональным характеристиками представляет собой кровь новорожденного первых минут жизни. Состав пуповинной крови полностью отражает состояние гемопоэза плода к концу гестационного периода [215, 402]. По основным количественным характеристикам (гематокрит, средний объем эритроцитов, плотность, вязкость, содержание гемоглобина и др.), а также агрегационным и реологическим свойствам пуповинная кровь значительно отличается от крови взрослых доноров. Так, количество эритроцитов в пуповинной крови в среднем в 1,3 раза выше, чем в цельной крови взрослого человека и составляет $5,0 \times 10^6$ – $7,5 \times 10^6$ в 1 мм³. Это в свою очередь

обуславливает повышенные значения таких показателей пуповинной крови как гематокрит ($66,20 \pm 1,23\%$), плотность (1,06–1,08 г/мл). Содержание общего гемоглобина в эритроцитах пуповинной крови составляет 170–250 г/л, 80% из которого составляет фетальный гемоглобин, который имеет высокое сродство к кислороду. Благодаря высокому значению гематокрита, сравнительно низкому содержанию глобулинов и слабой агрегационной способности в пуповинной крови очень мала скорость оседания эритроцитов (1 мм/час) [215, 403, 404]. Поэтому с точки зрения криоконсервирования пуповинной крови важно оценить, отражаются ли ее особенности, прежде всего, на гипертоническом криогемолизе клеток.

На первом этапе нами была исследована зависимость устойчивости эритроцитов пуповинной крови человека к гипертоническому стрессу в электролитной среде NaCl от времени его действия при температуре 20°C [405].

На рис 6.1 представлена морфозэритрограмма свежевыделенной пуповинной крови человека. В экспериментах использовали уплотненную эритромассу с гематокритом 0,99. Был исследован следующий концентрационный ряд водных растворов хлорида натрия: 0,15 М (286 мОсм/л – контроль), 0,45 М (840 мОсм/л),

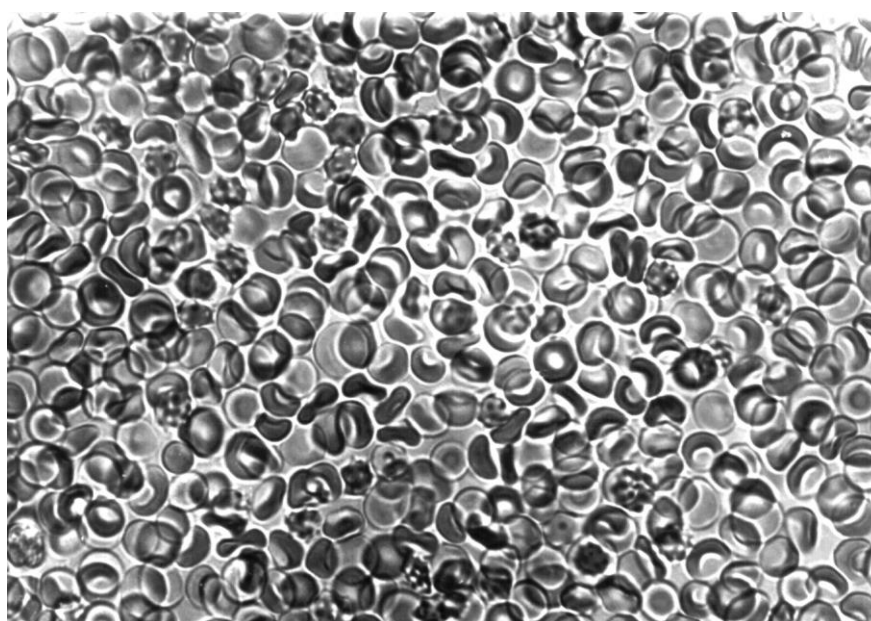


Рис. 6.1. Суспензия свежевыделенной пуповинной крови человека в поле зрения светового микроскопа. Увеличение при съемке $\times 200$.

1,2 М (2300 мОсм/л), 1,4 М (2600 мОсм/л), 2,3 М (4250 мОсм/л), 3,42 М (более 6000 мОсм/л). Данные концентрации соли достигаются при охлаждении суспензии соответственно в пределах до $-0,53^{\circ}\text{C}$, $-1,56^{\circ}\text{C}$, $-4,28^{\circ}\text{C}$, $-4,83^{\circ}\text{C}$, -10°C , -18°C . В эксперименте уплотненную эритро массу смешивали в объемном соотношении 1 мл эритро массы + 9 мл гипертонического раствора NaCl. После 5, 10, 15, 30 и 60 мин экспозиции при 20°C определяли уровень свободного гемоглобина в супернатантах. В контроле эритроциты пуповинной крови экспонировали в течение того же времени в физиологическом растворе NaCl. Критерием степени выраженности гипертонического стресса эритроцитов пуповинной крови человека служил критический уровень свободного гемоглобина $\Gamma_{\text{крит.}}$ в супернатанте криоконсервированной донорской крови человека после отмывки от глицерина, допускаемый при трансфузии, а именно 200 мг%. Эритроцитарная взвесь с таким количеством свободного гемоглобина не вызывает у реципиента негативных реакций и осложнений [213].

Кривые кинетики накопления свободного гемоглобина в супернатантах в зависимости от гипертоничности среды и времени экспозиции клеток в ней были получены аппроксимацией экспериментальных данных методом наименьших квадратов по стандартной программе с автоматическим выбором степени полинома. Анализ кинетических кривых рис. 6.2 (а, б, в, г) показал, что при увеличении гипертоничности среды и времени экспозиции клеток в ней уровень свободного гемоглобина закономерно возрастает. Однако в течение 60 мин воздействия на клетки гипертонических растворов NaCl с концентрацией в пределах до 2,3 М критический уровень свободного гемоглобина не достигается. Так, в контроле после 60 мин экспозиции в супернатанте содержится $13,2 \pm 1,8$ мг% гемоглобина. В 0,45 М растворе NaCl концентрация свободного гемоглобина близка к контролю и достигает $14,5 \pm 2,0$ мг% (рис. 6.2, а). В 1,2 и 1,4 М растворах NaCl, осмоличность которых превосходит изотоническую в 8 и 9 раз, в супернатанте содержится соответственно $53,20 \pm 7,20$ мг% и $78,50 \pm 8,25$ мг% гемоглобина (рис. 6.2, б). И только лишь при 15-кратном превышении

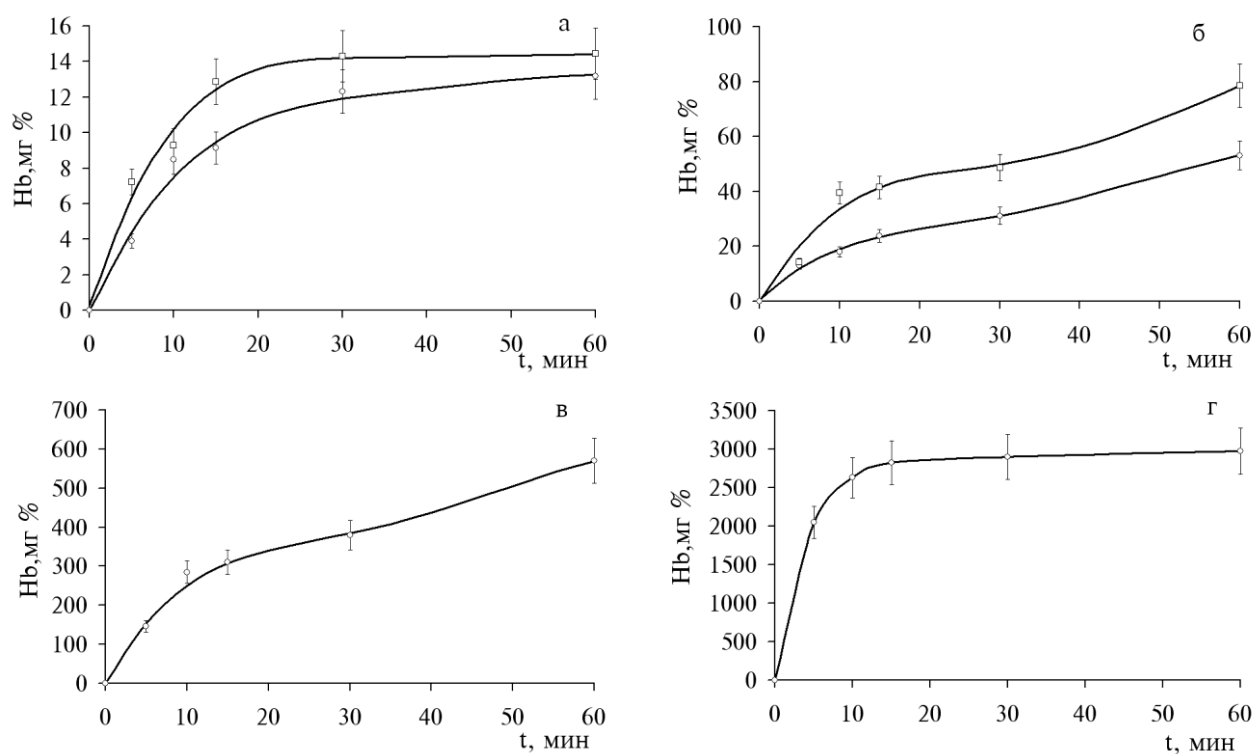


Рис. 6.2. Кинетика накопления свободного гемоглобина в супернатанте в зависимости от времени экспозиции эритроцитов пуповинной крови человека в гипертонических растворах NaCl: а: ○ – контроль 0,15 М; □ – 0,45 М; б: ○ – 1,2 М; □ – 1,4 М; в – 2,3 М; г – 3,42 М.

изоосмотического давления, которое создает 2,3 М раствор NaCl, критический уровень свободного гемоглобина достигается через 7 мин гипертонического воздействия. По истечении 60 мин изотермической экспозиции гемолиз достигает 570 ± 15 мг% или 17,8% (рис. 6.2, в). В 3,42 М растворе NaCl количество свободного гемоглобина в супернатанте в 10 раз превышает критический уже после 5 мин действия на клетки реагента и к 15 мин реакции отмечается 90% гемолиз (рис. 6.2, г).

Дифференцированием экспериментальных кривых рис. 6.2 были получены данные о скорости накопления свободного гемоглобина – важной характеристике динамики развития гипертонического гемолиза эритроцитов пуповинной крови. Данные, приведенные в табл. 6.1, свидетельствуют о том, что скорость накопления свободного гемоглобина уменьшается при увеличении времени

Таблица 6.1

Скорость накопления свободного гемоглобина (мг%/мин) в супернатанте в зависимости от времени экспозиции (t, мин) эритроцитов пуповинной крови человека в гипертонических растворах NaCl.

Концентрация NaCl, Моль	Время экспозиции t, мин				
	5	10	15	20	25
0,15	0,71	0,47	0,30	0,18	0,10
0,45	0,92	0,55	0,30	0,13	0,04
1,2	1,72	1,06	0,66	0,48	0,45
1,4	3,28	1,92	1,04	0,55	0,37
2,3	23,33	14,03	8,15	5,03	4,01

экспозиции и возрастает при увеличении гипертоничности среды. В течение первых 5 мин гипертонического воздействия скорость накопления свободного гемоглобина максимальна. Наличие быстрой и медленной фазы гипертонического гемолиза независимо от того, осуществляется ли гемолиз быстро (высокая гипертония) или медленно (умеренная гипертония), свидетельствует о том, что суспензия эритроцитов пуповинной крови представляет собой гетерогенную систему, в которой устойчивость клеток к гипертоническому воздействию различна.

Известно, что донорские эритроциты человека проявляют высокую устойчивость при их изотермической экспозиции в гипертонических растворах NaCl. Автор работы [406], подсчитывая число эритроцитов в камере Горяева после гипертонического воздействия при 19–21°C, показал, что донорские эритроциты практически не разрушаются в течение 60 мин в растворах, содержащих NaCl до 7,5% (1,28 М). Выше этой концентрации соли процент разрушенных клеток постепенно увеличивается и при экспозиции в 15% растворе NaCl (2,56 М) в течение 60 мин достигает 22,0%. По данным работы [407] при экспозиции эритроцитов в 1,0 М, 1,2 М и 1,5 М растворах NaCl при 25°C в течение 90 мин сохранность клеток остается высокой и составляет около 96%.

При осмотичности внеклеточного раствора NaCl 4000 мОсм/л ($\sim 2,16$ М) гемолиз эритроцитов после 5 мин экспозиции при 37°C составляет 25% [408]. В 4,0 М растворе NaCl гемолиз развивается в течение 2 мин и достигает 90% [361].

Сравнительная оценка уровня гемолиза донорских эритроцитов и эритроцитов пуповинной крови человека показывает, что при изотермической экспозиции в течение 60 мин в 2,3 М растворах NaCl (4250 мОсм/л) эритроциты пуповинной крови проявляют более высокую устойчивость к гипертонии: 26,5% [408], 21,5% [406] – гемолиз донорских эритроцитов и 17,8% – гемолиз эритроцитов пуповинной крови, как установлено нами.

Литературные данные свидетельствуют о том, что эритроциты пуповинной крови и эритроциты взрослых доноров проявляют различную устойчивость как к гипотоническим растворам NaCl (осмотическая резистентность), так и к кислотным гемолитикам (кислотная резистентность). В норме верхняя граница осмотической резистентности донорских эритроцитов составляет 0,48 – 0,44, нижняя – 0,36 – 0,28, а эритроцитов пуповинной крови соответственно составляет 0,52 – 0,48 и 0,30 – 0,24, т.е. амплитуда осмотической резистентности (интервал между верхней и нижней границей резистентности) эритроцитов пуповинной крови (18 – 28) шире, чем донорских (8 – 20) [215]. Временной диапазон кислотных эритрограмм пуповинной крови также шире, чем донорской [409]. Популяция эритроцитов пуповинной крови неоднородна по кислотной резистентности: имеется достаточно большое количество среднестойких клеток ($48,4 \pm 0,52\%$), клеток с повышенной стойкостью ($41,6 \pm 0,41\%$) и высокостойких ($2,5 \pm 0,12\%$). Аналогичное распределение для донорских эритроцитов следующее: среднестойких – $58,3 \pm 1,04\%$, с повышенной стойкостью – $22,2 \pm 0,47\%$, высокостойких – $0,4 \pm 0,01\%$ [403]. Следовательно, в пуповинной крови высокостойких эритроцитов содержится в 6 раз больше, чем в донорской крови.

Анализ морфоэритрограмм пуповинной крови свидетельствует о ее полиморфизме и выраженном анизоцитозе. Для пуповинной крови характерно наличие нормоцитов, макроцитов, микроцитов, ретикулоцитов, встречаются ядросодержащие формы, нормобласты, макробласты [215, 404]. Распределение

эритроцитов пуповинной крови по индексу сферичности носит полимодальный характер и представляет собой сумму распределений нескольких субпопуляций. Имеется максимум для клеток с индексом сферичности $1,37 \pm 0,075$, который наиболее близок к максимуму на кривых взрослых доноров ($1,38 - 1,58$ – нормоциты). Количество уплощенных клеток с индексом сферичности в диапазоне $1,6 - 2,3$ составляет порядка 14%, что существенно выше, чем для взрослых доноров (около 8%) [410]. К таким уплощенным формам, прежде всего, относятся юные эритроциты – ретикулоциты или “макроплатоциты”, для которых отношение диаметра к толщине составляет 4,1, в то время как для нормоцитов этот показатель равен 3,6 [265]. Высокая осмотическая устойчивость эритроцитов отмечается именно при увеличении отношения площади поверхности их мембран к объему [214]. Чем больше эритроцит, т.е., чем более выражена его макроплазия, тем больше запас для его набухания в гипотонической среде и тем позднее произойдет его гемолиз.

При разделении популяции донорских эритроцитов по плотности в градиенте фикола с последующей инкубацией каждого слоя с сублитическими дозами лизофосфатидов было показано, что именно молодые клетки являются самыми стойкими [411]. Структурно-функциональное состояние мембран молодых эритроцитов характеризуется достаточно высокой устойчивостью [214]. Мембрана эритроцитов пуповинной крови содержит повышенное количество общих липидов, фосфолипидов и холестерина. Фосфолипиды представлены сфингомиелином, меньше – лецитином. В составе жирных кислот фосфолипидов больше, чем в норме, пальмитиновой, стеариновой, арахидоновой кислот по сравнению с содержанием олеиновой и линоленовой [402]. Уровень малонового диальдегида, который отражает активность перекисного окисления липидов, в мембранах эритроцитов новорожденного в первые часы жизни составляет $2,53 \pm 0,21$ нМ/ 10^6 эр, общих липидов – $173,0 \pm 31,6$ мкг/ 10^6 эр, общего фосфора – $7,69 \pm 0,41$ мкг/ 10^6 эр, перекиси водорода – $11,59 \pm 1,81$ мМ/ 10^6 эр. Коэффициент устойчивости мембран (отношение МДА к степени гемолиза) составляет $0,86 \pm 0,16$ [412].

В пуповинной крови в норме молодых клеток ретикулоцитов содержится от 3 до 7% [402], а в крови взрослого человека только 0,8% [413], что, безусловно, влияет на кинетику развития гипертонического гемолиза, обуславливая повышенную устойчивость эритроцитов пуповинной крови.

Согласно теории минимального объема [12, 414] повреждение эритроцитов при гипертоническом шоке наступает в результате чрезмерного сжатия клеток при обезвоживании и достижении ими некоторого критического объема. Для донорских эритроцитов критический объем составляет 55% от исходного объема, при этом теряется около 65% внутриклеточной воды. Вполне естественно, что в связи с выраженным анизоцитозом эритроцитов пуповинной крови (объем клеток колеблется от 80 мкм³ до 120 мкм³ [214, 402]), критический минимальный объем в популяции клеток достигается не одновременно и, следовательно, гипертонический гемолиз развивается во времени. По мере повышения уровня внеклеточной гипертонии в процесс гемолиза последовательно вовлекаются субпопуляции, имеющие исходно различную устойчивость клеток, в связи, с чем определенным образом изменяется скорость накопления свободного гемоглобина.

6.2. Гипертонический криогемолиз эритроцитов пуповинной крови человека в электролитной среде NaCl

На втором этапе было исследовано влияние времени предварительной экспозиции эритроцитов пуповинной крови человека в гипертонических растворах NaCl при комнатной температуре на их чувствительность к последующему охлаждению [415, 416].

Для исследования был выбран концентрационный ряд водных растворов NaCl, в котором эритроциты пуповинной крови были устойчивы к гипертоническому воздействию на первом этапе: 0,45 М (840 мОсм/л), 0,85 М (1550 мОсм/л), 1,2 М (2300 мОсм/л) и 1,4 М (2600 мОсм/л). В эксперименте 1 мл уплотненной эритроцитной массы смешивали с 9 мл гипертонических растворов NaCl

исследуемых концентраций. После 5, 10, 15 мин изотермической экспозиции клеток при температуре 24°C образцы помещали в камеру программного замораживателя УОП-6 и охлаждали до температуры –1,5°C со скоростью 3°C/мин. Выбор данной температуры был обусловлен тем, что согласно фазовой диаграмме плавления двойной системы NaCl – H₂O при содержании в растворе 0,45 М NaCl и, следовательно, при более высоких концентрациях электролита, фазовый переход “вода-лед” в ней не происходит [6]. При достижении конечной температуры охлаждения –1,5°C образцы сразу же отогревали со скоростью 3°C/мин. Поскольку в процессе цикла “охлаждение-отогрев” увеличивается эффективное время пребывания эритроцитов в гипертонической среде в контроле клетки экспонировали в исследуемых растворах при комнатной температуре с учетом времени, соответствующего длительности цикла (в среднем это время составляло 17 мин). После отогрева определяли уровень свободного гемоглобина в супернатантах экспериментальных и контрольных образцов.

На рис. 6.3 представлены гистограммы, иллюстрирующие развитие криогемолиза эритроцитов пуповинной крови в зависимости от времени предварительной экспозиции клеток в гипертонических растворах NaCl. Как следует из рис. 6.3, *a*, независимо от времени предэкспозиции эритроцитов пуповинной крови в 0,45 М растворе NaCl они остаются не чувствительными к последующему охлаждению. Чувствительность эритроцитов к охлаждению начинает проявляться уже при 5 мин экспозиции клеток в 0,85 М растворе NaCl (рис. 6.3, *b*). Далее криогемолиз фетальных эритроцитов человека закономерно возрастает как при увеличении гипертоничности среды, так и времени предварительной экспозиции клеток в ней (рис. 6.3, *c*, *d*).

Для сравнительного анализа устойчивости эритроцитов пуповинной крови к гипертоническому воздействию и криогемолизу нами был введен коэффициент чувствительности K :

$$K = \frac{\Gamma_{\text{гиперт. (охл.)}} - \Gamma_K}{\Gamma_{\text{крит}}},$$

где $\Gamma_{\text{гиперт. (охл.)}}$ – уровень свободного гемоглобина в супернатанте после цикла

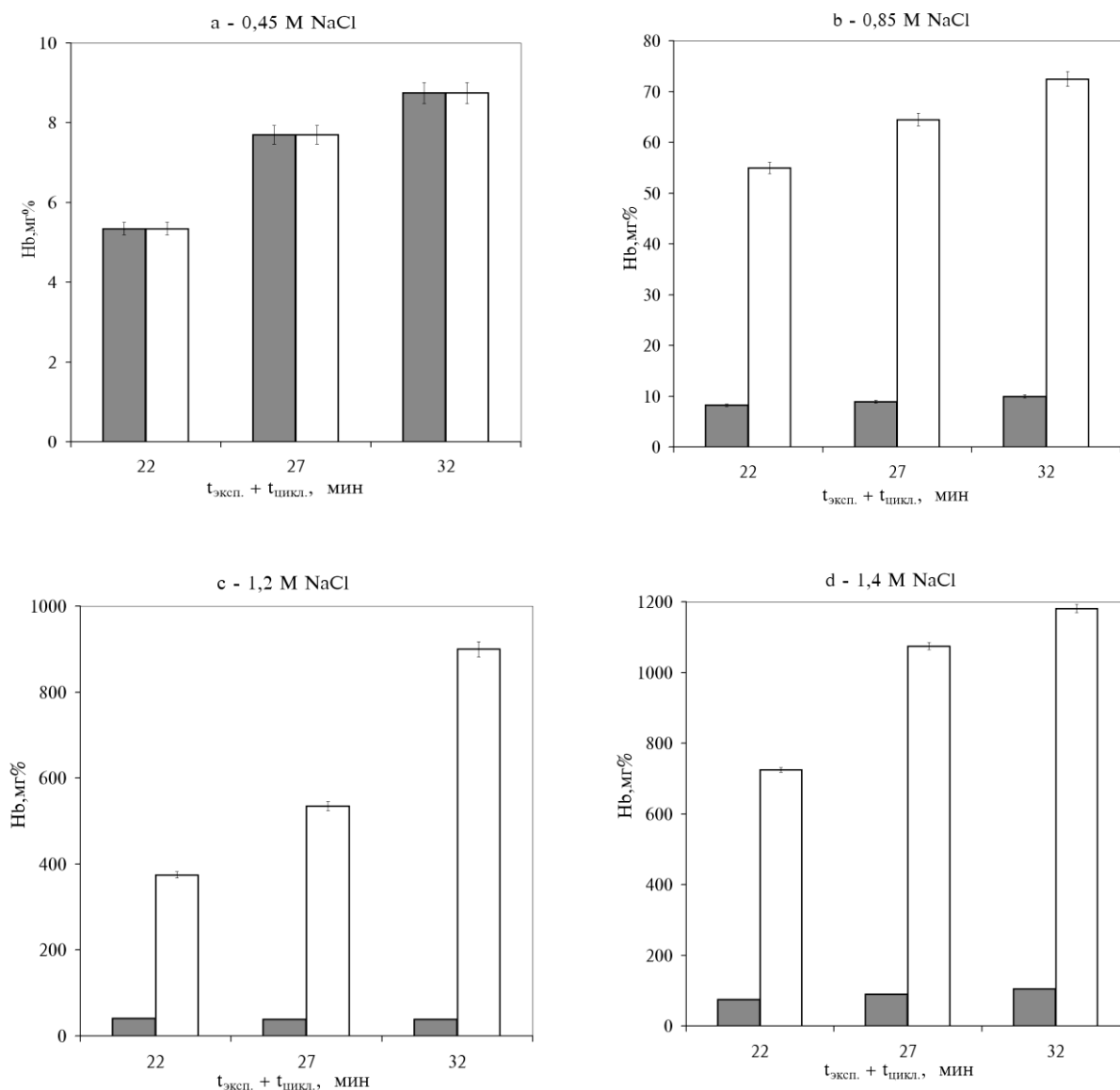


Рис. 6.3. Криогемолиз эритроцитов пуповинной крови человека в зависимости от времени предэкспозиции в гипертонической среде NaCl при 24°C: а – 0,45 М; б – 0,85 М; в – 1,2 М; г – 1,4 М. ■ – контроль, □ – опыт.

“охлаждение–отогрев” или гипертонического воздействия; Γ_k – уровень свободного гемоглобина в супернатантах соответствующих контрольных образцов; $\Gamma_{\text{крит.}}$ – критический уровень свободного гемоглобина (200 мг %). Таким образом $K=1$ характеризовал потерю устойчивости эритроцитов к факторам воздействия.

На рис. 6.4 приведены зависимости коэффициентов чувствительности K эритроцитов пуповинной крови к гипертоническому воздействию (а) и к

охлаждению (б). Из рис. 6.4, а следует, что коэффициенты чувствительности эритроцитов пуповинной крови к гипертоническому воздействию 1,2 М раствора NaCl ниже 0,5 при всех временах экспозиции. Гипертонический же криогемолиз

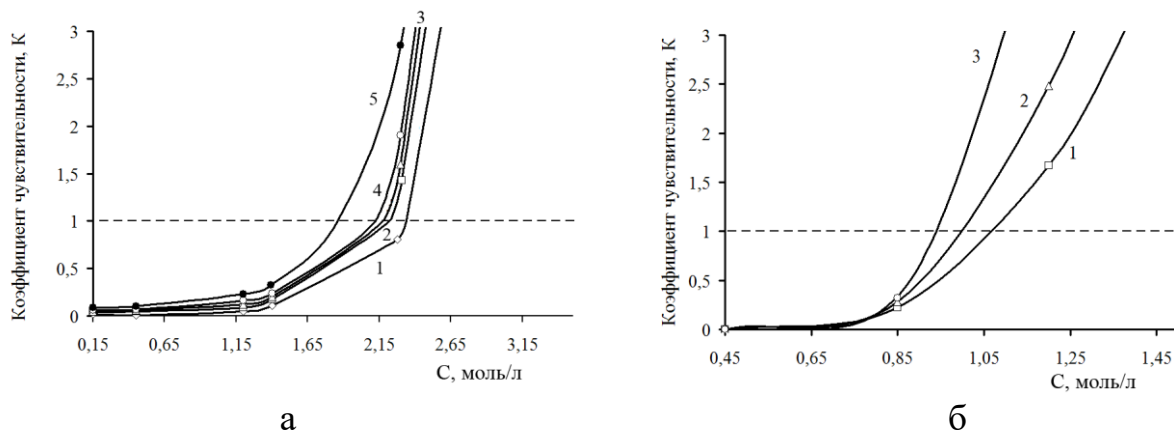


Рис. 6.4. Зависимости коэффициентов чувствительности (K) эритроцитов пуповинной крови человека к гипертоническому воздействию NaCl (а) и к криогемолизу (б). Время экспозиции (а): 1 – 5 мин; 2 – 10 мин; 3 – 15 мин; 4 – 30 мин; 5 – 60 мин; время предварительной экспозиции (б): 1 – 5 мин; 2 – 10 мин; 3 – 15 мин.

превышает критический ($K > 1$) уже после 5 мин предварительной экспозиции клеток в 1,2 М растворе NaCl. Его уровень ($K = 1,67$, рис. 6.4, б, кривая 1) сравним с уровнем гипертонического гемолиза эритроцитов пуповинной крови при экспозиции в 2,3 М растворе NaCl в течение 15 мин ($K = 1,60$, рис. 6.4, а, кривая 3). Следовательно, эритроциты пуповинной крови человека, как и эритроциты взрослых доноров, приобретают чувствительность к последующему охлаждению на этапе предварительной экспозиции клеток в гипертонических растворах.

Как следует из рис. 6.4, при увеличении времени экспозиции, соответственно времени предэкспозиции, клеток в гипертонических растворах NaCl, критические концентрации $C_{\text{крит.}}(K = 1)$, при которых эритроциты пуповинной крови теряют гипертоническую и криоустойчивость, смещаются в область более низких концентраций. Так, критические концентрации потери

гипертонической устойчивости соответственно увеличению времени экспозиции составляют 2,35, 2,22, 2,20, 2,13 и 1,86 М NaCl. А критические концентрации потери криоустойчивости соответственно увеличению времени предэкспозиции составляют 1,07, 1,00 и 0,93 М. Сравнение этих концентраций при одних и тех же временах экспозиции (предэкспозиции) свидетельствует о том, что охлаждение приводит к снижению критических концентраций потери гипертонической устойчивости более чем в два раза. Таким образом, в зоне формирования внеклеточных кристаллов льда одновременное воздействие возрастающей гипертонии и понижающейся температуры могут вызывать криогемолиз эритроцитов при достижении концентраций NaCl гораздо более низких, чем при гипертоническом воздействии в области положительных температур.

Morris G. J. [417], изучая особенности гипертонического криогемолиза эритроцитов взрослых доноров, показал, что экспозиция клеток в течение 5 мин при 20°C в гипертонических растворах NaCl с осмолярностью до 1350 мОсм/л (0,74 М) индуцирует гемолиз менее 2%. Предэкспозиция донорских эритроцитов в растворах NaCl, осмолярность которых превышает 1200–1400 мОсм/л (0,65–0,80 М NaCl), вызывает выраженную чувствительность клеток к последующему охлаждению [407]. При этом гемолиз эритроцитов в результате охлаждения начинается только после падения температуры суспензии ниже 12°C [408], т.е. в области структурно-фазовых превращений в мембране клеток (8–13°C) [418]. Кроме того, более высокая скорость охлаждения суспензии приводит к большему гемолизу [407, 408] и смещению порога чувствительности донорских эритроцитов к охлаждению до 950 мОсм/л (0,50 М NaCl) среды предэкспозиции. Предварительная экспозиция донорских эритроцитов в растворах NaCl с осмолярностью ниже 750 мОсм/л (0,36 М NaCl) не сенситизирует клетки к последующему охлаждению как до 0°C, так и до –10°C [417].

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что для эритроцитов пуповинной крови человека нижний порог чувствительности к последующему охлаждению находится выше 840 мОсм/л (0,45 М NaCl), то есть превосходит нижний порог чувствительности эритроцитов взрослых доноров 750 мОсм/л (0,36

М NaCl). Вполне вероятно, что повышенная гипертоническая криоустойчивость эритроцитов пуповинной крови по сравнению с донорскими эритроцитами может быть также обусловлена более высоким содержанием в ней молодых эритроцитарных форм.

6.3. Трансформация эритроцитов человека в гипертонических растворах электролита NaCl

Уровень гемолиза эритроцитов человека, определяемый в супернатантах после гипертонического воздействия хлорида натрия, представляет собой интегральный показатель устойчивости клеток. Как реагируют индивидуальные эритроциты на изменение гипертоничности среды, и как в кинетике развивается процесс гипертонического гемолиза, мы исследовали методом световой микроскопии в “живой капле” [419, 420].

Исследован следующий концентрационный ряд растворов NaCl: 0,34 М, 0,85 М, 1,28 М, 1,4 М, 2,3 М и 3,42 М. Время микроскопического контроля трансформации эритроцитов взрослых доноров в гипертонических растворах NaCl составляло 3 мин.

Эритроциты свежевыделенной донорской крови человека представляют собой двояковогнутые диски (рис. 6.5, 1, рис. 6.6, 1.). О функциональной полноценности клеток свидетельствует их способность к агрегации и формированию монетных столбиков. В течение 4-10 с (быстрая фаза агрегации) образуются довольно длинные линейные столбики. Во второй фазе агрегации происходит укрупнение агрегатов и формирование разветвленных эритроцитарных цепей (рис. 6.6, 1.)

При введении в суспензию клеток 0,34 М (712 мОсм/л) раствора NaCl на тороидальном ободке эритроцитов появляются спиккулы (рис. 6.5, 2), свидетельствующие о развитии дискоэхиноцитоза (акантоцитоз).

Реакция эритроцитов на введение в суспензию 0,85 М и 1,28 М растворов

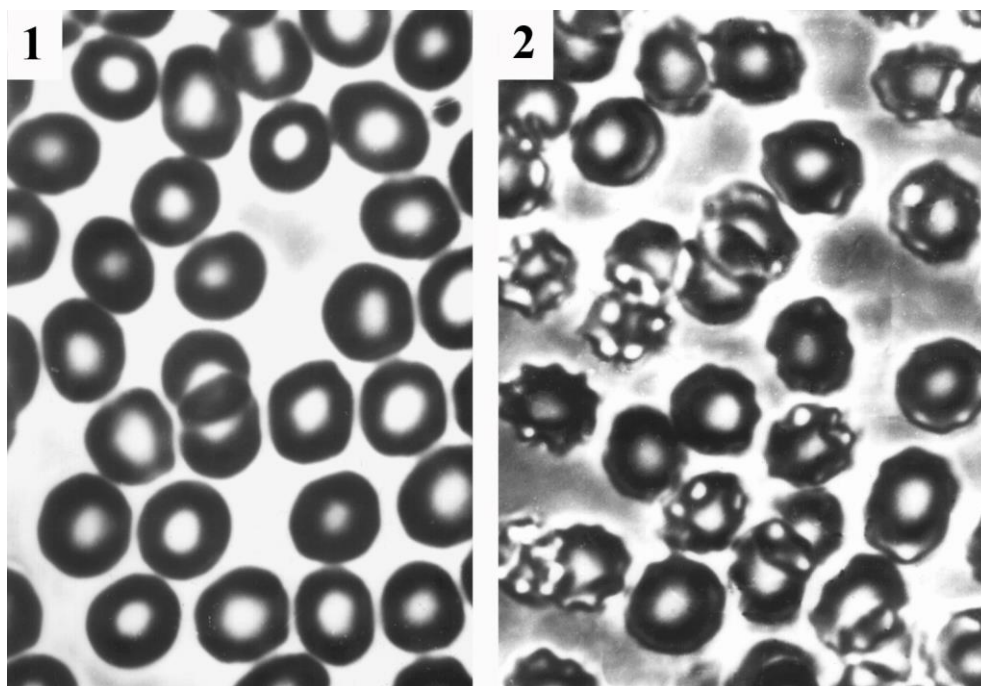


Рис. 6.5. Трансформация эритроцитов донорской крови человека в 0,34 М растворе NaCl: 1 – норма; 2 – через 16 с (фазовоконтрастная микроскопия). Увеличение при печати $\times 1458$.

NaCl (соответственно 1550 мОсм/л и 2512 мОсм/л) сопровождается дегидратацией клеток, в результате которой они деформируются и мембрана теряет регулярность (рис. 6.6, 2). В течение времени экспозиции деформация клеток сохраняется. В поле зрения наблюдаются единичные эритроциты в предгемолитической форме – сфероциты, а также тени (рис. 6.6, 3).

Взаимодействие эритроцитов с 1,4 М и 2,3 М (соответственно 2600 мОсм/л и 4250 мОсм/л) растворами NaCl характеризуется стабилизацией обезвоженного состояния деформированных клеток и последующим незначительным отсроченным гипертоническим гемолизом.

При введении в суспензию клеток 3,42 М раствора NaCl (более 6000 мОсм/л) уже через 8 с реакции (рис. 6.7) часть деформированных при обезвоживании эритроцитов скачкообразно трансформируются в неполные сферы или стоматоциты II – III степени. Далее наблюдается развивающаяся во времени сферуляция клеток с последующим обесцвечивание сфероцитов,

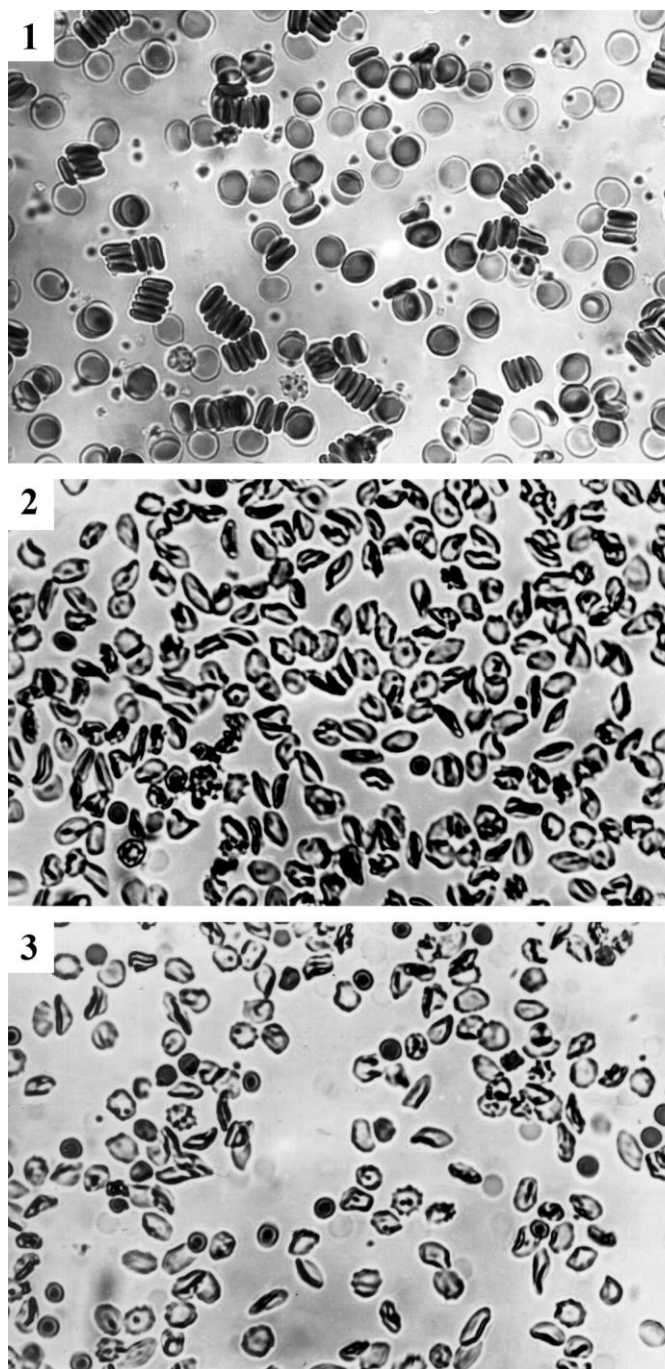


Рис. 6.6. Трансформация эритроцитов донорской крови человека в 1,28 М растворе NaCl: 1 – норма; 2 – 2 мин реакции; 3 – через 55 мин (светлое поле). Увеличение при съемке $\times 160$.

обусловленным выходом гемоглобина, и образование теней. Процесс гипертонического гемолиза начинается не одновременно у всех клеток, а развивается во времени. Наиболее устойчивые эритроциты могут находиться в деформированном состоянии до 1,5 мин (рис 6.7, 7, 92 с). Максимальное время

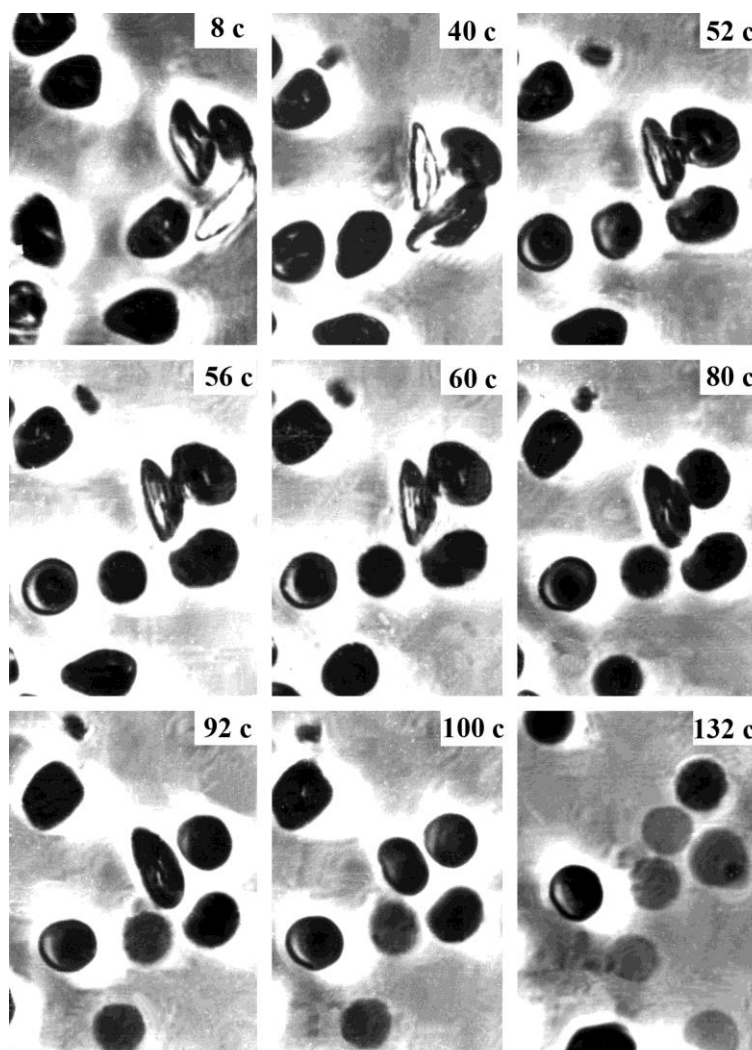


Рис. 6.7. Кинетика развития гипертонического гемолиза эритроцитов донорской крови человека в 3,42 М растворе NaCl (фазовоконтрастная микроскопия). Увеличение при печати $\times 1458$.

трансформации из деформированного состояния в неполную сферу составляет не более 4 с. Количественный подсчет теней в поле зрения показал, что при данной гипертоничности среды 50% гемолиз отмечается уже через 3 мин реакции.

Таким образом, морфологический ответ эритроцитов человека на гипертоническое воздействие электролита NaCl зависит от концентрации соли в среде и времени контакта с ней. При инкубации клеток в среде, содержащей NaCl до 1,28 М (2512 мОсм/л) эритроциты практически не разрушаются. Однако наблюдаемая в этом случае трансформация эритроцитов с существенным

изменением рельефа клеточной поверхности может инициировать различные структурные нарушения мембран клеток. Как показано в работах [5, 421], деформация клеточной мембраны при обезвоживании может быть причиной латерального перераспределения мембранных компонентов, обусловленного стремлением системы к минимизации свободной энергии. Изменение рельефа клеточной поверхности приводит к тому, что в области участков с положительной кривизной происходит растяжение внешнего монослоя и сжатие внутреннего, а в области участков с отрицательной кривизной наоборот – сжатие внешнего и растяжение внутреннего монослоев. В наиболее сжатые или растянутые участки мембраны, т.е. участки с наибольшей по абсолютной величине кривизной, энергетически выгодно переместиться компонентам с наименьшим модулем растяжения–сжатия и тем самым снизить свободную энергию деформации мембраны. При этом поверхность мембраны в ходе латерального перераспределения хотя и становится более гладкой и менее напряженной, однако, остается все еще деформированной. Латеральное перераспределение является процессом активационного типа и потому реализуется во времени, которое тем меньше, чем выше температура и при комнатной температуре завершается в течение 6 мин [422]. Как было уже сказано, важную роль в поддержании формы эритроцитов играет трехмерная сеть цитоскелетных белков, находящихся на цитоплазматической поверхности их мембран [355]. Она рассматривается в качестве центрального механизма, обеспечивающего устойчивость клеток при действии самых различных внешних факторов, в том числе гипертонии, охлаждения и замораживания [423]. Многочисленные данные свидетельствуют о взаимосвязи формы эритроцитов и взаимодействием цитоскелета с мембраной посредством контактов цитоскелета с белком полосы 3 через анкирин (белок 2.1) и белок 4.1 [424, 425]. Более слабые взаимодействия между спектрином и фосфолипидами мембраны стабилизируют липидный бислой и поддерживают его асимметрию [355]. При обезвоживании структурное состояние цитоскелетного комплекса может изменяться как за счет возрастания плотности распределения его структурных элементов, так и за счет

нарушения связей “мембрана – цитоскелет”, обусловленного латеральным перераспределением компонентов мембраны. Поскольку цитоскелетная сеть эритроцитов стабилизируется нековалентными связями, ее топология существенно определяется условиями окружающей среды такими, как осмотическое давление, ионная сила, pH и температура [426]. Морфологически это проявляется в кренировании эритроцитов, что подтверждается полученными нами данными, а в структурном аспекте, вероятно, в смене характера ассоциации спектриновой сети с мембраной.

Биофизическая модель, предложенная авторами работы [398] для объяснения закономерностей гипертонического криогемолиза, базируется на основном положении теории упругости, согласно которому свободная энергия деформации упругой замкнутой оболочки, каковой авторами рассматривается клеточная мембрана, при действии на нее внешних сил стремится к минимуму. Поскольку свободная энергия изгиба тонкой оболочки меньше свободной энергии растяжения – сжатия [427], в процессе обезвоживания эритроциты не сжимаются, сохраняя исходную форму, а изгибаются таким образом, чтобы при заданном объеме клетки площадь поверхности клеточной мембраны оставалась неизменной. Это возможно в том случае, если не существует внешних препятствий. Таким геометрическим ограничением при обезвоживании эритроцитов, как считают авторы [398], могут быть молекулы гемоглобина, упаковывающиеся в сгусток неправильной формы. Методом ЭПР [428] было показано, что при концентрациях NaCl превышающих 0,8 М, происходит расслоение цитозоля эритроцитов на две фазы, одна из которых содержит в основном растворитель, а другая – белок. При увеличении степени обезвоживания эритроцитов и обусловленного этим концентрирования внутриклеточного гемоглобина цитозоль приобретает свойство сопротивляться изменению формы вследствие уменьшения его текучести. Минимальный объем, до которого обезвоживаются эритроциты в гипертонических растворах, как уже упоминалось, составляет около 50–60% от объема в изотоническом растворе, а осмотически неактивный объем – 0,3–0,4 [429]. Авторы работы [398] считают,

что внутри обезвоженной на 40–50% клетки вышеупомянутый сгусток состоит на 30–40% из плотно упакованных молекул гемоглобина и осмотически неактивного растворителя, связанного с ним, и на 20% – из осмотически активного раствора, расположенного во внутренних впадинах плотноупакованного гемоглобинового сгустка, так называемых “гемоглобиновых карманах”. Если площадь поверхности сгустка превышает исходное значение площади поверхности клеточной мембраны, то в процессе обезвоживания клеток под действием осмотических сил мембрана начинает частично втягиваться в упомянутые выше впадины – карманы, что сопровождается ее натяжением. При осмотическом давлении гипертонического раствора, превосходящем изотоническое давление даже в 5 раз (около 1500 мОсм/л), этого натяжения, как показывают расчеты [398], оказывается недостаточно для образования разрыва в мембране и развития гемолиза. Однако вследствие разброса клеточных параметров в гетерогенном пуле эритроцитов уже на стадии предварительной экспозиции в гипертонических растворах хлорида натрия при комнатных температурах гемолизу подвергается часть клеток. В первую очередь разрушаются клетки с наименьшими значениями линейного натяжения поры и наибольшими значениями коэффициента поверхностного растяжения мембраны [430]. Значения этих двух клеточных параметров, в первую очередь, зависят от липидного и белкового состава мембран и состояния прилегающих к ним слоев гликокаликса.

6.4. Состояние внешних примембранных слоев эритроцитов человека – гликокаликса – при действии электролита NaCl умеренной гипертонии

Гликокаликс является важной структурной составляющей клетки, обладающим в какой-то мере особыми функциями, не зависящими от функций клетки в целом. Он представляет собой микроскопический слой толщиной не более 3–4 нм, прилегающий к наружной поверхности плазматических мембран клеток человека и животных, содержащий не только белки, полипептидные цепи

которых ориентированы параллельно поверхности клетки, но и многие углеводные компоненты, синтезируемые той же клеткой [431]. Гликокаликс специализированных клеток состоит из гликопротеинов, участвующих в иммунологических реакциях, в связи, с чем они играют важную роль в патологических процессах. В частности, с поверхностью эритроцитов связываются антигены, которые таким образом разносятся по организму. Внешние примембранные слои (ВПМС) способны связывать и удерживать сократительные белки типа актомиозина и таким образом участвовать в процессах адгезии. В гликокаликсе могут накапливаться поверхностно-активные вещества и играть в нем важную роль, не проникая в заметном количестве в клетку. Существенной особенностью гликокаликса является то, что основная его составляющая – гликопротеиновый слой – обуславливает возникновение высокого отрицательного заряда всей клетки [432]. Полагают [431], что своим происхождением он обязан диссоциированным карбоксильным группам, в основном сиаловых кислот (N-ацетилнейраминовая кислота), конформация которых зависит от ионной силы дисперсионной среды. Все сиаловые кислоты эритроцита располагаются на поверхности мембраны, и примерно 95% их может быть удалено нейраминидазой. Исходя из того, что количество белков в эритроцитах составляет приблизительно 10^{-12} г/клетку, а площадь поверхности каждого эритроцита порядка 150 мкм^2 , содержание белков, составляющих мембрану, оценивается около 7 мг/м^2 [433]. Такое количество белка позволяет предположить, что в гликокаликсе эритроцитов имеется несколько его монослоев толщиной порядка $15\text{--}20 \text{ \AA}$. Толщина же самой мембраны эритроцита около $50 \text{ \AA}$. Поскольку гликокаликс структурно связан с липидным бислоем, то естественно, что различные нарушения в нем могут привести к существенным изменениям свойств самой плазматической мембраны.

Нами методом прижизненной окраски суспензии эритроцитов донорской крови альциановым синим (АС) было оценено состояние гликокаликса клеток после гипертонического воздействия $0,34 \text{ М}$, $0,85 \text{ М}$, $1,28 \text{ М}$ растворов NaCl , в которых, как показали микроскопические исследования, гемолиз практически

отсутствует, а обезвоживание сопровождается деформацией клеточной мембраны [434]. Концентрацию клеток в экспериментах поддерживали порядка 10^8 кл/мл, смешивая уплотненную эритромассу (гематокрит 0,99) в соотношении 1:1 с реагентом (2,5 мл эритромассы + 2,5 мл реагента). Время экспозиции клеток в гипертонических растворах соли составляло 15 мин. После этого суспензию окрашивали АС и фотометрировали супернатанты. В контроле состояние гликокаликса оценивали в 0,15 М NaCl.

Микроскопический анализ морфозэритрограмм (рис. 6.8) показал, что АС в используемой концентрации не повреждает клетки и не проникает в цитоплазму. После 10 мин окрашивания наблюдается трансформация клеток в эхиноциты

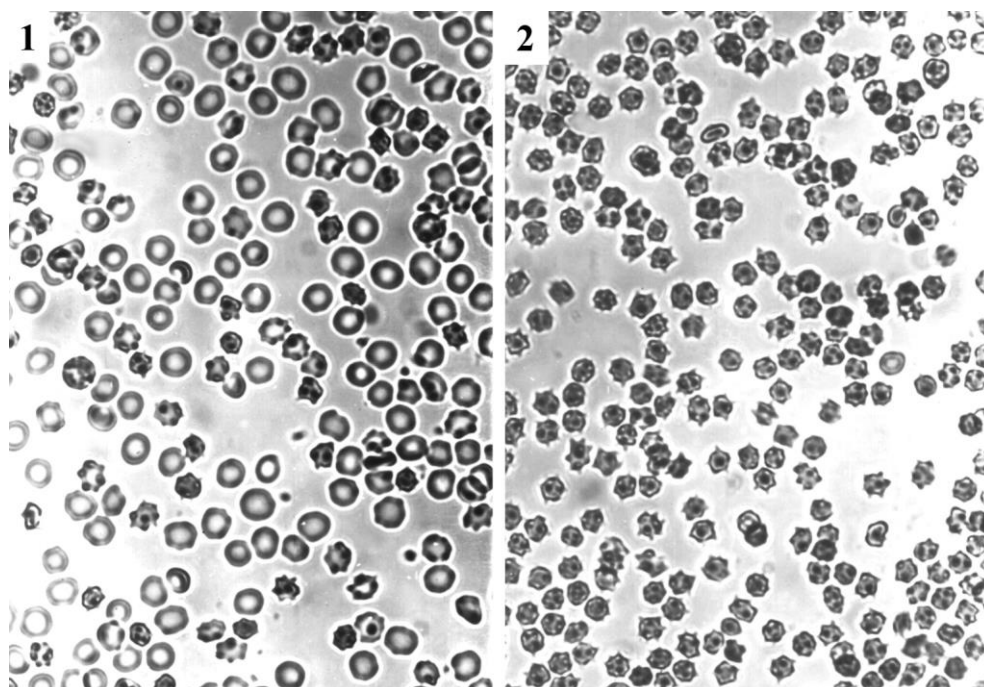


Рис. 6.8. Прижизненное окрашивание эритроцитов человека 0,01% АС:

1 – начало взаимодействия; 2 – через 10 мин. Увеличение при съемке $\times 200$.

(рис. 6.8, 2). Выраженный эхиноцитоз эритроцитов подтверждает локализацию красителя на внешней поверхности клеток [358, 363–366].

Спектрофотометрические исследования показали, что в изотонических условиях сорбция АС клетками максимальна: в супернатанте регистрируется минимальная концентрация АС (рис. 6.9). При увеличении гипертоничности

среды концентрация АС в супернатанте возрастает и особенно резко выше 0,85 М NaCl. Суспензия эритроцитов представляет собой гетерогенную популяцию, в

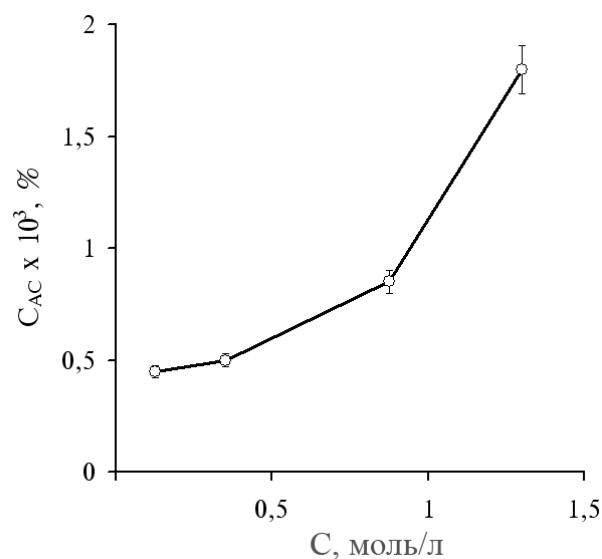


Рис. 6.9. Зависимость концентрации АС в супернатантах от концентрации NaCl в суспензии эритроцитов человека.

которой имеются клетки различного возраста, и, следовательно, обладающих различной гипертонической устойчивостью. В связи с этим следовало бы ожидать, что по мере нарастания внеклеточной гипертоничности может увеличиваться количество разрушенных клеток. Однако, как показал параллельный контроль уровня гемолиза в супернатантах, в области действия умеренной гипертонии он составляет менее 1,0%. Проведенный в работе [435] анализ утечки ионов калия из эритроцитов человека, предшествующей выходу гемоглобина, свидетельствуют о том, что в 0,4 М растворе NaCl потеря внутриклеточного калия практически отсутствует в течение 30 мин. А при экспозиции в 0,8 М растворе NaCl хотя потеря внутриклеточного калия и становится заметной, но она остается постоянной в течение 30 мин. В 1,2 М растворе NaCl более высокий уровень выхода внутриклеточного калия свидетельствует об увеличении части клеток с малым индексом сферичности, т.е. эритроцитов находящихся в предгемолитическом состоянии. Таким образом, приведенные данные подтверждают отсутствие в суспензии значительного

количества разрушенных клеток, с фрагментами которых мог бы связываться краситель, и позволяют считать, что изменение концентрации АС в супернатантах обусловлено именно снижением его сорбции клеточной поверхностью. В табл. 6.2 приведены расчетные данные сорбции АС одним эритроцитом в зависимости от величины гипертонического воздействия.

Таблица 6.2

Сорбция АС эритроцитом (г) в зависимости от гипертоничности NaCl.

Концентрация NaCl (моль)	0,15(n=3)	0,34(n=5)	0,85(n=5)	1,28 (n=5)
Сорбция АС ($\times 10^{-12}$, г)	9,1 $\pm$ 0,02	9,0 $\pm$ 0,05	8,5 $\pm$ 0,02	6,4 $\pm$ 0,03

Примечание: различия между значениями статистически достоверны ($P > 0,99$).

Данные табл. 6.2 свидетельствуют, что сорбция АС эритроцитов после воздействия 0,34 М раствора NaCl хотя достоверно и снизилась, но незначительно. Выраженное снижение сорбции АС по сравнению с контролем отмечается при гипертонии 0,85 М NaCl и выше. Так как среди веществ белковой природы АС связывается только с гликопротеинами [271–273], снижение сорбции АС поверхностью эритроцитов может явиться следствием частичного разрушения их гликокаликса и элиминацией во внеклеточную среду его компонентов. О влиянии состояния примембранных слоев на трансформацию эритроцитов свидетельствуют данные работы [364] в которой показано, что обработка клеток нейраминидазой, полностью удаляющей гликокаликс, обуславливает форму клеток близкую стоматоцитам, что хорошо согласуется с полученными нами морфологическими исследованиями развития гипертонического гемолиза в 3,42 М растворе NaCl.

Тот факт, что уже в условиях умеренной внеклеточной гипертонии при концентрации NaCl 0,85 М (1550 мОсм/л) наблюдается деструкция примембранных слоев эритроцитов человека, оказывается весьма важным для понимания возможных первопричин гипертонического криогемолиза. Именно в этой концентрационной зоне начинает проявляться чувствительность к

последующему охлаждению как донорских [407, 417], так и, как установлено нами (см п. 6.2), эритроцитов пуповинной крови человека. Поскольку охлаждение до субнулевых температур донорских эритроцитов в растворах с осмолярностью ниже 750 мОсм/л (0,36 М NaCl) [417], а эритроцитов пуповинной крови в растворах с осмолярностью ниже 840 мОсм/л (0,45 М NaCl) не вызывает гемолиз, мембраны эритроцитов в этой области можно считать интактными. Поэтому частичное разрушение гликокаликса эритроцитов на этапе предварительной экспозиции клеток в растворах выше 0,85 М NaCl вполне допустимо рассматривать как один из первичных пусковых механизмов гипертонического криогемолиза. Следствием повреждения внешних примембранных слоев клеток, вероятнее всего, может быть нарушение белок – липидных взаимодействий в мембране и латеральное перераспределение ее компонентов, сопровождающее деформацию клеточной мембраны при обезвоживании. Эти процессы, несомненно, отражаются на особенностях структурно – фазовых превращений в мембране при охлаждении в температурном интервале 8-13°C [418] и, в конечном счете, могут привести к криогемолизу.

6.5. Гипотермическая устойчивость формы эритроцитов человека как диагностический тест

Изменение реологических свойств крови (вязкости и деформируемости эритроцитов) играют важную роль в патогенезе самых различных заболеваний. Обладая в норме уникальной способностью к каплеподобному поведению, эритроциты проникают через кровеносные сосуды, которые значительно меньше их собственного размера, осуществляя тем самым текучесть крови и обеспечивая ее кислородно-транспортную функцию. Вполне понятно, что патологические процессы, в основе которых лежат аутоиммунные расстройства, интоксикации, гипоксия, нарушение клеточного метаболизма, должны отражаться, прежде всего, на морфологических и функциональных свойствах эритроцитов. Установлено, что сдвиг ферментативного равновесия в мембране, особенно ферментов

энергетического обмена, сопровождается трансформацией эритроцитов. Так, низкая активность этого фермента от 0,5 до 0,2% обуславливает появление акантоцитов, кератоцитов и других нерегулярных форм эритроцитов. Снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы от 1,5 до 0,5% приводит к трансформации эритроцитов из дисков в сферы [436]. Нарушение работы Na^+ – насоса вызывает срыв компенсации избыточного внутриклеточного осмотического давления, вследствие чего эритроциты стремятся принять сферическую форму. Истощение в эритроцитах запаса АТФ в процессе длительного хранения или старения приводит к их гемолизу по пути образования кренированных форм. Поскольку эритроциты, способны связывать и удалять из кровотока иммунные комплексы, изменение геометрии клеточной мембраны при трансформации сопровождается потерей доступности мембранных рецепторов, что в свою очередь может быть одним из механизмов нарушения иммунного гомеостаза больного. Поэтому морфологическое состояние эритроцитов является особенно важным в диагностике, как наследственных заболеваний крови, так и патологических процессов, происходящих в организме.

Авторы работ [437, 438], изучая гипертонический криогемолиз патологических клеток обнаружили, что эритроциты больных наследственным сфероцитозом чрезвычайно чувствительны к изменениям температуры от 37°C до 4 – 0°C, в то время как нормоциты, у которых индуцировали сфероцитоз различными средствами (винбластином, лизофосфатидилхолином, теплом) проявляли повышенную осмотическую хрупкость, но не были чувствительны к гипертоническому криогемолизу. Это послужило основанием для использования гипертонического криогемолиза в качестве клинического метода выявления наследственного сфероцитоза, овалоцитоза, а также анемий различного происхождения [439–441], который оказался более надежным и эффективным, чем оценка осмотической хрупкости эритроцитов, времени гемолиза клеток в глицерине, а также исследование аутогемолиза [214, 442, 443].

Известные методики исследования морфологических особенностей эритроцитов при различных патологических процессах в организме (фиксация в

глютаральдегиде, окраска мазков, сканирующая электронная и фазовоконтрастная микроскопия) имеют ряд существенных недостатков, делающих невозможной прижизненную оценку первоначальной формы эритроцитов [444, 445].

Основываясь на чувствительности формы эритроцитов к изменению температуры [446, 447], нами на примере патологического процесса, обусловленного вибрационной болезнью, в условиях гипотермического хранения периферической крови больных микроскопически в “живой капле” была оценена степень выраженности этого заболевания [448–450].

Проблема вибрационной болезни остается одной из приоритетных в профпатологии, что связано с высокой распространенностью данного заболевания. Основными наиболее характерными признаками неблагоприятного воздействия вибрации считаются нейрососудистые расстройства в верхних конечностях [451] с системными нарушениями микроциркуляции, гемостаза, транспорта, диффузии и утилизации кислорода. Известен способ ранней диагностики вибрационной болезни [452] путем охлаждения кисти больного и изучения сосудистой реакции по времени установления равновесия между теплоносителем и кистью. Однако данный метод является качественным и позволяет констатировать только факт нарушения реологических свойств крови. О несомненном влиянии состояния эритроцитов в нарушении микроциркуляции при вибрационной болезни указывается в работах [453, 454]. Однако детальное изучение морфофункциональных характеристик эритроцитов периферической крови больных вибрационной болезнью с целью выяснения роли этих клеток в формировании клинических проявлений данной патологии отсутствует.

Для отбора экспериментальной группы в условиях клиники было обследовано 61 больного возрастом от 36 до 56 лет, подвергавшихся влиянию локальной вибрации на протяжении от 9 до 22 лет. Предварительный диагноз вибрационной болезни I степени тяжести был выявлен у 50 больных, II – у 11 больных. Экспериментальная группа составляла 20 лиц (I степень – 10, II степень – 10), контрольная – 5 лиц, которые никогда раньше не подвергались действию вибрации и были практически здоровы. Устойчивость формы эритроцитов оценивали в

процентном отношении путем количественного подсчета нормоцитов и суммарно трансформированных эритроцитов по микроснимкам в различные сроки гипотермического хранения крови (до 11 суток) при температуре 4°C.

Микроскопический анализ показал, что в морфозэритрограммах крови лиц контрольной группы (рис. 6.10, 1) отмечается формирование разветвленной сети монетных столбиков, эритроциты в которых находятся в двояковогнутой форме. Эхиноцитарных форм — до 2,6%.

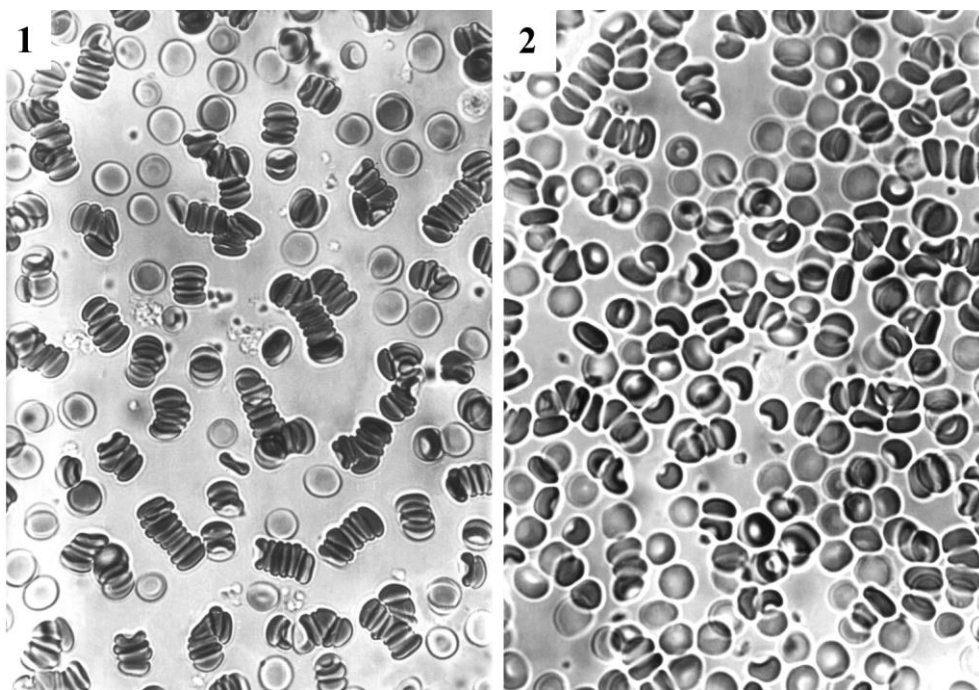


Рис. 6.10. Морфозэритрограммы периферической крови контрольной группы (1) и больных вибрационной болезнью (2). Увеличение при съемке $\times 200$.

В морфозэритрограммах больных вибрационной болезнью наблюдается заметное снижение количества дискоидных клеток. В первой стадии развития болезни в поле зрения формируются короткие линейные столбики эритроцитов, которые во второй стадии агрегации образуют небольшие конгломераты. Эритроциты в столбиках уменьшены в поперечном сечении и несколько утолщены, что указывает на их трансформацию во вздутые диски. Количество эхиноцитарных форм в пределах нормы — до 2,8%. По мере развития патологического процесса в морфозэритрограммах больных на фоне вздутых дисков наблюдается прогрессивное нарастание преимущественно

куполообразных форм — стоматоцитов II и III степени (рис. 6.10, 2). В поле зрения заметно повышается количество сфероэхиноцитов — до 4,6%.

Поскольку стоматоциты относятся к компенсаторно-приспособительной форме и при определенных условиях возможна их обратная трансформация в дискоциты [265, 355, 444], выраженность стоматоцитоза при вибрационной болезни оценена нами в условиях гипотермического хранения крови. На рис 6.11 представлена кинетика снижения нормоцитов в крови больных вибрационной болезнью различной

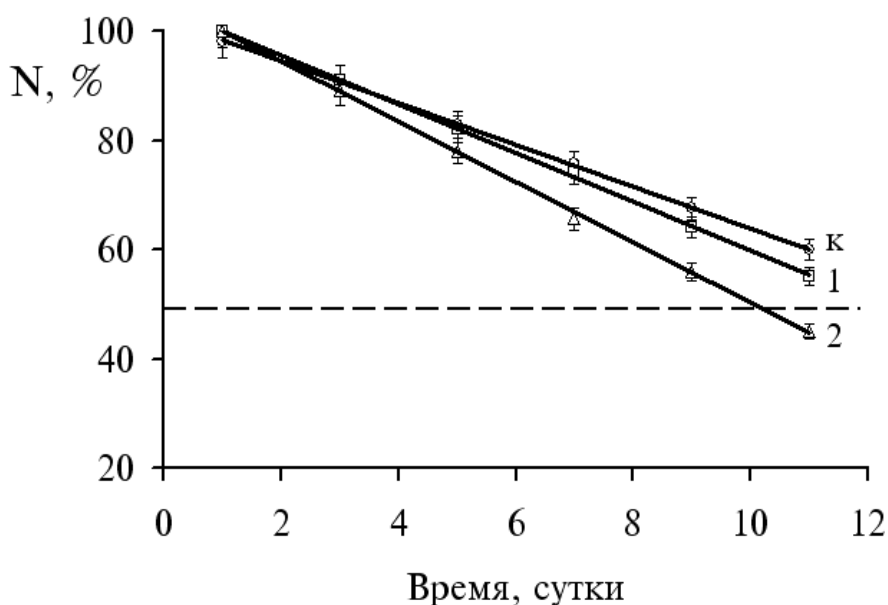


Рис. 6.11. Кинетика снижения количества нормоцитов при гипотермическом хранении крови больных вибрационной болезнью: К — контроль; 1 — I степень; 2 — II степень.

степени тяжести. Видно, что гипотермическая устойчивость формы эритроцитов больных заметно снижена по сравнению контролем, причем четко различимы первая и вторая стадии заболевания. На 10 сут гипотермического хранения в морфоэритрограммах больных вибрационной болезнью II степени наблюдается до 50% предгемолитических форм эритроцитов. При оценке скорости накопления предгемолитических форм установлено, что в контрольной группе она составляет 3,5%/сут в крови лиц с вибрационной болезнью первой степени — 4%/сут, второй — 5%/сут.

Трансформация эритроцитов свидетельствует о целом комплексе

взаимосвязанных изменений, как в структуре самой мембраны, так и на ее поверхности, следствием чего является нарушение жизненно важных функций клетки. Выявление корреляции между специфичностью трансформации эритроцитов при определенной патологии и состоянием мембраны требует глубокого биохимического изучения спектра мембранных фосфолипидов, их количественного соотношения, активности транспортных АТФаз и других показателей, а также целого ряда биофизических параметров. Количественный же микроскопический анализ “живой капли” периферической крови больных в условиях воздействия гипотермии является весьма информативным при оценке наличия и степени выраженности патологического процесса в организме.

6.6. Выводы

Проведенные в данном разделе исследования показали, что критический уровень гемолиза (200 мг%) в суспензии эритроцитов пуповинной крови человека достигается после 7 мин экспозиции клеток в 2,3 М растворе NaCl. Повышенная устойчивость эритроцитов (до 60 мин) в растворах соли в пределах до 2,3 М (4250 мОсм/л) вполне вероятно, может быть обусловлена наличием в пуповинной крови человека значительного количества молодых эритроцитарных форм ретикулоцитов, мембраны которых характеризуются отличающимся от мембран эритроцитов взрослых доноров количественным соотношением, входящих в их состав компонентов.

Установлено, что нижний порог чувствительности к последующему охлаждению эритроцитов пуповинной крови человека находится выше 840 мОсм/л (0,45 М) и превосходит порог чувствительности эритроцитов взрослых доноров 750 мОсм/л (0,36 М). Показано, что охлаждение приводит к снижению критических концентраций потери гипертонической устойчивости эритроцитов пуповинной крови, более чем в два раза. Отсюда следует, что при развитии внеклеточных кристаллов льда сочетанное влияние гипертонии и понижения температуры может вызвать повреждение клеток при достижении гораздо более

низких концентраций NaCl, чем при гипертоническом воздействии в области положительных температур.

Микроскопически установлено, что гипертонический гемолиз происходит по пути скачкообразной трансформации эритроцитов в стоматоциты II–III и последующего перехода в сфероциты и тени.

В области гипертонических концентраций NaCl до 1,28 М (2512 мОсм/л), где гемолиз клеток практически отсутствует, трансформация эритроцитов человека при обезвоживании сопровождается существенным изменением рельефа клеточной поверхности и элиминацией во внеклеточную среду гликопротеинов в результате частичной деструкции внешних примембранных слоев. Деструкцию ВПМС можно рассматривать как один из возможных первичных пусковых механизмов индуцирующих перестройку мембранных структур и белков цитоплазмы, прежде всего цитоскелета и регуляторных белков, которые в свою очередь изменяют устойчивость клеток к гипертоническому криогемолизу.

Показано, что при развитии вибрационной болезни характерно прогрессивное увеличение в периферической крови больных инвагинированных форм – стоматоцитов. В условиях гипотермического хранения крови больных установлено, что если скорость накопления (С, % в сутки) предгемолитических форм эритроцитов лежит в интервале $3,5 < C < 5,0$ диагностируется I стадия болезни, если же $C > 5,0$ – II. Потеря гипотермической устойчивости формы эритроцитов может служить диагностическим тестом степени выраженности патологического процесса.

Материалы раздела 6 опубликованы в работах [405, 415, 416, 419, 420, 434, 446–450].

РАЗДЕЛ 7

ТРАНСПОРТНЫЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС

Эмпирический поиск оптимальных условий криоконсервирования биологических объектов во многом может быть облегчен благодаря теоретическим подходам к решению целого ряда криобиологических задач, среди которых главную роль играют трансмембранные процессы массопереноса.

На всех этапах технологического цикла низкотемпературного консервирования клетки многократно подвергаются воздействию изменяющейся тоничности внеклеточной среды, в результате чего на клеточной мембране возникают значительные осмотические градиенты. Способность клеток адекватно реагировать на стрессовые условия среды определяются транспортными и механическими свойствами клеточной мембраны, характерными для данного типа клеток. В связи с этим определение биофизических характеристик клеточных мембран является крайне необходимым при обосновании времени экспозиции клеток в криозащитных средах, а также скоростей охлаждения и отогрева при их криоконсервировании.

На этапе отогрева замороженной клеточной суспензии в каналах, куда в процессе медленного замораживания оттесняются клетки, происходит постепенное снижение концентрации растворенных веществ за счет интенсивного плавления внеклеточных кристаллов льда и, соответственно, восстановление объема обезвоженных клеток. Одним из возможных механизмов повреждения клеток на данном этапе криоконсервирования в случае, когда клетки содержат проникающий криопротектор, может быть их лизис в результате чрезмерного оводнения при установлении термодинамического равновесия в системе “клетка – окружающая среда”.

В задачу исследований данного раздела входило изучение реакций гепатоцитов крыс на изменение тоничности внеклеточной среды на этапе отогрева, определение численных значений модуля упругости и коэффициентов проницаемости для молекул воды и диметилсульфоксида мембран этих клеток.

7.1. Механизм постгипертонического лизиса изолированных гепатоцитов крыс при регидратации

Изолированные гепатоциты животных являются удобной экспериментальной моделью в медико-биологических исследованиях для изучения различных стрессовых воздействий на клетки (осмотический шок, тепловой шок, изменение рН среды, действие этанола, ядов и других факторов) поскольку в литературе имеется их детальная морфофункциональная характеристика [455, 456]. Паренхиматозные клетки являются самыми крупными клетками печени. Объем гепатоцита колеблется в довольно широких пределах от 2500 до 10000 мкм³. Способность клеток данного типа осуществлять эндоцитоз веществ с большой молекулярной массой и сравнительно крупных липосом является одной из важнейших их физиологических характеристик [455]. Именно с эндоцитозом связано попадание в гепатоциты большинства высокомолекулярных ксенобиотиков и токсинов. При эндоцитозе, как и при циклических изменениях осмотических нагрузок в условиях криоконсервирования, плазматическая мембрана гепатоцитов испытывает значительные деформации. Поэтому вполне вероятно, что механические характеристики мембран гепатоцитов могут существенно отличаться от мембран других типов клеток и, следовательно, возможно значительное отклонение количественных характеристик процесса их постгипертонического лизиса от гипотонического гемолиза [457–460].

Нами регуляция клеточного объема изолированных гепатоцитов крыс изучена в условиях последовательного изменения осмолярности внеклеточной среды, моделирующей процессы дегидратации и регидратации клеток в условиях

роста и плавления внеклеточных кристаллов льда [461–463].

Криоконсервирование изолированных гепатоцитов крыс наиболее эффективно под защитой 10–20% (1,40–2,80 М) ДМСО в солевой среде с использованием медленных линейных режимов замораживания 1,0–10° С/мин [464, 465]. В связи с этим в качестве гипертонической среды мы и использовали растворы ДМСО в концентрации 0,28, 0,70, 2,10 и 2,80 М, приготовленные на среде суспендирования гепатоцитов, осмолярности которых приведены табл. 7.1. (рН =7,4). Время экспозиции гепатоцитов в гипертонических растворах ДМСО составляло 30 мин, после чего тоничность внеклеточной среды снижали до изотонической дозированным ступенчатым введением в суспензию клеток дистиллированной воды. Все экспериментальные манипуляции проводили при температуре 24°С непосредственно на столике микроскопа в специальной камере,

Таблица 7.1

Осмолярность гипертонических растворов ДМСО.

Среда	Осмолярность, мОсм/л	Приведенное осмотическое давление π/π_0
Среда суспендирования	364	1,16
0,28 М	580	1,84
0,70 М	970	3,08
2,10 М	2250	7,14
2,80 М	2890	9,17

что позволяло наблюдать за реакцией клеток с самого ее начала. Для оценки исходной сохранности клеток 0,2% трипановый синий вводили в суспензию до гипертонического воздействия. Поскольку интактные изолированные гепатоциты крыс имеют практически округлую форму с диаметром большого сечения около 18-20 мкм, их объем V_0 и площадь поверхности S_0 можно оценить по площади сечения фотографического изображения S_c , используя простые геометрические соотношения:

$$V_0 = \frac{1}{6\sqrt{\pi}} S_0^{\frac{3}{2}} = \frac{1}{6\sqrt{\pi}} (4S_c)^{\frac{3}{2}}$$

Кинетические кривые изменения относительной площади S_c / S_0 клеток получали методом волюмометрии.

При однократном разведении среды суспендирования дистиллированной водой (182 мОсм/л) реакция интактных гепатоцитов крыс на гипотонию сопровождалась мгновенным (40 с) оводнением клеток (рис. 7.1, рис. 7.2). При этом относительная площадь гепатоцитов увеличивалась в среднем не более чем

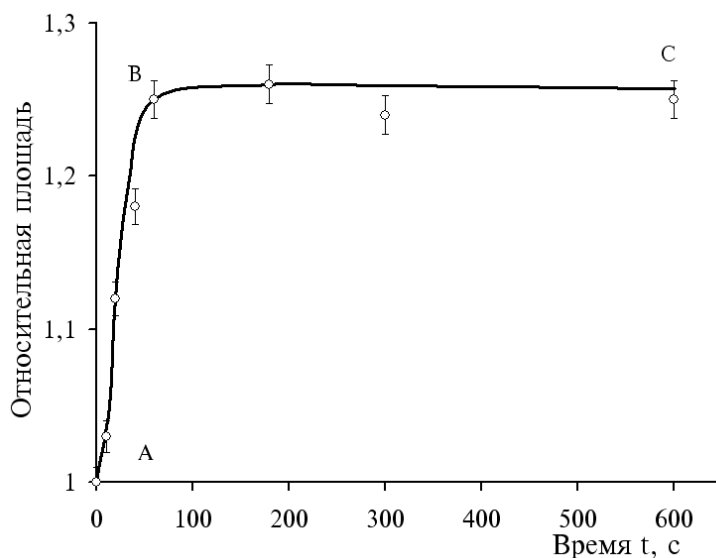


Рис. 7.1. Кинетика изменения относительной площади интактных гепатоцитов при однократном разведении среды суспендирования.

в 1,3 раза. В таком состоянии гепатоциты оставались в течение всего времени наблюдения. Морфологически отмечались вакуолизация и разрыхление внутриклеточного содержимого, а также его перераспределение по всему объему клетки (рис. 7.2).

После введения в суспензию гепатоцитов гипертонических растворов ДМСО наблюдалась характерная для проникающих веществ двухфазная реакция клеток: обезвоживание и восстановление исходного объема клеток, в течение которого часть внутриклеточной воды замещалась криопротектором. Важно отметить, что фаза быстрого проникновения ДМСО в гепатоциты практически завершалась на первой минуте экспозиции клеток в растворах криопротектора.

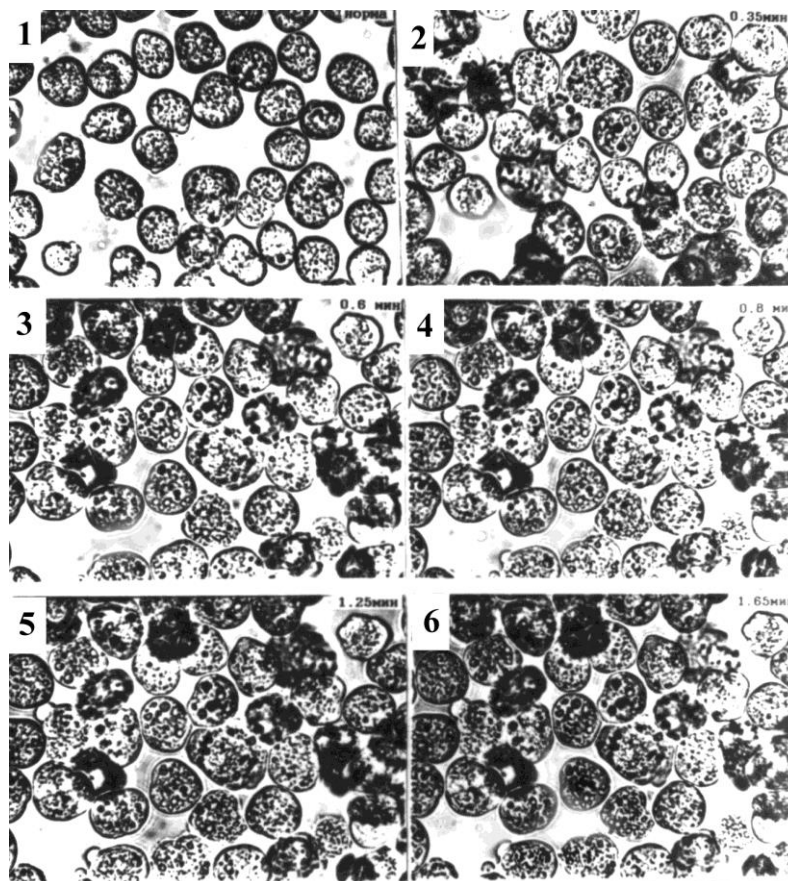


Рис. 7.2. Развитие морфологической реакции интактных гепатоцитов крысы при однократном разведении среды суспендирования: 1 – интактные гепатоциты; 2 – гипотония 182 мОсм/л. Увеличение при съемке $\times 200$.

Далее следовало более медленное восстановление осмотического равновесия в системе “клетка – внеклеточная среда”. Выраженных морфологических изменений гепатоцитов в процессе гипертонической экспозиции отмечено не было. После насыщения гепатоцитов различной концентрацией криопротектора в клеточной суспензии ступенчато снижали тоничность внеклеточной среды. Анализ данного этапа исследований показал, что характер постгипертонического ответа клеток на стрессовое воздействие, вызванное регидратацией, зависит от исходной гипертоничности внеклеточной среды и, следовательно, от степени насыщения клеток криопротектором. Общей начальной постгипертонической реакцией гепатоцитов явилось связанное с оводнением резкое увеличение их размера. На поверхности клеток отмечалось массовое формирование мембранных

пузырей (блебов). При коалесценции блебов наблюдалось постепенное разделение гиалоплазмы и гранулоплазмы гепатоцитов: между клеточной мембраной и компактной гранулоплазмой отчетливо различалась прозрачная зона гиалоплазмы. Такая стрессовая морфология гепатоцитов была характерна при оводнении клеток независимо от исходной концентрации ДМСО в растворе. Дальнейшее поведение гепатоцитов определялось уровнем предварительного насыщения клеток криопротектором и степенью изотропного растяжения мембраны при регидратации.

Так, при однократном снижении тоничности внеклеточной среды после насыщения гепатоцитов крыс 0,28 М раствором ДМСО относительная площадь клеток увеличивалась за 3,6 мин в 3,4 раза (рис. 7.3), после чего следовал разрыв

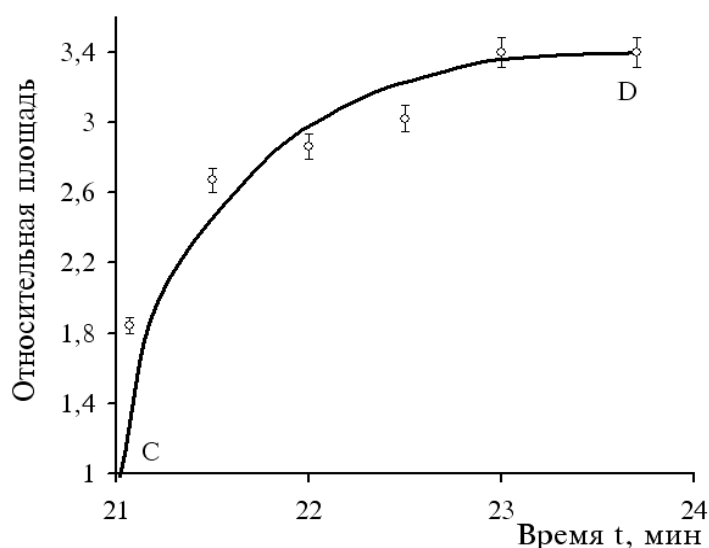


Рис. 7.3. Кинетика изменения относительной площади гепатоцитов при регидратации после гипертонического воздействия 0,28 М ДМСО.

плазматической мембраны (рис. 7.4, 9). Фрагменты мембраны замыкались в везикулы (рис. 7.4, 10, 11). Гранулоплазма визуально выглядела разрыхленной, но оставалась структурно связанной, о чем свидетельствовало ее сжатие при повторном гипертоническом воздействии 2,10 М раствора ДМСО (рис. 7.4, 12).

При насыщении гепатоцитов крыс 0,70 М раствором ДМСО последующее двукратное разведение клеточной суспензии сопровождалось возрастанием относительной площади клеток в течение 4 мин в 3 раза (рис. 7.5, рис. 7.6, 5-10). В

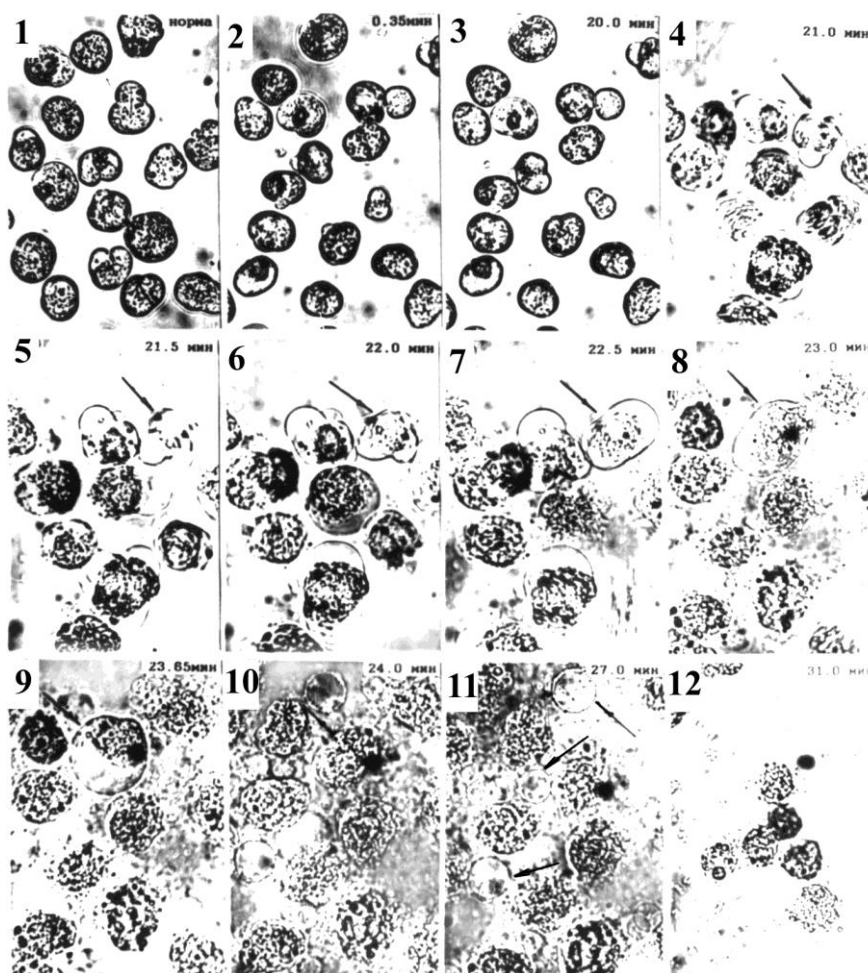


Рис. 7.4. Развитие морфологической реакции гепатоцитов при регидратации после гипертонического воздействия 0,28 М раствора ДМСО: 1 – интактные гепатоциты; 2, 3 – экспозиция в 0,28 М растворе ДМСО; 4 – регидратация; 5–8 – отслоение мембраны; 9 – сферуляция; 10, 11 – разрыв клеточной мембраны и формирование везикул; 12 – сжатие гранулоплазмы при введении 2,10 М раствора ДМСО. Увеличение при съемке $\times 200$.

таким напряженным состоянием мембраны клетки стабилизировались (рис. 7.5, DE, рис. 7.6, 11). Повторное введение в суспензию 0,70 М раствора ДМСО вызывало резкое обезвоживание клеток. Мембрана выглядела складчатой (рис. 7.5, EF, рис. 7.6, 12). При дальнейшей экспозиции отмечали медленное сглаживание мембраны и незначительное снижение относительной площади клеток (рис. 5, FG, рис. 7.6, 13). Однако исходный размер клеток не восстанавливался, что, по-видимому, связано с увеличением объема

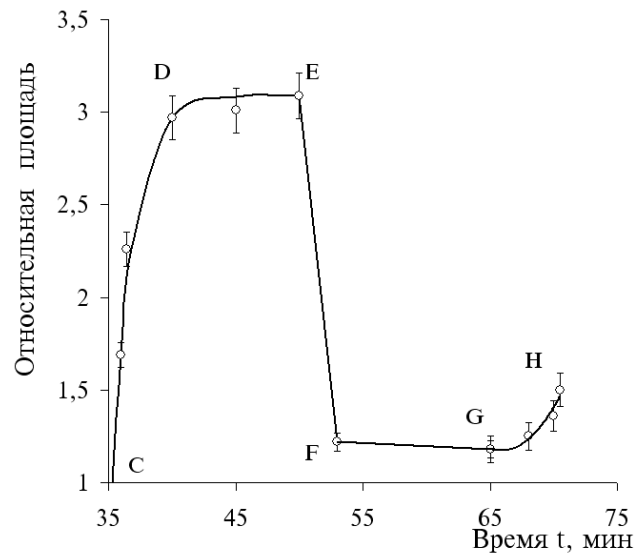


Рис. 7.5. Кинетика изменения относительной площади гепатоцитов при регидратации после гипертонического воздействия 0,70 М раствора ДМСО: CD – оводнение; DE – стабилизация состояния; EF – дегидратация при повторном введении 0,70 М раствора ДМСО; FG – стабилизация обезвоженного состояния; GH – повторная регидратация.

гранулоплазмы при ее разрыхлении в результате предшествующего оводнения клеток. Последующее разведение клеточной суспензии вновь сопровождалось набуханием гепатоцитов и также без разрыва клеточной мембраны (рис. 5, GH, рис. 7.6, 14-16).

При насыщении гепатоцитов 2,10 М раствором ДМСО ступенчатое снижение тоничности внеклеточного раствора приводило к развитию постгипертонического ответа клеток различного характера, зависящего от степени напряжения плазматической мембраны клеток при достижении осмотического равновесия в системе.

Так, при однократном разведении суспензии относительная площадь клеток увеличивалась за 8 мин в 1,7 раза (рис. 7.7, CD, рис. 7.8, 3) и в течение 17 мин состояние гепатоцитов оставалось стабильным (рис. 7.7, DE). После Lag-фазы наблюдался мгновенный (15 с) сброс мембранного напряжения (рис. 7.7, EF, рис. 7.8, 4). Относительная площадь клеток после “схлопывания” мембраны составляла 1,27. Последующее введение в суспензию клеток 2,80 М раствора

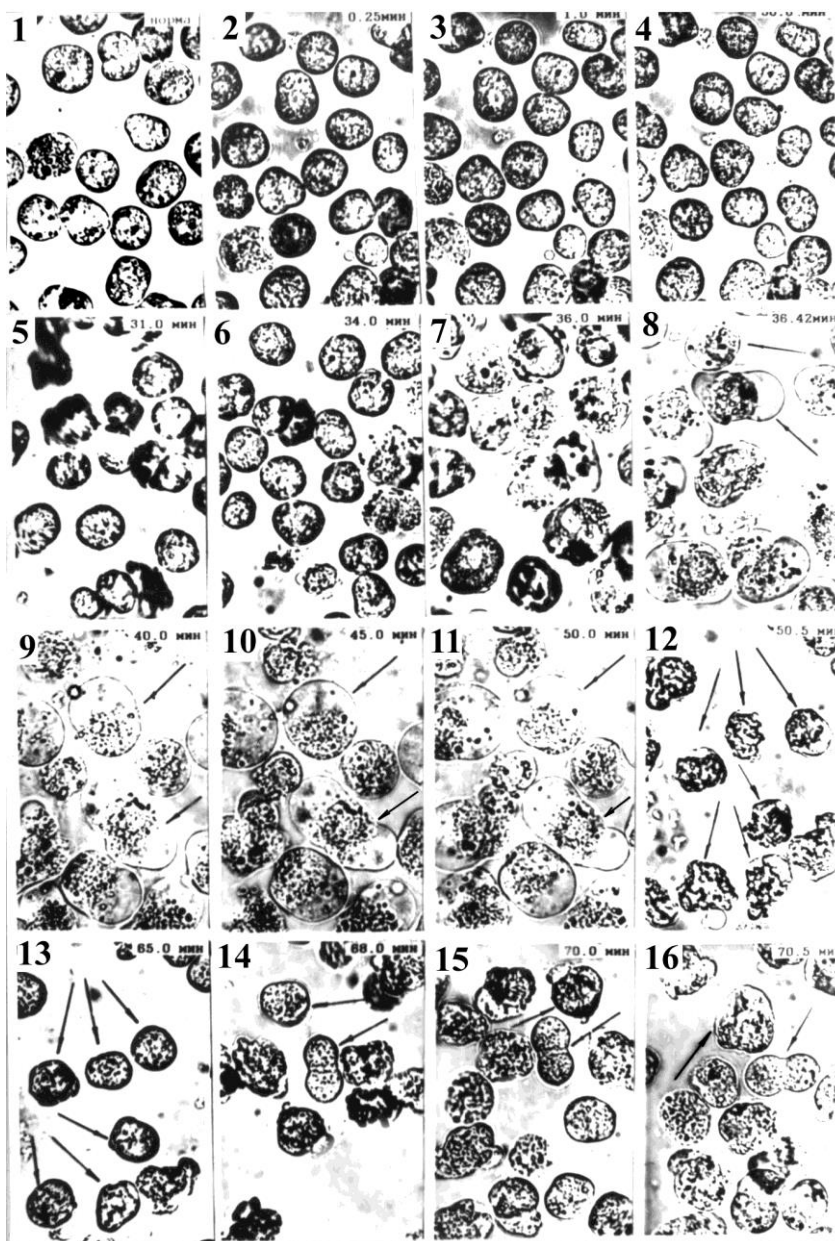


Рис. 7.6. Развитие морфологической реакции гепатоцитов при регидратации после гипертонического воздействия 0,70 М раствора ДМСО: 1 – интактные гепатоциты; 2–4 – экспозиция в 0,70 М растворе ДМСО; 5 – регидратация; 8–11 – отслоение мембраны; 12 – сжатие гепатоцитов при повторном введении 0,70 М раствора ДМСО; 13 – сглаживание мембраны; 14–16 – набухание клеток при повторной регидратации. Увеличение при съемке $\times 200$.

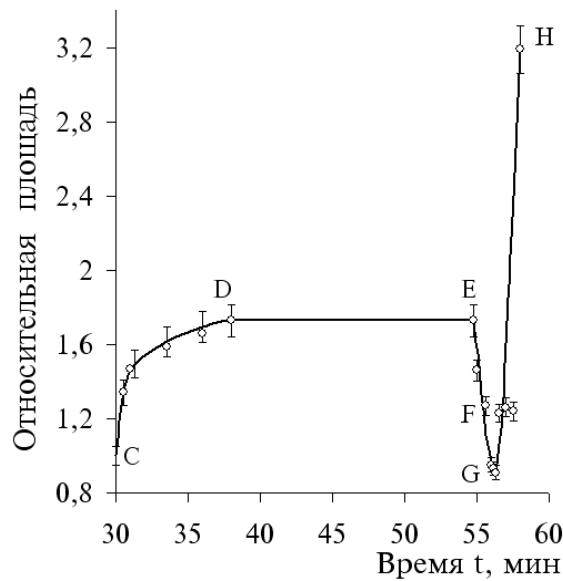


Рис. 7.7. Кинетика изменения относительной площади гепатоцитов при регидратации после гипертонического воздействия 2,10 М раствора ДМСО. Однократное разведение: CD – оводнение; DE – стабилизация состояния; EF – сброс мембранного напряжения; FG – дегидратация при введении 2,80 М раствора ДМСО; GH – повторная регидратация.

ДМСО приводило к осмотическому сжатию гепатоцитов (рис. 7.7, FG, рис.7.8, 5), а снижение тоничности среды – к возрастанию относительной площади клеток в 3,2 раза (рис. 7.7, GH, рис. 7.8, 6) и последующему разрыву клеточной мембраны гепатоцитов.

При двукратном ступенчатом разведении суспензии относительная площадь клеток увеличивалась за 4 мин в 2,9 раза (рис. 7.9, CD, рис. 7.10, 8). В таком напряженном состоянии клеточной мембраны гепатоциты оставались не более 45 с (рис. 7.9, DE). Далее наблюдался сброс мембранного напряжения, который реализовался в два этапа: скачкообразное (15с) уменьшение размера клеток (рис. 7.9, EF) и последующее (около 9 мин) непрерывное его уменьшение до значения $1,5 S_0$ (рис. 7.9, FG, рис. 7.10, 9-12). При дальнейшей экспозиции уменьшение размера клеток существенно замедлялось, а при достижении значения $1,3 S_0$ – стабилизировалось (рис. 7.9, GH, рис. 10, 13-15). Повторное введение в суспензию клеток 2,10 М раствора ДМСО сопровождалось сжатием

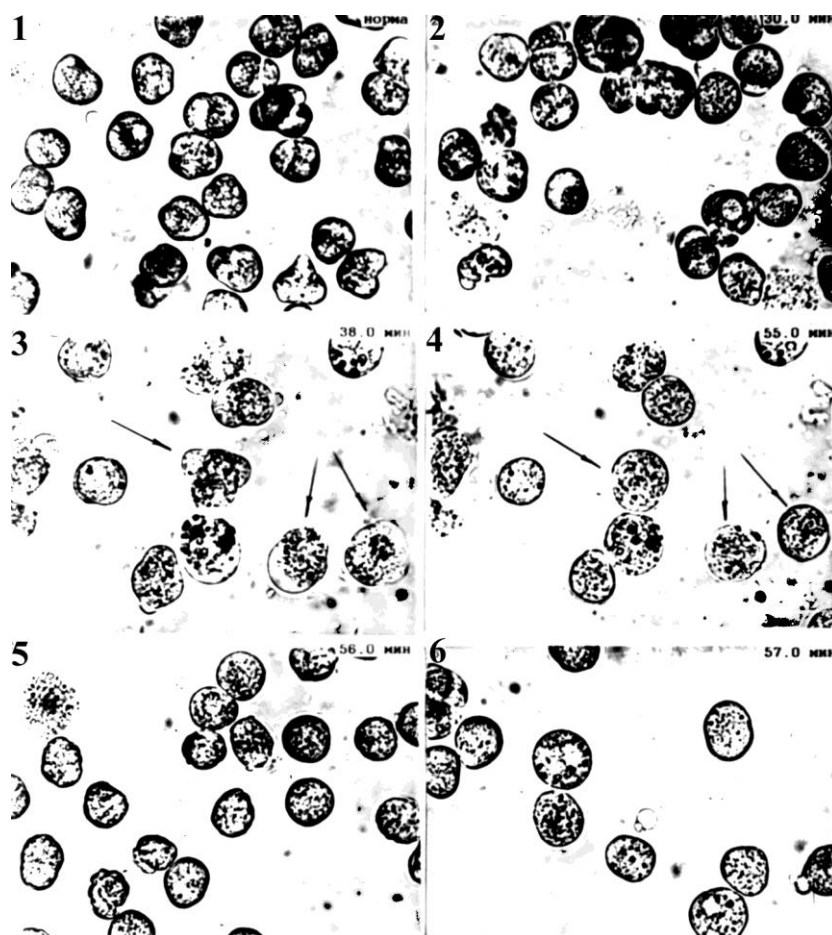


Рис. 7.8. Развитие морфологической реакции гепатоцитов при регидратации после гипертонического воздействия 2,10 М раствора ДМСО. Однократное разведение: 1 – интактные гепатоциты; 2 – экспозиция в 2,10 М растворе ДМСО; 3 – 8 мин после регидратация; 4 – сброс мембранного напряжения; 5 – сжатие гепатоцитов при введении 2,80 М раствора ДМСО; 6 – набухание клеток при повторной регидратации. Увеличение при съемке $\times 200$.

гепатоцитов практически до исходного размера (рис. 7.9, НІ, рис. 7.10, 16). Гепатоциты оставались осмотически активными и при последующем разведении суспензии клеток (рис. 7.9, ЖК, рис. 7.10, 18-20), в результате которого относительная площадь клеток увеличивалась в 3,2 раза. Однако при этом массовое разрушение гепатоцитов не отмечалось. Плазматическая мембрана клеток принимала неправильную форму и сохраняла связи с цитоматриксом лишь в некоторых участках. Гранулоплазма имела фрагментированный вид и

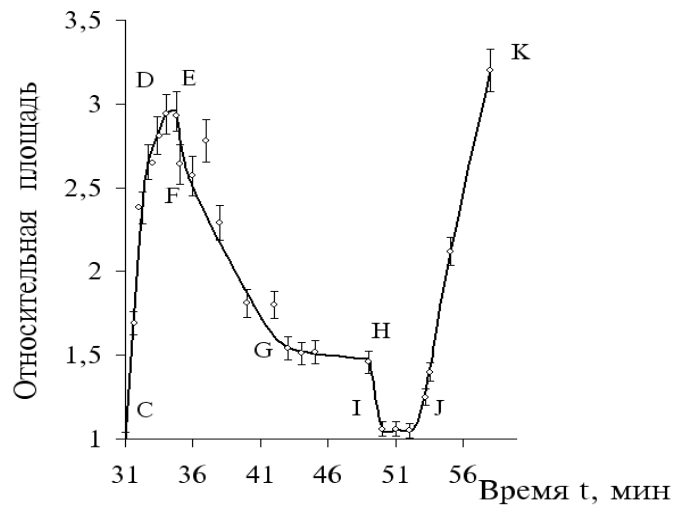


Рис. 7.9. Кинетика изменения относительной площади гепатоцитов при регидратации клеток после гипертонического воздействия 2,10 М раствора ДМСО. Двукратное ступенчатое разведение: CD – оводнение; DE – стабилизация состояния; EF – скачкообразный сброс мембранного напряжения; FG – непрерывный сброс мембранного напряжения; GH – стабилизация состояния; HI – дегидратация при введении 2,10 М раствора ДМСО; JK – повторная регидратация.

распределялась по объему гепатоцитов (рис. 7.10, 20).

Троекратное ступенчатое разведение суспензии после насыщения клеток 2,10 М раствором ДМСО сопровождалось максимально возможным оводнением клеток (рис. 7.11) и разрывом клеточной мембраны (рис. 7.12, 16). В процессе осмотического набухания наблюдалось полное отслоение клеточной мембраны от цитроматрикса и ее сферуляция (рис. 7.12, 12-14). Максимальное напряжение мембраны соответствовало критической площади клеток около $5,6 S_0$. Гранулоплазма оставалась структурно связанной и после разрыва клеточной мембраны (рис. 7.12, 15, 16).

При насыщении гепатоцитов крыс 2,80 М раствором ДМСО трехкратное снижение внеклеточной тоничности сопровождалось медленным (в течение 10,7 мин) оводнением клеток, приводящем к увеличению их относительной площади в 2,3 раза (рис. 7.13, CD, рис. 7.14, 5-7). Затем наблюдался резкий сброс (15 с)

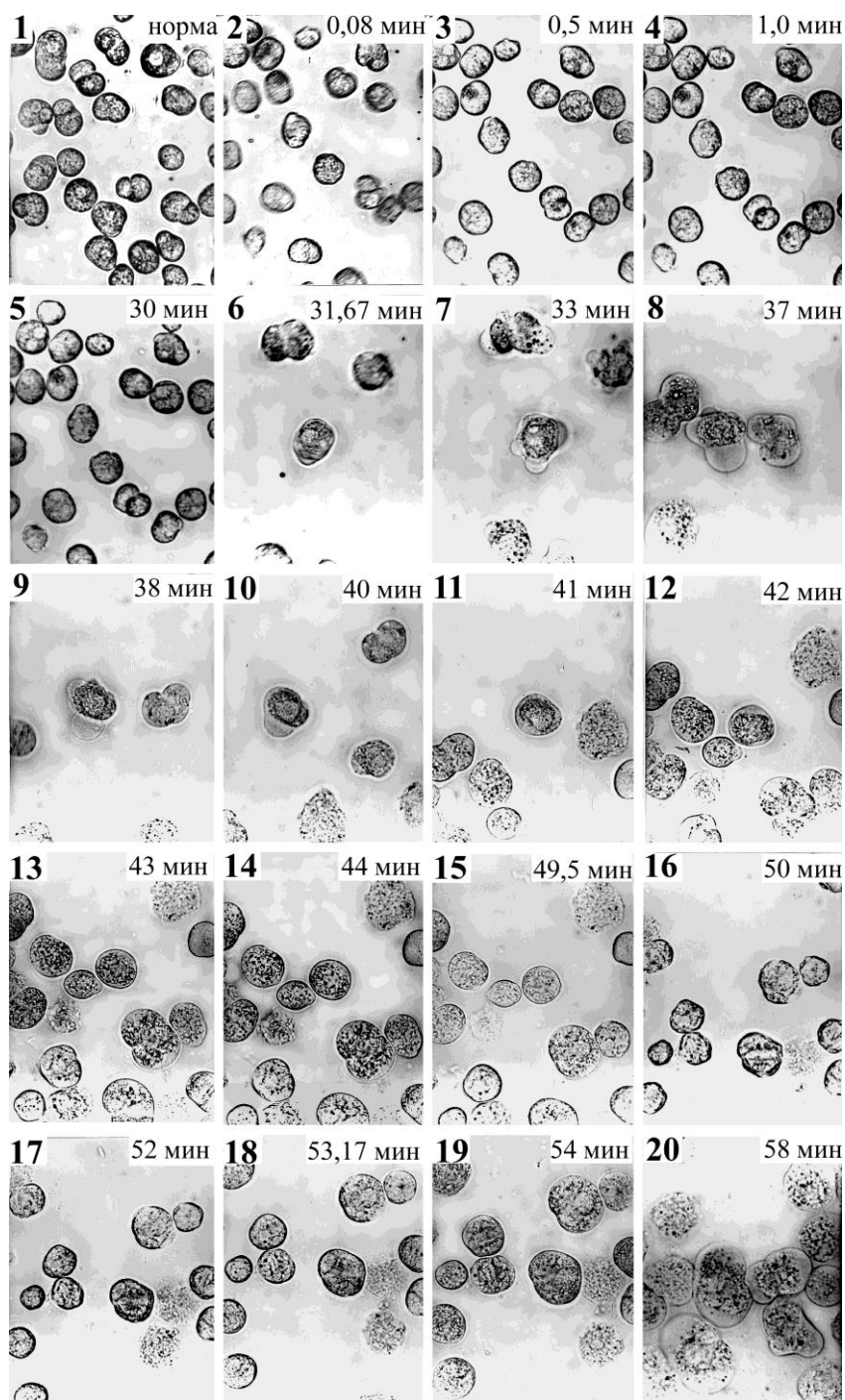


Рис. 7.10. Развитие морфологической реакции гепатоцитов при регидратации клеток после гипертонического воздействия 2,10 М раствора ДМСО. Двукратное ступенчатое разведение: 1 – интактные гепатоциты; 2–5 – экспозиция в 2,10 М растворе ДМСО; 6–8 – регидратация; 9–12 непрерывный сброс мембранного напряжения; 13, 15 – стабилизация состояния; 16 – сжатие клеток при повторном введении 2,10 М раствора ДМСО; 17 – стабилизация состояния, 18–20 повторная регидратация. Увеличение при съемке $\times 200$.

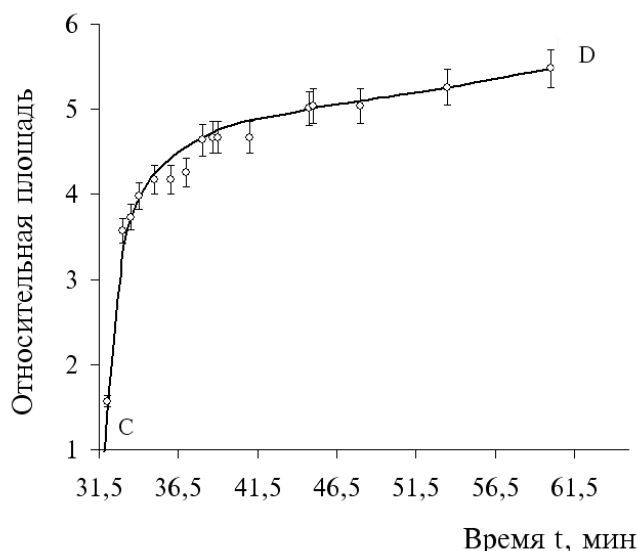


Рис. 7.11. Кинетика изменения относительной площади гепатоцитов при регидратации клеток после гипертонического воздействия 2,10 М раствора ДМСО. Троекратное ступенчатое разведение.

мембранного напряжения до относительной площади клеток равной 1,4 (рис. 7.13, DE, рис. 7.14, 8), которая в последующем не изменялась (рис. 7.14, 9). В местах формирования блебов фиксировался локальный разрыв мембраны с последующим выходом внутриклеточного содержимого во внеклеточную среду (рис. 7.14, 7-9).

Таким образом, ступенчатая регидратация гепатоцитов крыс исходно насыщенных различной концентрацией ДМСО приводит к возникновению трансмембранного перепада осмотического давления, под действием которого клетки оводняются так, что их объем значительно превосходит исходный. Образование мембранных блебов (эффект “вскипания” мембраны) при оводнении свидетельствует о том, что в норме между клеточной мембраной и цитозолем как целым имеются слабые нековалентные связи, которые сравнительно легко разрываются под действием осмотических сил. Вследствие резкого коллапса цитоплазматического содержимого и утраты связи клеточной мембраны с гранулоплазмой наблюдается разделение гиалоплазмы и гранулоплазмы. При достаточно большом растяжении в результате образования в мембране гепатоцита флуктуационной поры из него скачкообразно выбрасывается часть

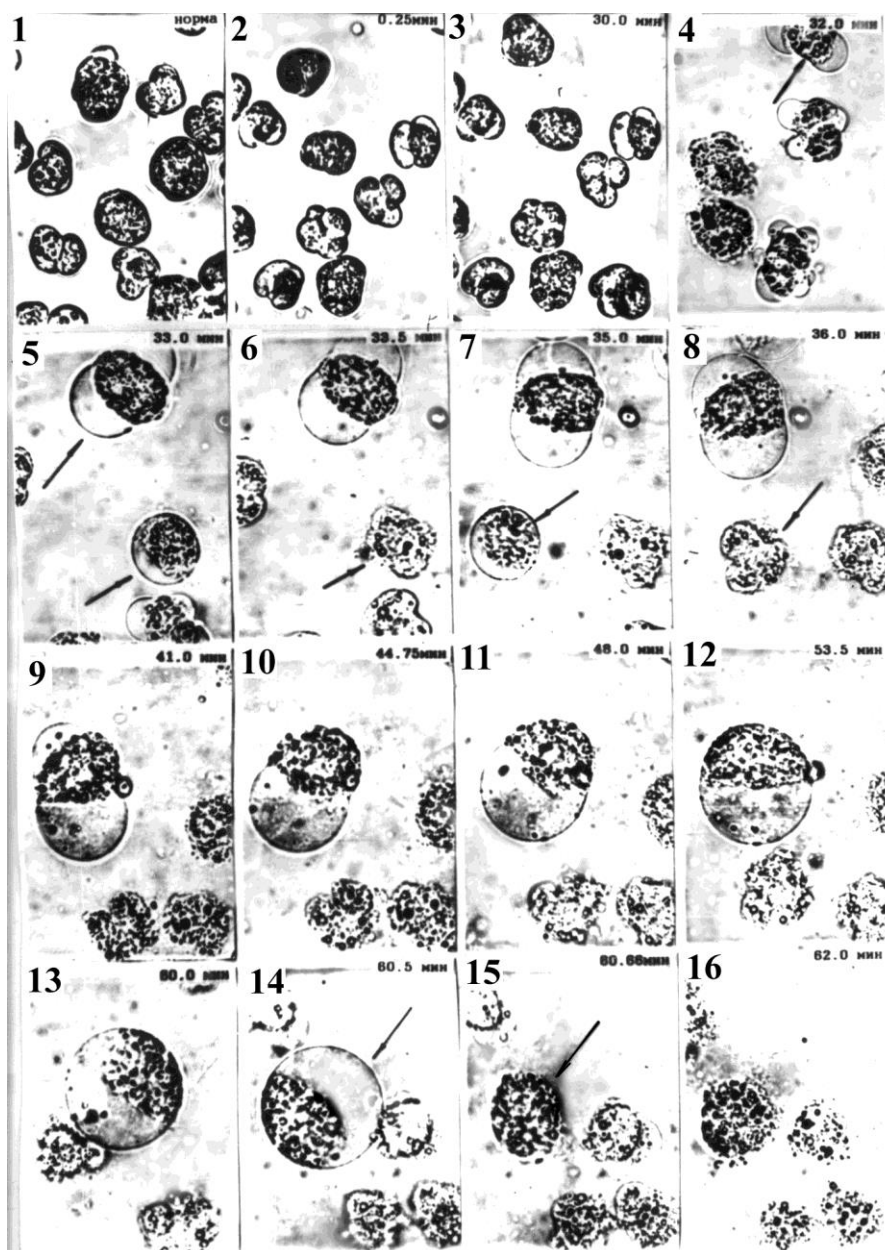


Рис. 7.12. Развитие морфологической реакции гепатоцитов при регидратации клеток после гипертонического воздействия 2,10 М раствора ДМСО. Троекратное ступенчатое разведение: 1 – интактные гепатоциты; 2, 3 – экспозиция в 2,10 М растворе ДМСО; 4 – регидратация; 6–14 – отслоение и сферуляция мембраны; 15, 16 – гранулоплазма после разрыва клеточной мембраны. Ув. при съемке $\times 200$.

внутриклеточного содержимого, что сопровождается уменьшением площади плазматической мембраны и объёма клетки (рис. 7.7, EF, рис. 7.9, EFGH, рис. 7.13, DE). Вероятность образования одиночной поры в изотропно растянутой мембране в момент выброса из клетки внутриклеточного содержимого при

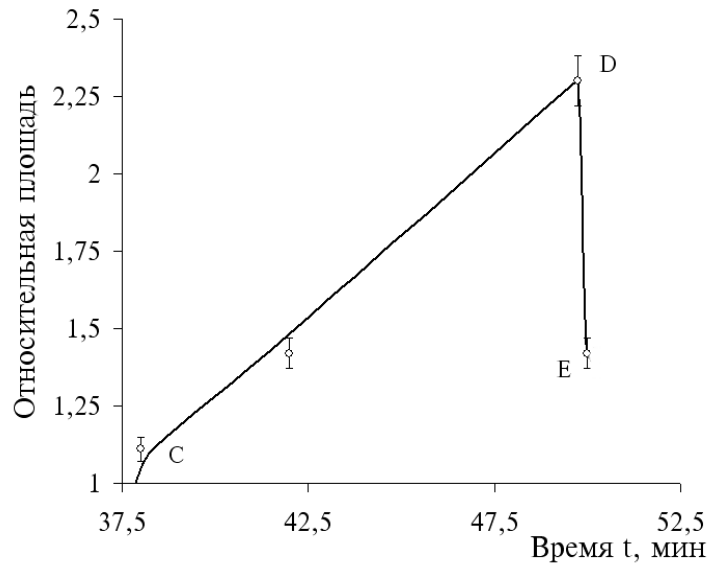


Рис. 7.13. Кинетика изменения относительной площади гепатоцитов при регидратации клеток после гипертонического воздействия 2,80 М раствора ДМСО. Троекратное ступенчатое разведение: CD — оводнение; DE — сброс мембранного напряжения.

сбросе мембранного напряжения подтверждается реактивным эффектом, наблюдаемым нами при изучении осмотического лизиса эритроцитов человека в водных растворах глицерина [466]. Микроскопически было зафиксировано, что при достижении эритроцитом сферической формы гемолиз сопровождается резким перемещением клетки за счет эффекта отдачи, а также одновременным смещением близлежащих с гемолизирующей клеткой эритроцитов под действием выбрасываемой струи внутриклеточного раствора.

После формирования поры в мембране гепатоцита и выброса части внутриклеточного содержимого из клетки наружу в процессе постгипертонического лизиса пора самопроизвольно “залечивается”, а клеточная мембрана сохраняет свойство избирательной проницаемости. Об этом свидетельствует тот факт, что при повторном циклическом изменении тоничности внеклеточной среды осмотическая реакция клеток качественно сохраняется (рис. 7.7, FG и GH, рис 7.9, HI и JK), что было бы невозможно без самоликвидации разрыва. Принципиально важным вопросом является выяснение,

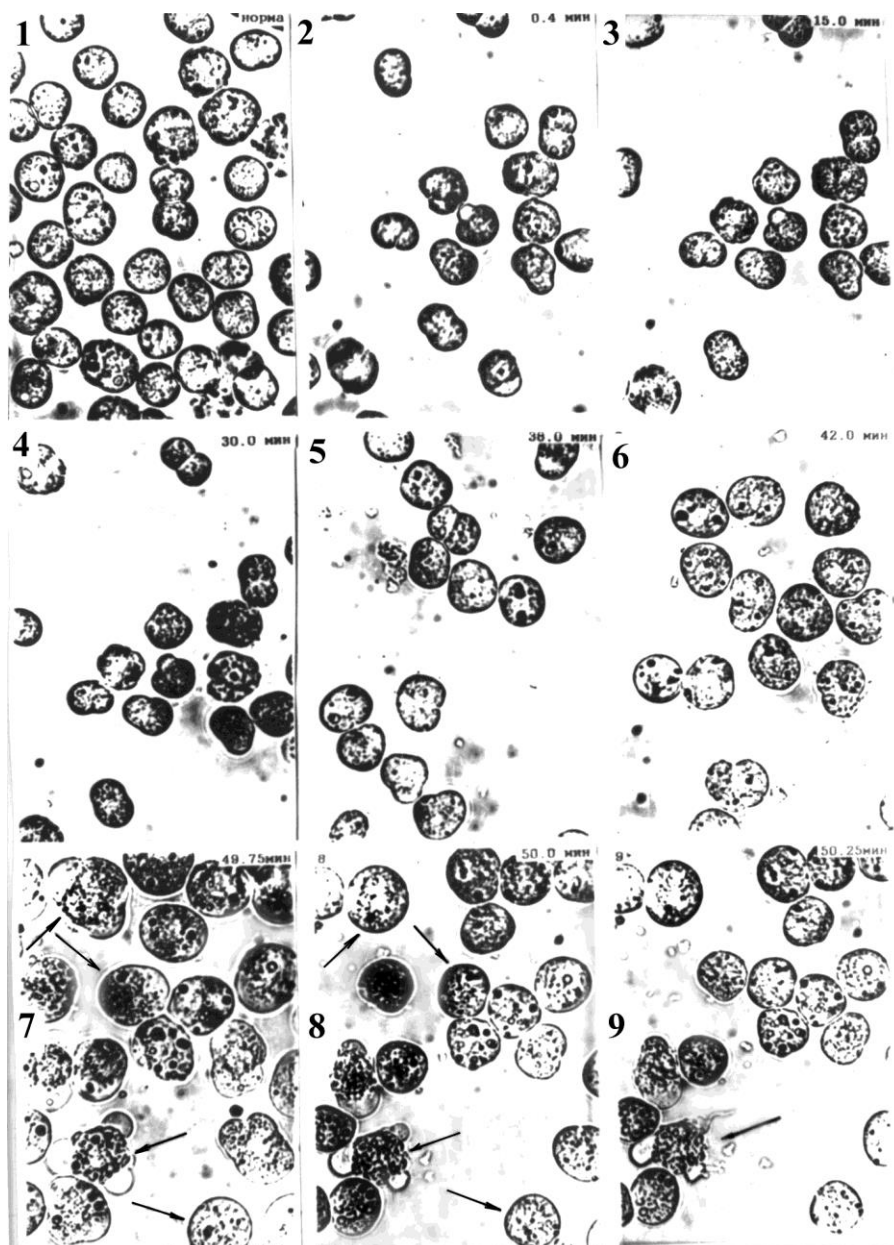


Рис. 7.14. Развитие морфологической реакции гепатоцитов при регидратации клеток после гипертонического воздействия 2,80 М раствора ДМСО. Троекратное ступенчатое разведение. 1 – intactные гепатоциты; 2–4 – экспозиция в 2,80 М растворе ДМСО; 5–7 – регидратация; 8 – сброс мембранного напряжения; 9 – локальный разрыв мембраны. Увеличение при съемке $\times 200$.

в какой же части мембраны возникают такие разрывы: в липидном матриксе, в интегральных белках или по месту контакта белка и липида. В работе [467] при криомикроскопических исследованиях изменения объема простой модельной системы клетки, представляющей собой моноламеллярные липосомы из яичного

лицитина, на этапе отогрева в мембранах липосом наблюдались кольцевые разрывы. В большинстве случаев после отогрева мембранные повреждения “залечивались” с восстановлением осмотической активности липосом. В работе [468] электрическими методами было проведено исследование одиночных трансмембранных пор, возникающих в плоских фосфолипидных мембранах при фазовых переходах жидкокристаллическое состояние – гель, жидкокристаллическое состояние – гексагональная фаза II. Впервые были обнаружены долгоживущие липидные поры со временем жизни порядка 1 с. Установлено [469], что поры, развивающиеся при обратимом электрическом пробое бислойных липидных мембран и клеточных мембран, залечиваются в течение нескольких секунд. Сравнение времен “залечивания” клеточных и липидных мембран дает основание предполагать, что локализацией таких пор является липидный матрикс. Характерной чертой липидных пор считается именно способность к самозалечиванию, что принципиально отличает их от белковых и пептидных пор. Стабильность липидного бислоя и клеточной мембраны в целом, по-видимому, зависит от того, превышает ли радиус липидной поры критический или нет [468]. С ростом липидной поры в область дефекта, вероятно, вовлекаются белковые части, в результате чего может происходить своеобразная стабилизация кромки поры, затрудняющая ее “залечивание” [469], и клетка разрушается. Способность пор самозалечиваться, по мнению авторов работы [470], является результатом уменьшения изотропного натяжения по всей поверхности мембраны клетки. При залечивании липидных пор их радиусы пробегают все значения вплоть до минимальных. На последних этапах восстановления бислоя липидные поры могут превращаться в водные поры, доступные только для молекул и ионов воды [468]. Согласие теоретических результатов, касающихся лизиса липидных везикул, с экспериментальными данными, полученными при изучении лизиса биологических везикул (хромафффиновых гранул) и эритроцитов, также позволило авторам [470] утверждать, что в мембранах биологических объектов, содержащих большое количество белков, образование таких пор происходит в области

чистого липида. Наблюдаемый нами необратимый разрыв мембран гепатоцитов крыс в процессе постгипертонического лизиса, сопровождающийся формированием небольших везикул во внеклеточной среде (рис. 7.4, 10, 11), является косвенным подтверждением вероятности возникновения такого макроскопического разрыва по области чистого липида.

На этапе гипертонического воздействия с увеличением концентрации ДМСО во внеклеточной среде скорость увеличения объема гепатоцитов после добавления к суспензии дистиллированной воды возрастала, так как перепад осмотического давления на мембране при этом также увеличивался. В условиях больших скоростей оводнения разрыв мембраны наступал при более высоком значении объема клеток, чем в условиях малых скоростей оводнения.

Таким образом, в механизме постгипертонического лизиса гепатоцитов крыс лежит флуктуационное образование липидной поры, что подтверждает выводы, следующие из теоретической модели явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека, согласно которой он осуществляется пульсирующим выбросом молекул гемоглобина из клеток [471–473].

7.2. Оценка упругих свойств плазматических мембран изолированных гепатоцитов крыс

Как было показано выше, объем гепатоцитов крыс в процессе постгипертонической регидратации в несколько раз превосходит исходный. Это свидетельствует о том, что мембрана клетки подвергается значительному растяжению, в результате которого в ней возникает изотропное натяжение. Под действием этого изотропного натяжения в мембране действительно образуется макроскопическая пора, через которую часть внутриклеточного раствора выбрасывается из клетки наружу. Как правило при регидратации стрессовая морфология гепатоцитов сопровождается образованием пузырей, что, по-видимому, связано с отрывом части мембраны от цитоплазматической гелеобразной матрицы.

Используя экспериментально измеренные морфометрические параметры мембранных пузырей при их образовании и разрыве, нами были оценены величина относительного изменения площади поверхности мембраны гепатоцитов, при достижении которого в ней возникает макроскопический разрыв, и модуля ее изотропного растяжения [474, 475].

На рис. 7.15 представлено схематическое изображение процесса образования пузырей на поверхности мембраны (экспериментальная ситуация рис. 7.14, 7-9). При образовании локального разрыва и оттоке внутриклеточного

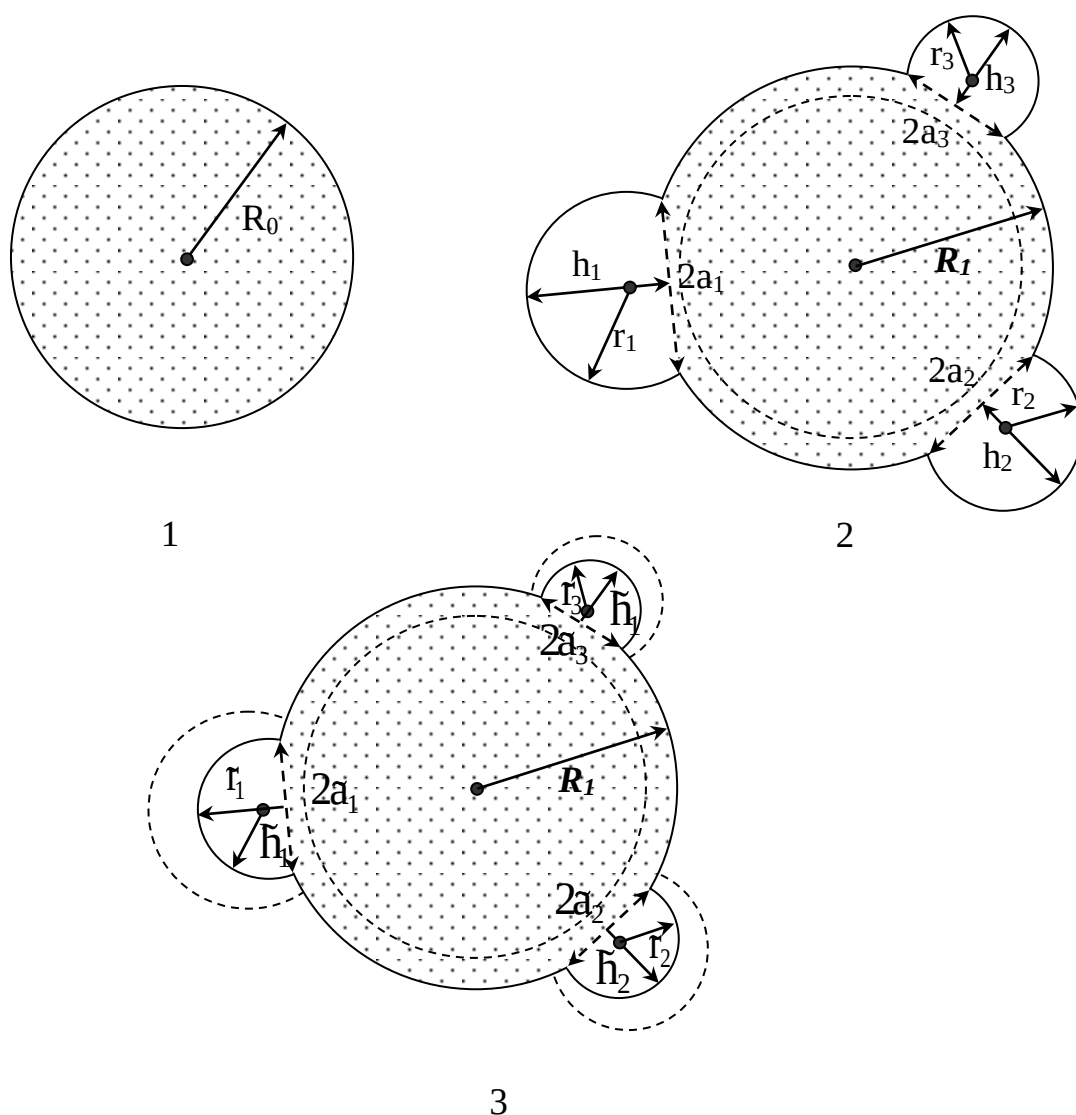


Рис. 7.15. Схематическое изображение образования мембранных пузырей при регидратации: 1 – гепатоцит в исходном растворе; 2 – гепатоцит в условиях регидратации до разрыва мембранного пузыря; 3 – гепатоцит в условиях регидратации после разрыва мембранного пузыря.

содержимого геометрические параметры “остаточного” пузыря уменьшаются, но его форма (сферический сегмент) остается неизменной. В расчетах были использованы следующие геометрические параметры клеток: R_0 – радиус гепатоцита в исходном состоянии (рис. 7.15, 1); h_i , a_i и r_i – высота, радиус основания и радиус образовавшегося при регидратации i -го пузыря (рис. 7.15, 2); $\tilde{h}_i$, $\tilde{a}_i$ и $\tilde{r}_i$ – высота, радиус основания и радиус “остаточного” пузыря (рис. 7.15, 3); R_1 – радиус не отслоившейся от цитоматрикса части мембраны в момент ее разрыва (рис. 7.15, 3).

Пусть суспензия из N клеток, объем которой равен V_c , смешивается с гипертоническим раствором, содержащим проникающее и не проникающее в клетки вещества, объем которого равен V_p . Отношение объема клеточной суспензии к объему гипертонического раствора V_c/V_p обозначим через Φ_0 . Пусть также N_{p0}^{in} и N_{p0}^{out} – количество молей непроникающих через клеточную мембрану веществ внутри и вне клетки соответственно в исходной клеточной суспензии, а N_p и N_s – количество молей не проникающего и проникающего в клетки растворенного вещества в гипертоническом растворе, который добавляется к клеткам. Обозначим через V_0 объем клетки в исходной клеточной суспензии, через g_0 – отношение суммарного объема клеток NV_0 к суммарному объему клеточной суспензии V_c и через V_n – объем осмотически неактивных внутриклеточных веществ. Тогда в исходной клеточной суспензии концентрация не проникающих через клеточную мембрану веществ внутри клетки равна

$$\pi_{p0}^{\text{in}} = \frac{N_{p0}^{\text{in}}}{V_0 - V_n}, \text{ а концентрация не проникающих через клеточную мембрану}$$

$$\text{веществ вне клетки равна } \pi_{p0}^{\text{out}} = \frac{N_{p0}^{\text{out}}}{V_c - NV_0} = \frac{N_{p0}^{\text{out}}}{V_c - g_0 V_c} = \frac{N_{p0}^{\text{out}}}{\Phi_0 V_p (1 - g_0)}.$$

При этом в исходной клеточной суспензии $\pi_{p0}^{\text{in}} = \pi_{p0}^{\text{out}}$. Очевидно, что $N_p = n_p V_p$ и $N_s = n_s V_p$,

где n_p и n_s – концентрация не проникающего и проникающего растворенных веществ в гипертоническом растворе, который смешивается с клеточной

суспензией.

После смешения клеточной суспензии с гипертоническим раствором по истечении достаточно большого промежутка времени (в нашем случае 30 мин) концентрации проникающего в клетки растворенного вещества вне и внутри клеток становятся равными друг другу, то есть

$$n_{sl}^{in} = n_{sl}^{out} = \frac{N_s}{V_c + V_p - NV_n} = \frac{N_s}{V_p(1 + \Phi_0 - g_0\alpha\Phi_0)} = \frac{n_s}{1 + \Phi_0 - g_0\alpha\Phi_0},$$

где α – объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ в исходной клеточной суспензии.

Внутриклеточная концентрация не проникающих через клеточную мембрану веществ, очевидно, становится равной

$$n_{pl}^{in} = \frac{N_{p0}^{in}}{V_1 - V_n} = n_{p0}^{in} \frac{V_0 - V_n}{V_1 - V_n} = n_{p0}^{in} \frac{1 - \alpha}{y_1 - \alpha},$$

где V_1 – объем клетки, который она достигает после истечения достаточно большого промежутка времени в смеси клеточной суспензии с гипертоническим раствором, $y_1 = V_1/V_0$ – относительный объем клетки в этом же состоянии. Суммарная внеклеточная концентрация не проникающих в клетки растворенных веществ в том же состоянии, очевидно, равна

$$n_{pl}^{out} = \frac{N_{p0}^{out} + N_p}{V_c + V_p - NV_1} = \frac{n_{p0}^{in}\Phi_0 V_p(1 - g_0) + n_p V_p}{V_p + \Phi_0 V_p - g_0\Phi_0 V_p y_1} = \frac{n_{p0}^{in}\Phi_0(1 - g_0) + n_p}{1 + \Phi_0 - g_0\Phi_0 y_1}.$$

Поскольку в рассматриваемом состоянии $n_{pl}^{in} = n_{pl}^{out}$, получаем

$$n_{p0}^{in} \frac{1 - \alpha}{y_1 - \alpha} = \frac{n_{p0}^{in}\Phi_0(1 - g_0) + n_p}{1 + \Phi_0 - g_0\Phi_0 y_1},$$

откуда следует:

$$y_1 = \frac{(1+\Phi_0)(1-\alpha) + \alpha[\Phi_0(1-g_0) + \hat{n}_p]}{\Phi_0(1-g_0) + (1-\alpha)g_0\Phi_0 + \hat{n}_p}.$$

Если после достаточно продолжительной выдержки клеток в указанном выше гипертоническом растворе развести клеточную суспензию дистиллированной водой в соотношении $\frac{V_c + V_p}{V_d} = \frac{1}{Q}$, где V_d – объем добавляемой к клеточной суспензии дистиллированной воды, то по истечении небольшого промежутка времени за счет быстрого притока воды в клетки трансмембранный перепад суммарного осмотического давления растворенных внутри (RTn_{p2}^{in}) и вне клеток (RTn_{p2}^{out}) веществ уравнивается трансмембранным перепадом гидростатического давления Δp , то есть

$$P_b - P_a = \pi_b - \pi^{out} \quad (7.1)$$

где P_b и π_b – гидростатическое и осмотическое давление раствора внутри пузыря, P_a – атмосферное давление, π^{out} – осмотическое давление внеклеточного раствора. Это приводит к условию

$$\frac{\frac{\hat{n}_s}{1+\Phi_0 - g_0\alpha\Phi_0}(y_1 - \alpha) + (1-\alpha)}{y_2 - \alpha} - \frac{\hat{n}_s(1+\Phi_0 - g_0\Phi_0 y_1) + \Phi_0(1-g_0) + \hat{n}_p}{(1+Q)(1+\Phi_0) - g_0\Phi_0 y_2} = \frac{\Delta p}{RTn_{p0}^{in}}$$

где $y_2 = V_2/V_0$, V_2 – объем клетки, который она достигает после небольшого промежутка времени с момента добавления к клеточной суспензии дистиллированной воды (рис. 7.15, 2), $\hat{n}_s = \frac{n_s}{n_{p0}^{in}}$ и $\hat{n}_p = \frac{n_p}{n_{p0}^{in}}$.

Как известно из теории упругости [427], перепад гидростатического давления на мембране $\Delta P = P_b - P_a$ связан с изотропным натяжением клеточной

мембраны в области i -го пузыря σ_{bi} соотношением:

$$\Delta P = \frac{2\sigma_{bi}}{r_i} \quad (7.2)$$

где r_i – радиус пузыря. Таким образом,

$$\pi_b - \pi^{out} = \frac{2\sigma_{bi}}{r_i} \quad (7.3)$$

По закону Гука

$$\sigma_{bi} = \Gamma \frac{S_i - S_1}{S_1} \quad (7.4)$$

где Γ – модуль изотропного растяжения клеточной мембраны, S_i – площадь поверхности мембраны в области i -го пузыря, S_1 – площадь поверхности мембраны ограничивающей i -й пузырь в недеформированном состоянии, то есть площадь “остаточного” пузыря. Из (7.1)–(7.4) получаем:

$$\Gamma \frac{S_i - S_1}{S_1} = \frac{r_i}{2} (\pi_b - \pi^{out}) \quad (7.5)$$

Воспользовавшись известными формулами для площади поверхности шарового сегмента $S = 2\pi rh = \pi(a^2 + h^2)$ и его объема $V = \frac{1}{3}\pi r^2(3r - h) = \frac{\pi}{6}h(3a^2 + h^2)$, где r – радиус шара, h – высота сегмента, a – радиус его основания, можно определить объем гепатоцита с образовавшимися на нем пузырями:

$$y_2 = \frac{V_2}{V_0} = \left\{ \frac{4}{3}\pi R_1^3 - \sum_{i=1}^n \frac{\pi}{3} \left(R_1 \pm \sqrt{R_1^2 - a_i^2} \right)^2 \left(2R_1 \mp \sqrt{R_1^2 - a_i^2} \right) + \sum_{i=1}^n \frac{\pi}{6} h_i (3a_i^2 + h_i^2) \right\} \frac{1}{\frac{4}{3}\pi R_0^3}, \quad (7.6)$$

где верхние знаки соответствуют случаю $r_i \leq h_i$, а нижние – случаю $h_i \leq r_i$, и с учетом предшествующих формул получаем:

$$\frac{\Gamma_i}{R_0 R T n_{p0}^{\text{in}}} = \frac{1}{2} \frac{a_i^2 + h_i^2}{2 h_i R_0} \frac{S_1}{S_1 - \tilde{S}_1} \times$$

$$\times \left\{ \frac{\frac{\hat{n}_s}{1 + \Phi_0 - g_0 \alpha \Phi_0} (y_1 - \alpha) + (1 - \alpha)}{y_2 - \alpha} - \frac{\hat{n}_s (1 + \Phi_0 - g_0 \Phi_0 y_1) + \Phi_0 (1 - g_0) + \hat{n}_p}{(1 + Q)(1 + \Phi_0) - g_0 \Phi_0 y_2} \right\}, (7.7)$$

где $S_1 = \pi(a_i^2 + h_i^2)$ и $\tilde{S}_1 = \pi(\tilde{a}_i^2 + \tilde{h}_i^2)$, R – универсальная газовая постоянная.

Экспериментально наблюдаемому случаю представленному на рис. 7.14, 7-9 и схематически изображенному на рис 7.15 соответствуют следующие значения фигурирующих в (7.7) величин: $R_0 = 10$ мкм, $R_1 = 12,4$ мкм, $h_1 = 3,5$ мкм, $a_1 = 2,3$ мкм, $h_2 = 2,8$ мкм, $a_2 = 1,4$ мкм, $h_3 = 2$ мкм, $a_3 = 1,4$ мкм, $\tilde{h}_1 = 2,5$ мкм, $\tilde{a}_1 = 1,6$ мкм, $\tilde{h}_2 = 2$ мкм, $\tilde{a}_2 = 1$ мкм, $\tilde{h}_3 = 1,5$ мкм, $\tilde{a}_3 = 0,85$ мкм, $\hat{n}_s = 10$, $\hat{n}_p = 1,25$, $\Phi_0 = 0,5$, $g_0 = 0,5$, $\alpha = 0,3$, $Q = 2,5$. Относительное изменение площади мембраны в области первого пузыря $\frac{S_1 - \tilde{S}_1}{S_1}$ составляет 0,991, в области второго пузыря

$\frac{S_2 - \tilde{S}_2}{S_2} = 0,96$, в области третьего пузыря $\frac{S_3 - \tilde{S}_3}{S_3} = 1$. Таким образом, при

изотропном растяжении мембраны гепатоцита крысы до момента разрушения мембраны площадь ее поверхности в рассматриваемом случае увеличивается на 100 и более процентов, что хорошо иллюстрирует рис. 7.11, рис. 7.12, 14 в случае полного отслоения мембраны от цитоматрикса при трехкратном ступенчатом разведении суспензии клеток после насыщения клеток 2,10 М раствором ДМСО.

Значения модуля изотропного растяжения мембраны гепатоцита крыс рассчитанные по формуле (7.7) для области первого, второго и третьего пузыря соответственно составляют 0,01 Н/м, 0,0076 Н/м, 0,0062 Н/м. Среднее значение модуля изотропного растяжения мембраны равно 0,008 Н/м, то есть имеет аномально низкое значение и примерно в 50 раз меньше значения модуля изотропного растяжения мембраны эритроцита человека ($\Gamma = 0,4$ Н/м [355, 367]). Аномально низкое значение модуля упругости мембран гепатоцитов крыс

свидетельствует о способности данных клеток испытывать значительные трансмембранные перепады осмотического давления и деформации при эндоцитозе без повреждения мембран.

При достаточно большом растяжении мембраны гепатоцита $\Delta S/S_0$ через образовавшуюся квазиравновесную пору из клетки выбрасывается часть внутриклеточного содержимого, в результате чего площадь мембраны клетки и её объем уменьшаются. Размер таких пор определяется величиной критического растяжения мембраны и отвечает минимуму свободной энергии напряженной мембраны с квазиравновесной порой [470]. В отличие от эритроцитов человека и крупных лецитиновых везикул (0,75 мкм), для которых образование макроскопического разрыва наступает немедленно после растяжения их мембран всего лишь на 4% и 2-3%, соответственно [457–460, 470], для образования такого разрыва в мембране гепатоцита крысы ее площадь должна увеличиться более чем на 100%. При этом сразу же следует отбросить предположение о том, что в исходном интактном гепатоците часть клеточной поверхности спрятана в микроскладках, поскольку площадь изолированной мембраны можно с большой точностью отождествить с площадью мембранного пузыря или мембраны в целом сразу же после выброса из клетки части внутриклеточного содержимого (рис. 7.8, 3, 4, рис. 7.12, 14, рис. 7.14, 7-8), когда складчатость мембраны явно отсутствует. Данное представление вполне соответствует морфологическим характеристикам гепатоцитов. Известно [476], что клетки печени *in situ* имеют три границы контактов. После же изоляции все участки клеточной поверхности имеют одинаковое окружение и через 30 мин гепатоциты становятся более округлыми, а их клеточная поверхность однородной.

7.3. Проницаемость плазматических мембран гепатоцитов крыс для молекул воды и диметилсульфоксида

Феноменологическое описание пассивного транспорта воды и

проникающих через клеточную мембрану веществ основывается на методах термодинамики необратимых процессов – подхода разработанного Kedem О. и Katchalsky А. [180, 181] и модифицированного в приложении к криобиологическим задачам Е. А. Гордиенко [5]. В этой физико-математической модели процессы массопереноса через клеточные мембраны при наличии одного проникающего вещества и $n-1$ непроникающих веществ описываются системой уравнений:

$$\frac{dV}{dt} = SL_p \left(\sigma_1 \Delta \pi_1 + \sum_{k=2}^n \Delta \pi_k - \Delta p \right) \quad (7.8)$$

$$\frac{d\pi_1^{in}}{dt} = - \left[\gamma k_1 \Delta \pi_1 - \sigma_1 \pi_1^{in} \frac{dV}{dt} \right] \frac{1}{y - \alpha} \quad (7.9)$$

$$\pi_k^{in} = \frac{\pi_k^{in}(0)(1 - \alpha)}{y - \alpha}, \quad (7.10)$$

где L_p – коэффициент фильтрации или гидравлическая проницаемость; k_1 – коэффициент проницаемости клеточной мембраны для проникающего вещества; σ_1 – коэффициент отражения для проникающего через мембрану вещества; $\Delta \pi_1 = \pi_1^{in} - \pi_1^{out}$, где π_1^{out} и π_1^{in} – осмотическое давление проникающего, вещества вне и внутри клетки, соответственно; $\Delta \pi_k$ – ($k=2, \dots, n$) – трансмембранная разность осмотических давлений k -го (непроникающего через мембрану) вещества; $\gamma = S/V_0$ – поверхностно-объемное отношение клетки; V_0 – начальный объем клетки; $\pi_k^{in}(0)$ – начальное значение осмотического давления k -го непроникающего внутриклеточного вещества; α – объемная доля осмотически неактивных веществ внутри клетки; $y = V/V_0$ – относительный объем клетки.

При уменьшении объема клетки плазматической мембране энергетически выгоднее деформироваться путем изгиба, а не растяжения или сжатия в связи с тем, что при деформациях изгиба площадь поверхности мембраны клеток остается неизменной, а возникающий перепад давления на ней ничтожно мал по

сравнению с перепадом давления, возникающем при растяжении мембраны. Поэтому перепадом давления на мембране Δp пренебрегают.

Переход к безразмерным величинам приводит уравнения (7.8–7.10) к виду:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left(\sigma_1 (\hat{\pi}_1^{in} - \hat{\pi}_1^{out}) - \hat{\pi}_k^{out} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} \right) \quad (7.11)$$

$$\frac{d\hat{\pi}_1^{in}}{dt} = -\frac{1}{\tau_1} \left[(\hat{\pi}_1^{in} - \hat{\pi}_1^{out}) + \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} \frac{dy}{dt} \right] / (y-\alpha) \quad (7.12)$$

$$\hat{\pi}_k^{in} = \hat{\pi}_k^{in}(0) \left(\frac{1-\alpha}{y-\alpha} \right), \quad k=2, \dots, n, \quad (7.13)$$

где $\tau_0 = \frac{1}{L_p \gamma \pi_0^{in}}$; $\tau_1 = \frac{1}{k_p \gamma}$; π_0^{in} – осмотическое давление изотонического раствора (7,8 атм); $\hat{\pi}_1^{in} = \pi_1^{in} / \pi_0^{in}$; $\hat{\pi}_1^{out} = \pi_1^{out} / \pi_0^{in}$ – приведенные осмотические давления.

При определении транспортных характеристик L_p и k_p система уравнений (7.11–7.13) решалась методом Рунге-Кутты с использованием разработанной компьютерной программы. Варьированием параметров τ_0 и τ_1 при фиксированных значениях σ и α добивались максимального совпадения численного решения системы уравнений и экспериментальной кривой $y(t)$.

Феноменологические коэффициенты α и σ , входящие в аналитические уравнения, являются важными характеристиками клетки, определяющими их осмотическое поведение. Осмотически неактивный объем α представляет собой объемную долю внутриклеточных веществ, которые не могут покинуть клетку без повреждения мембраны. К таким веществам относятся биологические макромолекулы (нуклеиновые кислоты, белки, пептиды), мембранные структуры, структурные элементы цитоскелета, связанная вода. Коэффициент отражения σ характеризует избирательность мембраны, т.е. отношение проницаемости растворенного вещества по отношению к растворителю, и изменяется в пределах $0 \leq \sigma \leq 1$. Для идеальной полупроницаемой мембраны $\sigma = 1$ (мембрана проницаема

только для воды и полностью не проницаема для растворенных веществ); $0 < \sigma < 1$ – растворенное вещество проникает в клетку, но медленнее, чем вода; $\sigma = 0$ – предельный случай, когда мембрана не селективна, и вода и криопротекторные вещества движутся с эквивалентной скоростью и имеется сверхфльтрационный эффект [255].

Коэффициент фильтрации L_p может быть рассчитан из экспериментальных данных при изучении кинетики изменения клеточного объема в неизотонических растворах различных непроникающих веществ. В этом случае $k_1 = 0$, $\sigma = 1$, система уравнений (7.11–7.13) упрощается и изменение относительного объема клетки при контакте с гипертоническими растворами непроникающего в клетки вещества описывается дифференциальным уравнением:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left[\frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \hat{\pi}_1^{at} \right] \quad (7.14)$$

В силу закона сохранения массы число молей растворенного вне клетки вещества с течением времени не меняется. Поэтому

$$\hat{\pi}_1^{at} = \hat{\pi}_1^{at}(0) \frac{1-g}{y-g}, \quad (7.15)$$

где $\hat{\pi}_1^{out}(0)$ – начальное значение приведенного осмотического давления внеклеточного раствора, а g_0 – отношение суммарного объема клеток к объему всего образца в начальный момент времени.

Если $\hat{\pi}_1^{out}(0) > 0$, то в процессе экспозиции клеток в гипертонической среде их относительный объем достигает минимальных значений y_{min} и с теоретической точки зрения должен оставаться в дальнейшем неизменным. Очевидно, что на этой стационарной фазе выполняется равенство:

$$\frac{1-\alpha}{y_{min}-\alpha} - \hat{\pi}_1^{at}(0) \frac{1-g}{y_{min}-g} = 0 \quad (7.16)$$

откуда

$$\alpha = \frac{\hat{\pi}_1^{at}(0)y_{\min}(1-g_0) - y_{\min} + g_0}{\hat{\pi}_1^{at}(0)(1-g_0) - y_{\min} + g_0} \quad (7.17)$$

При бесконечном разведении ($g_0 \rightarrow 0$)

$$\alpha = \frac{y_{\min} [\hat{\pi}_1^{at}(0) - 1]}{\hat{\pi}_1^{at}(0) - y_{\min}} \quad (7.18)$$

Поскольку фигурирующие в правой части равенства (7.18) величины либо задаются, либо определяются экспериментально, формула (7.18) позволяет вычислить объемную долю осмотически неактивных внутриклеточных веществ. Экспериментально, при условии, что клетки ведут себя как идеальные осмометры, т.е. осмотическое изменение клеточного объема подчиняется закону Бойля Вант-Гоффа

$$\frac{V}{V_0} = \frac{\pi_0}{\pi} \left(1 - \frac{\alpha}{V_0} \right) + \frac{\alpha}{V_0},$$

(где V – объем клетки при осмолярности π , V_0 – объем клетки в изотонических условиях с осмолярностью π_0), осмотически неактивный объем определяется из графической зависимости $V/V_0 = f(\pi_0/\pi)$, как длина отрезка, отсекаемого прямой на оси ординат, что соответствует величине α/V_0 .

Численное решение уравнения (7.14) с учетом уравнения (7.15) позволяет, варьируя параметры τ_0 и α , подобрать такие их значения, при которых теоретическая кривая изменения относительного объема клеток совпадает с экспериментально определяемой зависимостью $y(t)$ при обезвоживании, и тем самым определить эти параметры. Коэффициент фильтрации клеточной мембраны L_p рассчитывается из соотношения $\tau_0 \equiv [\gamma L_p \pi^{at}]^{-1}$, так как значение π^{out} известно, а поверхностно-объемное отношение γ определяется экспериментально из соотношения $S_0/V_0 = 6/D$, где D – диаметр клетки, в частности для гепатоцита $\gamma = 3,3 \times 10^5 \text{ м}^{-1}$.

Нами коэффициенты проницаемости плазматических мембран гепатоцитов

крыс для молекул воды были определены при температуре 24°C с использованием гипертонических растворов NaCl в концентрации 0,34, 0,85, 3,42 М, приготовленных на среде суспендирования клеток, осмолярность которых приведена в табл. 7.2 [477–479]. рН = 7,4. Исследования проведены непосредственно на столике светового микроскопа в специальной камере.

Таблица 7.2

Осмолярность (π^{out}) гипертонических растворов хлорида натрия.

Реагенты	Среда суспендирования	0,34 М NaCl	0,85 М NaCl	3,42 М NaCl
Осмолярность, мОсм/л	364	1087	2246	6636
Приведенное осмотическое давление, $\hat{\pi}^{out}$	1,16	3,44	7,11	21,00

Анализ экспериментальных кривых изменения относительного объема гепатоцитов крыс (рис. 7.16) показал, что реакция клеток на изменение внеклеточной гипертоничности состоит из трех фаз: быстрой фазы обезвоживания, фазы стабилизации обезвоженного состояния (Lag-фаза) и фазы разрушения клеток. Длительность Lag-фазы определялась устойчивостью клеток

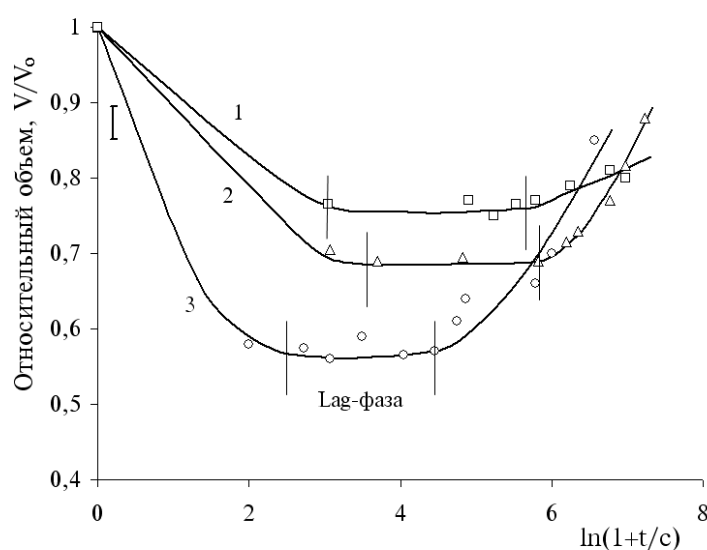


Рис. 7.16. Кинетика изменения относительного объема гепатоцитов крыс в гипертонических растворах NaCl: 1 – 0,34 М, 2 – 0,85 М, 3 – 3,42 М.

к величине гипертонического воздействия. При осмолярности внеклеточного раствора равном 1087 мОсм/л длительность Lag-фазы в среднем составляла около 240 с. При возрастании внеклеточной гипертоничности длительность Lag-фазы закономерно уменьшалась и при внеклеточной осмолярности равной 2246 и 6636 мОсм/л составляла 150 с и 90 с, соответственно. По-видимому, на стадии стабилизации дегидратированного состояния гепатоцитов за счет прямого химического действия высоких концентраций электролита полупроницаемость мембраны клеток нарушается, в результате чего в норме не проникающий в клетку хлористый натрий начинает входить в клетку, повреждая внутриклеточные структуры. Вполне вероятно, что при таком воздействии на цитоматрикс возможна фрагментация белковых молекул протеолитическими ферментами, которые высвобождаются из разрушенных лизосом. Кроме того, в раствор могут переходить вещества, ранее связанные с мембранами или сосредоточенные в изолированных компартаментах клеток [480]. В результате этого увеличивается эффективная внутриклеточная концентрация осмотически активных веществ, и параллельно с хлоридом натрия в клетку поступает вода, что и вызывает увеличение объема гепатоцитов. Отсутствие активной осмотической реакции при повторных гипертонических воздействиях на клетки 3,42 М раствором NaCl после их набухания действительно свидетельствовало о потере полупроницаемого свойства плазматических мембран гепатоцитов крыс при первичном гипертоническом воздействии соли.

Морфологически повреждение гепатоцитов характеризовалось разрыхлением, грануляцией, фрагментацией цитоматрикса и контрастированием ядер, обусловленным просветлением цитоплазмы вокруг ядра и как бы ее “сползанием” (рис. 7.17, 5, рис. 7.18, 4). При воздействии 0,85 М раствора NaCl четко выраженное контрастирование ядер отмечалось к 3 мин реакции, а при воздействии 3,42 М раствора NaCl этот эффект наблюдался уже к 2,5 мин. Следующим этапом развития стрессовой морфологии гепатоцитов являлось отслоение мембраны от цитоматрикса, о чем свидетельствовал уже упоминавшийся ранее эффект “вскипания” мембраны – формирование

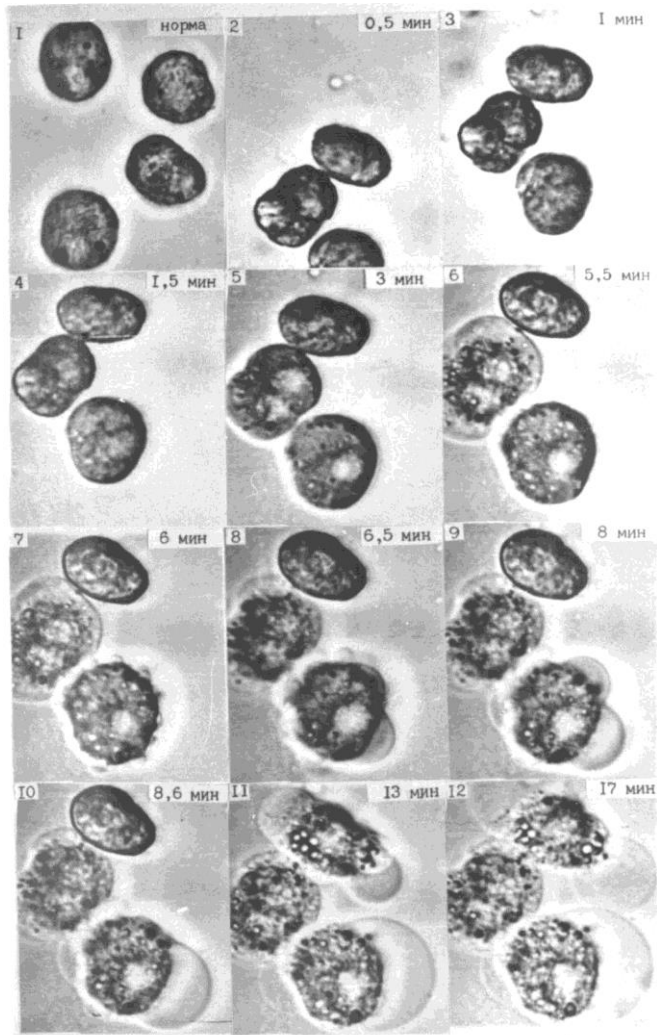


Рис. 7.17. Кинетика морфологической реакции гепатоцитов крысы на введение 0,85 М раствора NaCl. Ув. $\times 200$.

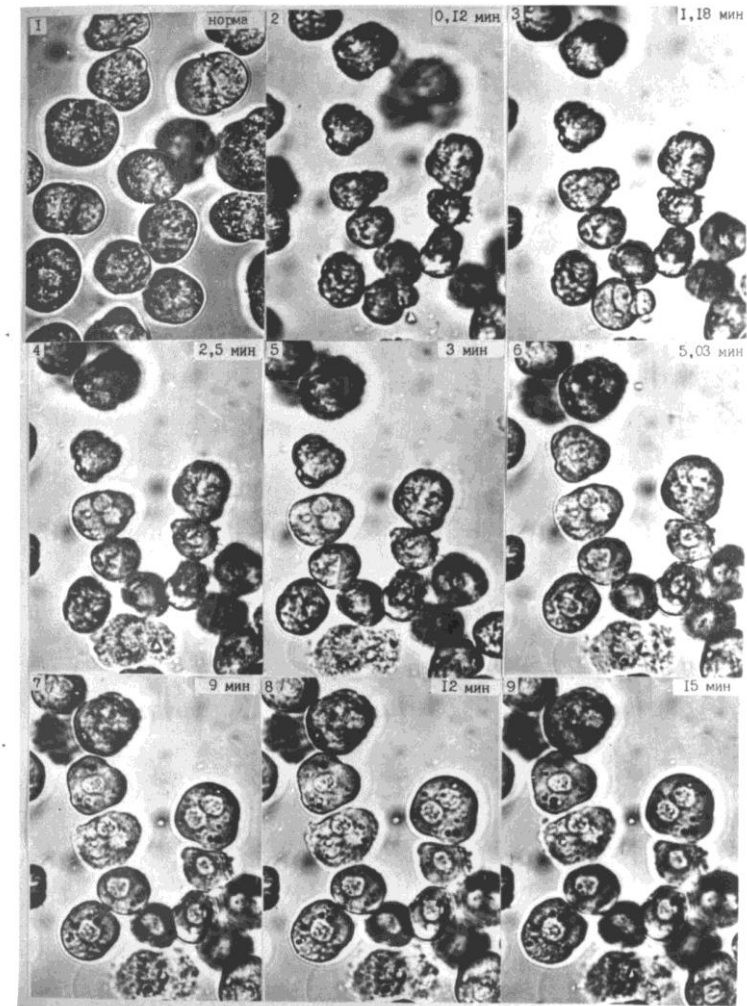


Рис. 7.18. Кинетика морфологической реакции гепатоцитов крысы на введение 3,42 М раствора NaCl. Ув. $\times 200$.

многочисленных локальных пузырей (рис. 7.17, 7). В дальнейшем наблюдалось увеличение пузырей в размере и их слияние (рис. 7.17, 9, 10).

На рис. 7.19 представлен график изменения клеточного объема гепатоцитов крыс в координатах Бойля Вант-Гоффа, из которого следует, что на этапе дегидратации в интервале исследованной гипертоничности среды гепатоциты ведут себя как идеальные осмометры: имеет место линейная регрессия и осмотически неактивный объем составляет 0,382.

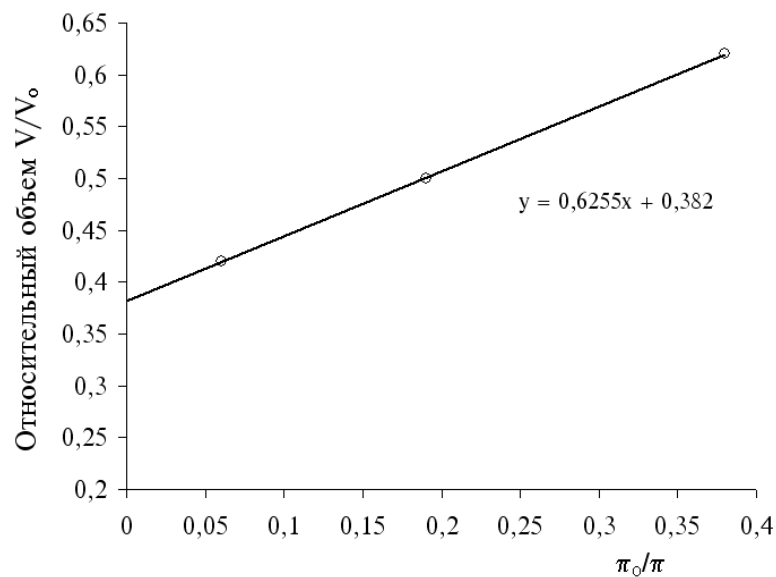


Рис. 7.19. График в координатах Бойля Вант-Гоффа для изолированных гепатоцитов крыс.

В табл. 7.3 приведены экспериментально полученные данные ($S_{c,0}$, $S_{c,min}$, y_{min} , $\frac{\Delta S_c}{\Delta t}$, $\frac{S_{c,min}}{S_{c,0}}$), а также аналитически рассчитанные численные значения клеточных параметров (L_p , α) при заданных условиях (π^{out}). Как следует из данных таблицы при максимальном обезвоживании гепатоцитов расчетная объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ $\alpha = 0,392 \pm 0,027$ практически совпадает с определенной графически. Значения L_p , приведенные в табл. 7.3, свидетельствуют о высокой проницаемости мембран

Таблица 7.3

Экспериментальные и аналитически рассчитанные характеристики клеток.

Осмотическое давление внеклеточного раствора π_1^{out} , (мОсм/л)	Среднее значение исходной площади клетки $S_{c,0}$ 10^{-3} мм^2	Среднее значение минимальной площади клетки $S_{c,\text{min}}$, 10^{-3} мм^2	Относительный минимальный объем клетки y_{min}	Скорость изменения площади клетки $\frac{\Delta S_c}{\Delta t}$, $10^{-6} \text{ мм}^2/\text{с}$	Относительная минимальная площадь клетки $\frac{S_{c,\text{min}}}{S_{c,0}}$	Коэффициент фильтрации L_p , $10^{-11} \text{ м}^3/\text{Нс}$	Осмотически неактивный объем клетки, α
1087	$0,291 \pm 0,038$ n=8	$0,221 \pm 0,027$	$0,625 \pm 0,033$	$4,47 \pm 0,83$	$0,76 \pm 0,02$	$2,17 \pm 0,43^1$	$0,471 \pm 0,023$
2246	$0,282 \pm 0,060$ n=12	$0,193 \pm 0,038$	$0,509 \pm 0,046$	$7,06 \pm 2,09$	$0,68 \pm 0,04$	$2,25 \pm 0,25^2$	$0,428 \pm 0,031$
6636	$0,274 \pm 0,049$ n=9	$0,170 \pm 0,040$	$0,421 \pm 0,043$	$8,62 \pm 1,34$	$0,62 \pm 0,05$	$3,05 \pm 0,09$	$0,392 \pm 0,027$

Примечание: различия между значениями для скорости изменения площади клетки статистически достоверны ($P > 0,95$);

^{1,2} – различия между значениями для L_p статистически недостоверны ($P < 0,95$), различия между другими вариациями сравнения значений статистически достоверны ($P > 0,999$); различия между значениями для α статистически достоверны ($P > 0,99$).

изолированных гепатоцитов крыс для молекул воды. Это согласуется с результатами работы [481], в которой были измерены диффузионные коэффициенты проницаемости изолированных гепатоцитов крыс для радиоактивно меченых молекул воды и неэлектролитов. Как считают авторы работы [481], повышенная проницаемость плазматических мембран изолированных гепатоцитов крыс может быть обусловлена наличием в их мембранах водных пор, эффективный диаметр которых составляет 8-12 Å. Как следует из данных табл. 7.3 гидравлическая проницаемость плазматических мембран гепатоцитов изменяется как функция осмотического градиента. В работе [51] высказана гипотеза, в соответствии с которой при условии вынужденного быстрого потока воды в плазматической мембране формируются осмотические, поры, которые обеспечивают альтернативный путь движения воды, что вполне вероятно. Однако, увеличение скорости обезвоживания при возрастании осмотического давления может явиться одной из причин повреждения клеточной мембраны за счет развиваемых на ней значительных осмотических градиентов при выравнивании химических потенциалов вне- и внутри клетки и возрастающего сопротивления мембраны водному потоку.

При определении коэффициента проницаемости мембран изолированных гепатоцитов крыс для молекул ДМСО k_p были использованы кинетические кривые изменения клеточного объема, полученные при насыщении клеток различной концентрацией данного криопротектора (см. п.7.1.). В случае присутствия во внеклеточной среде криопротекторов, проникающих через клеточную мембрану, потоки воды и криопротектора являются сопряженными [482]. Величина каждого из этих потоков зависит от степени взаимодействия между ними, как на этапе дегидратации, так и на этапе проникновения в клетку криопротектора. Поэтому коэффициент фильтрации L_p определяемый на этапе обезвоживания клеток в присутствии проникающих веществ может отличаться от значения, определенного для случая непроникающих веществ. В связи с этим коэффициент проницаемости k_p для молекул проникающих веществ корректно определять последовательно путем поэтапной подгонки экспериментальных и

теоретических кривых изменения клеточного объема.

При аппроксимации экспериментальных зависимостей изменения клеточного объема гепатоцитов крыс в растворах ДМСО различной концентрации теоретическими сначала мы определяли коэффициент фильтрации L_p на этапе дегидратации клеток, и затем полученное значение использовали при определении k_p на этапе восстановления клеточного объема, добиваясь максимального совпадения кривых на этом участке. В расчетах коэффициент отражения σ принимался равным 0,95, а значение осмотически неактивного объема – определенное нами выше значение $\alpha = 0,39$.

На рис. 7.20 приведен наиболее характерный график изменения относительной площади гепатоцитов крыс в гипертонических растворах ДМСО.

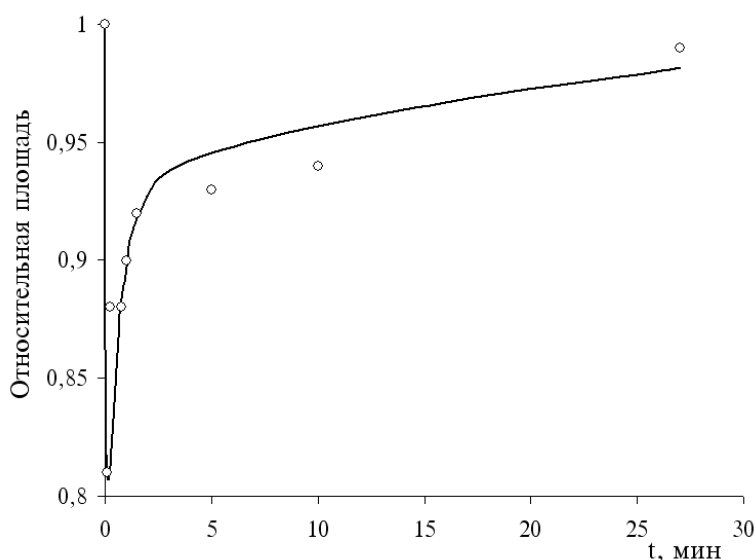


Рис. 7.20. Кинетика изменения относительной площади гепатоцитов крыс в 2,10 М растворе ДМСО (2250 мОсм/л).

Время дегидратации гепатоцитов в растворах ДМСО различной осмолярности (см. табл. 7.1) составляло не более 15 с, а минимальный объем клеток при максимальной гипертоничности среды достигал уровня $0,74V_0$.

Как показал анализ кинетических кривых, начальная фаза увеличения клеточного объема гепатоцитов крыс после дегидратации носит довольно быстрый характер и составляет в среднем до 250 с, после чего следует

замедление процесса. По-видимому, это может быть обусловлено выравниванием термодинамических потенциалов вне – и внутри клетки на начальной фазе за счет активного поступления основной массы ДМСО в клетку. В работе [483] было установлено, что в клетках костного мозга мыши и клетках кордовой крови человека в 1 М растворе ДМСО 90% концентрация криопротектора достигается уже к 200 с и 130 с соответственно. Это позволяет считать, что максимальное совпадение теоретической и экспериментальной кривых в области быстро восходящей ветви экспериментальной кривой восстановления клеточного объема соответствует наиболее адекватному значению коэффициента проницаемости.

В табл. 7.4 приведены полученные нами значения коэффициента фильтрации L_p и коэффициента проницаемости k_p для молекул ДМСО. Как следует из данных таблицы, оба коэффициента увеличиваются при возрастании осмотического градиента. Сравнение коэффициентов фильтрации L_p в условиях

Таблица 7.4

Транспортные характеристики плазматических мембран изолированных гепатоцитов крыс в растворах ДМСО.

Осмолярность растворов ДМСО, мОсм/л	Коэффициент фильтрации L_p , 10^{-14} м ³ /Нс	Коэффициент проницаемости k_p , 10^{-7} м/с
580 (n=16)	3,85±0,036 ¹	1,11±0,105
970 (n=26)	4,03±0,027 ²	1,85±0,125 ³
2250 (n=20)	4,45±0,040	2,04±0,188
2890 (n=25)	4,98±0,038	1,79±0,138 ⁴

Примечание: ^{1,2 и 3,4} – различия между значениями в столбцах статистически недостоверны ($P < 0,95$); различия между другими вариациями сравнения значений в столбцах статистически достоверны ($P > 0,999$).

близких осмотических внеклеточных нагрузок, вызванных NaCl (2246 мОсм/л, табл. 7.3) и ДМСО (2250 мОсм/л, табл. 7.4), показывает, что коэффициент

филтрации L_p в присутствии проникающего криопротектора на три порядка ниже, чем в случае соли. Вероятнее всего это может быть обусловлено именно наличием встречных потоков воды и криопротектора уже на этапе дегидратации.

Коэффициент проницаемости плазматических мембран гепатоцитов крыс k_p для молекул ДМСО значительно превосходит коэффициент проницаемости мембран кроветворных клеток предшественников эмбриональной печени человека $C34^+ CD38^-$, который согласно данным работы [484] в интервале температур 22–25°C составляет только $k_p = (0,36 \pm 0,05) 10^{-7} \text{м/с}$. В тоже время значения гидравлической проницаемости для данных типов клеток достаточно близки ($C34^+ CD38^-$ клеток ЭПЧ $L_p = (4,6 \pm 0,03) 10^{-14} \text{м}^3/\text{Нс}$ [484]).

Считается, что диффузия гидрофильных молекул через липидную фазу мембраны может происходить через динамические поры, существование которых обусловлено тепловыми флуктуациями и дефектами упаковки липидов [485]. Однако низкомолекулярные гидрофильные вещества проникают через липидный слой чрезвычайно медленно, а макромолекулы из-за большой плотности упаковки молекул липидов и наличия в бислой гидрофобной зоны не проникают через него вообще. Для гидрофобных же веществ, обладающих хорошей липидорастворимостью, липидный бислой является низким барьером и эти вещества относительно легко диффундируют через него. Способность веществ растворяться в липидах характеризуется коэффициентом их распределения в системе вода-гидрофобная фаза. Однако имеющиеся данные свидетельствуют лишь о качественной корреляции между коэффициентом распределения и коэффициентом проницаемости мембран для довольно широкого ряда липофильных веществ. Зависимость проницаемости от коэффициентов распределения приближается к линейной, если вводится поправка на размеры молекул [486, 487]. Кроме того, несомненно, важную роль играет форма проникающей молекулы: при одинаковых липидорастворимости и молекулярных массах проницаемость ниже для молекул, имеющих разветвленную структуру [355].

ДМСО обладает повышенной гидрофобностью: коэффициент его

распределения в системе п-этанол-вода равен 0,247 [488, 489] (для сравнения коэффициенты распределения этиленгликоля и 1,2 - пропандиола составляют 0,040 и 0,076, соответственно [488, 489]). В высоких концентрациях ДМСО является токсичным, что, по-видимому, связано именно с его липофильностью. Вполне логично предположить, что основной путь проникновения молекул ДМСО в гепатоциты крыс может быть липидным. Однако геометрические параметры молекулы ДМСО (диаметр молекулы составляет $3,2 \text{ \AA}$, ее длина – $4,6 \text{ \AA}$, объем молекулы – $36,97 \text{ \AA}^3$, а площадь поверхности – $14,72 \text{ \AA}^2$ [487]) вполне позволяют ей проникать в гепатоциты крыс, в том числе, и через гидрофильные каналы мембраны, которые, как указывалось выше, у этих клеток имеют довольно большие размеры [481].

7.4. Осмотически зависимые деформации плазматических мембран изолированных гепатоцитов крыс

Реакция клеток на контакт с умеренно гипертоническими растворами во многих случаях удовлетворительно согласуется с моделью, согласно которой клетка может быть представлена как цитоплазма, состоящая из внутриклеточного раствора и осмотически неактивного объема, ограниченная избирательно проницаемой цитоплазматической мембраной. В таком случае помещение клетки в гипертонический раствор проникающего в клетку вещества вызывает сначала сравнительно быстрое уменьшение ее объема, обусловленное обезвоживанием, а затем более медленное увеличение объема до исходного значения со скоростью, определяющейся, в частности, коэффициентом проницаемости k_p плазматической мембраны данного типа клеток для проникающих веществ.

В условиях повышенной концентрации в среде в норме непроникающего электролита NaCl (см. п.7.3), а также регидратации после насыщения гепатоцитов крыс различной концентрацией ДМСО (см. п.7.1) типичным морфологическим ответом является набухание клеток до объемов, значительно превышающих исходные, и деформация плазматической мембраны в виде образования пузырей,

так называемого блеббинга мембраны [490–493]. Принципиальных отличий в кинетике формирования и развития мембранных пузырей в обоих случаях отмечено не было.

Рис. 7.21–7.23 иллюстрируют наиболее характерные морфологические состояния гепатоцитов крыс при формировании пузырей в условиях воздействия гипертонического водного раствора NaCl. Как правило, зарождение пузырей на поверхности клеток происходило после увеличения объема обезвоженных гепатоцитов до приблизительно исходного значения. Первоначально на мембране появлялись единичные выпячивания сферической формы небольшого

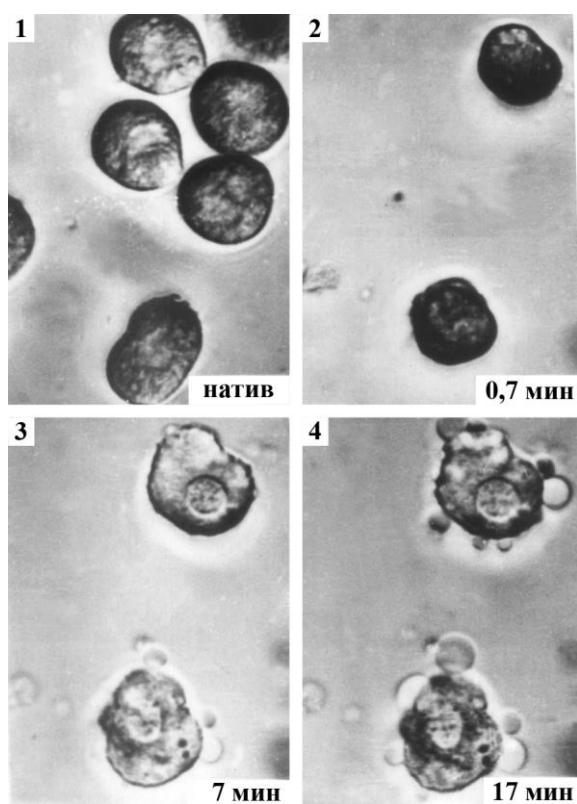


Рис. 7.21. Кинетика образования мембранных пузырей при воздействии 3,42 М раствора NaCl на изолированные гепатоциты крысы. Ув. при съемке $\times 200$.

размера, оптическая плотность которых была значительно ниже оптической плотности остального содержимого клеток. Граница между прозрачным пузырем и оптически плотной фазой отчетливо фиксировалась (рис. 7.21, 3). В процессе экспозиции клеток в гипертоническом растворе NaCl формирование мембранных

пузырей приобретало массовый характер (рис. 7.21, 4). Скорость изменения характерных геометрических параметров пузырей (высоты (h), радиуса основания (a), радиуса сферической части (r)) была достаточно высокой. Так, в 0,85 М растворе NaCl скорость изменения величин h , a и r в среднем составляла соответственно $12,33 \times 10^{-6}$ м/с, $5,66 \times 10^{-6}$ м/с, $5,75 \times 10^{-6}$ м/с. По мере роста пузырей происходило скачкообразное их слияние, что приводило к образованию протяженных участков, лишенных связи мембрана – гранулоплазма (рис. 7.22, 3-4). Поскольку в местах отслоения мембрана подвергается значительному изотропному растяжению, слияние пузырей является энергетически выгодным,

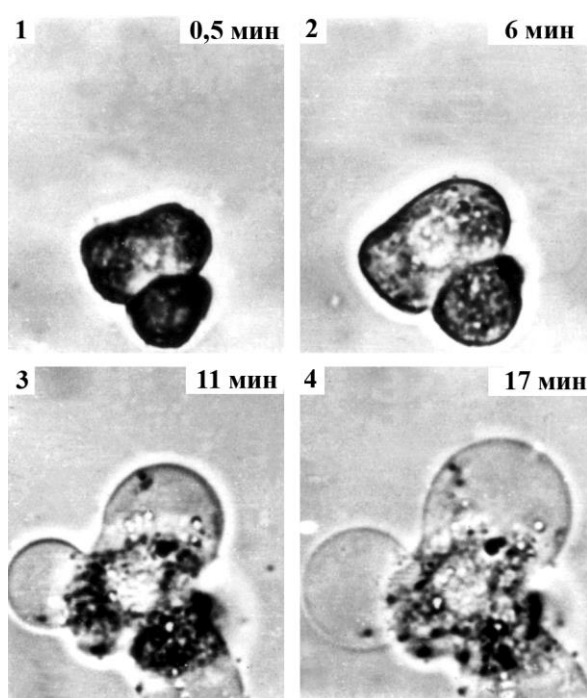


Рис. 7.22. Стабилизация гранулоплазмы гепатоцитов крысы при образовании мембранных пузырей в 0,85 М растворе NaCl. Увеличение при съемке $\times 200$.

поскольку приводит к уменьшению свободной энергии деформации мембраны. При выраженном или полном отслоении мембраны от оптически плотной цитоплазматической фазы (рис. 7.22, 4, рис. 7.23, 4), как и в случае постгипертонической регидратации гепатоцитов, площадь поверхности мембраны в таком состоянии значительно превосходит исходную. Важно

отметить, что стабилизация объема оптически плотной фазы в процессе отслоения от нее плазматической мембраны (рис. 7.12, 15-16, рис. 7.17, 11-12, рис. 7.22, 3-4), а также ее способность к осмотическому сжатию в отсутствие мембраны (рис. 7.4, 12) свидетельствуют о сохранении в гранулоплазме пространственной сети внутренних связей. В случае же их нарушения гранулоплазма приобретала фрагментированный вид и диффузно распределялась

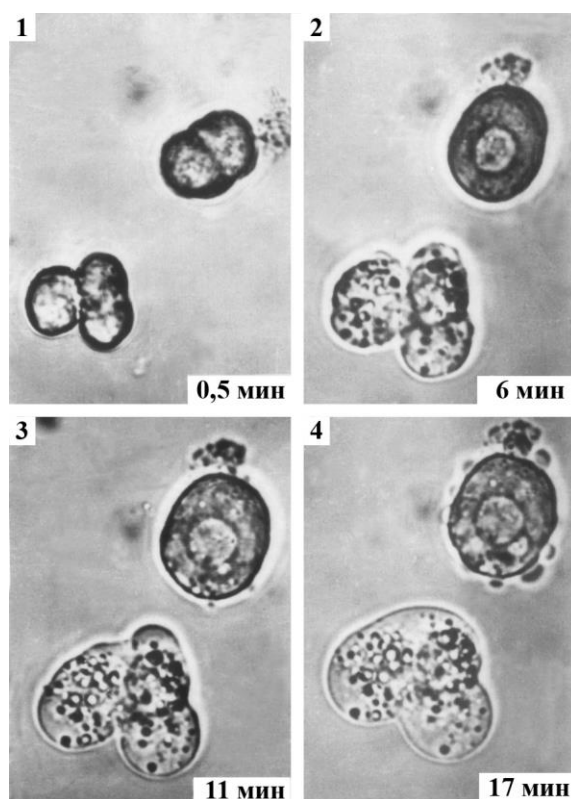


Рис. 7.23. Диффузное распределение фрагментированной гранулоплазмы гепатоцитов крысы в объеме пузырей при воздействии 0,85 М раствора NaCl.

по объему гепатоцитов, в том числе, заполняя и мембранные пузыри (рис. 7.23, 3-4).

Безусловно, и в условиях гипертонического воздействия NaCl и в условиях постгипертонической регидратации, несмотря на сохранение в этом случае активной осмотической реакции клеток, имеющих мембранные пузыри значительных размеров, все морфологические признаки свидетельствовали о

необратимых повреждениях гепатоцитов.

При анализе характера структурных изменений клеток, повергнутых различным повреждающим воздействиям [494], обсуждаются два основных типа гибели клетки с присущими им специфическими нарушениями – некроз и апоптоз.

При некрозе клеток происходит увеличение проницаемости мембран вследствие нарушения их структуры или работы катионного насоса [495]. Из клетки выходят различные макромолекулы. Набухание митохондрий и деструкция мембран органелл вызывает вакуолизацию цитоплазмы. Внутри клеток резко усиливаются катаболические процессы, развивается их аутолизис. В связи с повреждением плазматической мембраны в клетку проникают и окрашивают ее такие вещества, как трипановый синий, бромистый этидий, пропидий йодид и другие красители, с помощью которых обычно выявляют некротическую форму гибели клеток [496, 497]. Хроматин ядра конденсируется в мелкие глыбки, разбросанные по всему ядру. ДНК при некрозе подвергается неупорядоченной (хаотической) деградации.

При апоптозе целостность плазматической мембраны сохраняется, на ней образуются выпячивания в виде мелких везикул (пузырей), которые увеличиваются в размере и могут отделяться от клетки – формируются так называемые апоптические тельца. При этом клетка и апоптические тельца остаются непроницаемыми для красителей, используемых для оценки некроза, что свидетельствует о сохранности у них неповрежденной плазматической мембраны. Хроматин ядра в апоптической клетке конденсируется в форме полумесяца и смещается к ядерной мембране, иногда отмечается кариорексис – фрагментация ядра. ДНК при апоптозе обычно подвергается упорядоченной деградации в результате межнуклеосомного расщепления Ca^{2+} и Mg^{2+} –зависимыми эндогенными эндонуклеазами. Электрофорез в агарозном геле [497], а также разделение в электрическом поле [498] образующихся олигонуклеосомных фрагментов ДНК дает картину типичного распределения по молекулярной массе в виде “лесенки“. Характерным признаком апоптоза

является переход фосфатидилсерина из внутреннего монослоя цитоплазматической мембраны в наружный [496, 499]. Однако ключевым макроскопическим проявлением апоптоза является именно блеббинг плазматической мембраны.

Вместе с тем образование мембранных пузырей может развиваться и на начальных стадиях некроза и стать причиной лизиса клетки [496, 500, 501]. Наличие той или иной формы гибели и степень ее выраженности достоверно оцениваются посредством ультраструктурных исследований специфичности состояния ядра.

Однако гибель клеток может происходить одновременно как по типу первичного некроза, так и апоптоза. Это показано при энергетическом голодании, окислительном стрессе, тепловом шоке клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), при действии на эти клетки мембраноактивного агента тритона X-100 [494], а также при действии ксенобиотиков акрилонитрила на тимоциты мышей [496] и доксорубицина на клетки костного мозга мышей [502]. Считается, что, как правило, некроз сопровождается набуханием клеток, а апоптоз – их сморщиванием и потерей до одной трети своего первоначального объема [503, 504]. Однако установлено, что первичный некроз клеток АКЭ, в частности, при энергетическом голодании и окислительном стрессе, может происходить и без предшествующего набухания, а апоптоз, особенно при действии винбластина, – с выраженным набуханием и увеличением размера клеток [494] или при неизменной форме и размере [505]. Кроме того, при определенных условиях процесс реализации одной программы гибели клетки на каких-то этапах может смениться другой и, например, начавшийся апоптоз может завершиться вторичным некрозом – неспособностью клетки сформировать апоптические тельца [496, 499, 506]. Возможность некроза апоптической клетки была показана на нефиксированных препаратах при исследовании структурных особенностей повреждения асцитных опухолевых клеток EL-4 при энергетическом голодании [507]. Переход апоптической формы гибели в некротическую довольно часто встречается у клеток асцитной карциномы Эрлиха [494]. Некоторые авторы в

принципе считают некрозом значительную стадию апоптоза – фрагментацию ядра [503].

Характер гибели клеток по стереотипному механизму некроза или апоптоза во многом определяется внутриклеточной концентрацией АТФ и НАД⁺ [508]. Фактической причиной гибели клеток при некрозе считается резкое снижение в них уровня АТФ [506, 509, 510] и НАД⁺ [511], которое может быть вызвано, например, соответственно нарушением реакций окислительного фосфорилирования или гиперпродукцией свободных радикалов. Показано, что падение уровня АТФ в асцитных опухолевых клетках тимомы EL-4 более чем в десять раз сопровождается гибелью клеток исключительно в форме некроза [507]. Среди стимулов, запускающих апоптоз, выделяют неспецифические факторы, такие, как температура, токсические агенты, оксиданты, свободные радикалы, γ - и УФ-излучение, вирусные инфекции, бактериальные токсины и др. и специфические факторы, определяющие апоптоз как физиологическое явление. Как один из возможных механизмов апоптоза в настоящее время рассматривается кислородно-перекисный механизм, связанный с нарушением митохондриального дыхания и возникновением окислительного стресса [512]. Вопрос о том, что конкретно определяет тип гибели клетки при действии различных повреждающих факторов, активно исследуется, однако пока остается открытым.

Структурные нарушения гепатоцитов крыс при действии исследованных нами факторов содержали совокупность морфологических признаков характерных как для апоптоза (образование мембранных пузырей, сохранение свойств избирательной проницаемости мембран, фрагментация ядра), так и некроза (набухание клеток, вакуолизация цитоплазмы, оголение ядер, разрыхление ядерного матрикса, образование мембранных пузырей, потеря свойства избирательной проницаемости). По-видимому, при воздействии на гепатоциты крысы гипертонических растворов соли NaCl развивался некроз. В условиях постгипертонической регидратации в тех случаях, когда происходил локальный макроскопический разрыв мембранных пузырей гепатоцитов, возможно, имел место некроз апоптической клетки. Однако только по

макроскопическим проявлениям повреждений однозначно говорить о первоначальном пути развития гибели гепатоцитов в исследованных нами условиях, естественно, не представляется возможным.

Образование мембранных пузырей является одной из ранних универсальных реакций клеток на воздействие различных неблагоприятных факторов, однако, не всегда сопровождается гибелью клеток [513, 514]. Такая стрессовая реакция у гепатоцитов крыс наблюдается при гипоксии [515, 516], действии токсических агентов [516, 517], гипертоническом стрессе [518], в результате механических повреждений при выделении и наложении электрических импульсов высокой напряженности [515], при гипотермическом хранении [519], после криоконсервирования [520]. У клеток почек сирийского хомячка и перитонеального экссудата мыши – при действии физико-химических факторов криоповреждения [141, 521]. Формирование пузырей на поверхности эндотелиальных клеток кровеносных капилляров головного мозга наблюдается при химическом канцерогенезе, а на поверхности эпителиальных и гладкомышечных клеток тонкой кишки – при действии холерного экзо– и эндотоксина [522]. У клеток асцитной тимомы EL-4 – в условиях отсутствия глюкозы при подавленном с помощью ротенона дыхании [507]. К образованию мембранных пузырьков на клеточной поверхности нейронов *Lymnaea stagnalis* приводит двукратное увеличение трансмембранного осмотического градиента при внутриклеточной аппликации маннита [523]. Образованием крупных пузырей может сопровождаться помещение клеток в гипотонический раствор [524]. Электроиндуцируемое формирование мембранных пузырей размером до 10 мкм наблюдается у эмбриональных клеток трахеи быка (FBT), клеток первичной культуры мышинных эмбриональных фибробластов (MEF), крысиных эмбриональных фибробластов линии RAT-1 [513], овариальных клеток китайского хомячка (CHO) [525]. Известно, что пузыри образуются на клеточной поверхности при делении клеток и что в телофазе клеточная поверхность становится очень активной (как бы “вскипающей”): на делящейся клетке быстро возникают и исчезают пузыри [526]. Растровая электронная микроскопия

показала, что пузыри могут входить в состав рельефа поверхности очень многих типов клеток в культуре, причем не только в митозе, но и в интерфазе [524]. Размеры пузырей широко варьируют от 0,2 - 0,5 мкм до 5 мкм и более. Имеются данные о том, что при достижении ими размера, равного половине диаметра клетки, последняя утрачивает способность к делению [527]. Возможным последствием образования крупных пузырей является лизис клетки [528]. Известно также, что клеточные мембраны при образовании пузырей не истончаются, изменяется вязкость цитоплазмы клеток, в содержимом пузыря цитоплазма разжижается, ее электронная плотность резко уменьшается [526]. По данным просвечивающей электронной микроскопии пузыри содержат множество полирибосом, а также тонкий слой кортикальной цитоплазмы [524]. Качественные характеристики пузырей в клетках, находящихся на ранних стадиях некроза и апоптоза, различны. Так, при некротическом блеббинге пузыри содержат лишь некоторое количество цитоплазмы, в то время как при апоптотическом блеббинге в их состав входят фрагменты клеточных органелл (митохондрий, эндоплазматического ретикулума, лизосом [514]). При нелетальных воздействиях образование мембранных пузырей у живых клеток носит обратимый характер [513, 515, 516, 525]. Восстановление клеточной поверхности может происходить путем втягивания мембранных пузырей, а также в результате их отрыва в виде замкнутых везикул, внешне напоминающих липосомы [513].

Таким образом, формирование мембранных пузырей может быть отнесено к неспецифической реакции клеток, проявляющейся как в физиологических условиях, так и при самых разнообразных неблагоприятных факторах воздействия, являясь макроскопическим проявлением целой цепочки сложных биохимических процессов, происходящих в клетках при их адаптации и гибели в форме апоптоза или некроза.

Представления о механизме блеббинга в настоящее время окончательно не сформулированы. Установлено, что у эритроцитов человека, лишенных ядра и цитоскелет которых вырожден (имеется только спектрин-актиновый скелет,

являющийся упрощенным аналогом кортикального слоя животных), образование мембранных пузырей не наблюдается [513]. Этот факт является одним из возможных подтверждений связи между состоянием цитоскелетных структур и формированием мембранных пузырей. Цитоскелет животных представляет собой сложную многокомпонентную систему, состоящую из микротрубочек, микрофиламентов и промежуточных филаментов, выполняющих определенную роль в поддержании клеточного каркаса. Белки и гликопротеины клеточной мембраны прикрепляются к микрофиламентам и микротрубочкам, которые таким образом контролируют подвижность белков в плоскости мембраны. Поскольку многие из этих белков и гликопротеинов представляют собой специфические рецепторы внеклеточных молекул, считается, что цитоскелетные системы могут осуществлять трансмембранный контроль за подвижностью и распределением этих рецепторов на поверхности клетки [524]. Исследования влияния на форму клетки и ее поверхность специфических агентов, воздействующих на состояние цитоскелетных систем, свидетельствует о непосредственном участии последних в процессе образования мембранных пузырей. Так, обработка клеток антитубулинами (колхицин, колцемид, винбластин), вызывающими деполимеризацию тубулина, входящего в состав микротрубочек, цитохалазином В (ингибитор полимеризации актина), нарушающим структурную организацию микрофиламентов, а также анестетиками (дибукаин, тетракаин, прокаин), вызывающими дезорганизацию как микротрубочек, так и микрофиламентов, приводит к формированию довольно крупных пузырей (5-12 мкм) [494, 513, 523, 524]. Данные просвечивающей электронной микроскопии показали, что в клетках, обработанных цитохалазином В, микрофиламенты действительно подвергаются дезорганизации и местами полностью исчезают [524], что, по-видимому, и может привести к нарушению мембран-цитоскелетного взаимодействия. Роль цитоскелетных систем в формировании пузырей подтверждается также состояниями клеток, при которых происходит дезорганизация микротрубочек: в конце митоза, при воздействиях холода, а также при действии трипсина. Косвенным подтверждением участия цитоскелета

в образовании пузырей служат также данные о влиянии на клетку дибутирилциклической АМФ (д-цАМФ), которая способствует увеличению количества микротрубочек. Это вещество оказывает на клетки действие противоположное действию антитубулинов: в его присутствии наблюдалось исчезновение пузырей на поверхности овариальных клеток китайского хомячка [524].

Современные модели образования мембранных пузырей базируются на цитоскелетных механизмах. Так как поверхностная структура клеток регулируется динамическими взаимодействиями между белками цитоскелета и мембраной, непосредственное повреждение этих компонентов (окисление белков, формирование межбелковых сшивок, изменение белок – липидных взаимодействий, перекисное окисление липидов), обусловленное цепочкой биохимических реакций, индуктором которых может быть внешнее стрессовое воздействие, вызывает формирование мембранных пузырей. Ключевыми событиями в этих процессах являются нарушения контактов между актином и миозином, дезорганизация микротрубочек, локальная деполимеризация актина, изменение фосфорилирования белков цитоскелета митоген - и стрессактивируемыми протеинкиназами, киназой легкой цепи миозина [528, 529, 530, 531]. Показано, что активность киназы легкой цепи миозина (кальций - зависимый фермент) вносит существенный вклад в процесс формирования мембранных пузырей: микроинъекция в клетки каталитически активной формы этого фермента вызывает блеббинг клеточной мембраны [529]. Обнаруженное в составе пузырьков на поверхности клеток значительное количество протеасом позволило высказать гипотезу о миграции протеолитических ферментов в составе протеасом в примембранные микродомены клеток и последующей активации протеаз в этих участках, что приводит к разрушению белков цитоскелета с “отслоением” мембраны от участков ее контакта с цитоскелетом [532].

Основной составляющей силы связи между мембраной и цитоскелетом в процессе блеббинга является собственно натяжение мембраны, которое одинаково по всей поверхности клетки и не преобладает в апикальной ее части,

где в интактных клетках выше плотность структур цитоскелета [528]. Показано, что в клетках меланомы, которые подвергаются спонтанному блеббингу, сила связи между мембраной и цитоскелетом пропорциональна радиусу пузырей. В момент образования крупных пузырей на мембране сила связи между мембраной и цитоскелетом значительно снижается, одновременно в других частях клетки сила связи между мембраной и белками цитоскелета возрастает [533]. Как полагают авторы работы [513], образование мембранных пузырей может явиться следствием локального разрыва подмембранного цитоскелета в результате развивающихся на данном участке упругих напряжений при деформациях мембраны под воздействием различных внешних факторов. Теоретический анализ свойств физической модели мембранного скелета эритроцитов [534] показал, что нарушение химической связи лишь в одной ячейке скелета может в результате релаксации скелета инициировать возникновение на клеточных мембранах относительно больших участков, свободных от мембранного скелета и содержащих лишь незначительное количество интегральных белков. Вероятность такого процесса, по-видимому, не исключена и в клетках, имеющих хорошо развитый цитоскелет. Установлено, что участки выпячивания плазматической мембраны при блеббинге и оторвавшиеся от клеточной поверхности пузыри лишены кортикального цитоскелета, в них наблюдается дефицит белков цитоскелета [535]. Следовательно не исключено, что в тех участках мембраны, где произошел разрыв цитоскелета, в силу локального нарушения структуры мембраны могут измениться и ее упругие свойства. Снижение сопротивления мембраны в таких участках и может привести к развитию пузырей. Как показано в работе [536], повышение жесткости мембраны за счет связывания гликокаликсом полисахаридов действительно ингибирует блеббинг.

Наблюдаемая нами в условиях осмотических нагрузок стабилизация объема оптически плотной фазы гепатоцитов в процессе отслоения от нее плазматической мембраны, а также способность оптически плотной фазы к осмотическому сжатию в отсутствие мембраны, позволяет рассматривать цитоплазму с позиций фазовой теории строения клеток [537] как осмотически

активную гелеобразную структуру, пронизанную сплошной пространственной сетью связей, определяющих ее упруго-пластические свойства. Исходя из этого, образование мембранных пузырей, по нашему мнению, может быть связано с явлением синерезиса, возникающим при контакте структурированного геля с концентрированными растворами. Суть данного явления заключается в сжатии геля и вытеснении из его структурной матрицы раствора, концентрация которого отличается от раствора в геле до сжатия. При этом форма геля остается прежней, а осмотическое давление раствора, которым он окружен, скачкообразно уменьшается или увеличивается. Если предположить, что такое явление происходит в клетке, и концентрация в окружающем геле (который мы отождествляем с оптически плотной фазой) растворе увеличивается, тогда на клеточную мембрану начинают действовать механические силы, обусловленные осмотическим потоком воды внутрь клеток. Под действием этих сил возможен отрыв мембраны от сохраняющего свою форму цитоплазматического геля. В отслоившихся участках мембрана оказывается изотропно растянутой и поэтому имеет форму усеченной сферы.

Элементы данного представления получили свое подтверждение и дальнейшее развитие в работе [536]. Авторы данной работы [536] рассматривают образование мембранных пузырей как результат нарушения мембран-цитоскелетных взаимодействий вследствие возникновения в цитоплазме пространственных гетерогенных градиентов гидростатического давления, которые генерируются сокращением кортикального актин-миозинового комплекса. Современные модели рассматривают цитоплазму как несжимаемый высокоэластичный континуум или вязкую жидкость и предполагают, что гидростатическое давление постоянно по всей клетке. Однако экспериментально авторам работы [536] удалось показать, что при блеббинге в клетке существует градиент гидростатического давления: при локальном введении веществ, вызывающих релаксацию цитоскелета и сброс давления в участке, где имелись пузыри на клетках меланомы, пузыри появлялись на другом участке мембраны, свидетельствуя о повышении там давления. Для объяснения возникновения

локальных давлений авторы привлекают модель цитоплазмы на основе порозластичности. Согласно этой модели цитоплазма состоит из пористой активно сокращающейся сетки (цитоскелетные филаменты, органеллы, рибосомы), инфильтрованной жидкостью (цитозоль, содержащий воду, ионы и растворенные белки), т.е. цитоплазма представляется подобной смоченной губке. Исходя из этого, авторы работы [536] предлагают следующую качественную модель формирования мембранных пузырей. Сокращение актин-миозинового комплекса создает компрессионный стресс на цитоскелетной сетке. Это приводит к локальному увеличению гидростатического давления в области сетки. В ответ цитозоль выдавливается из сетки в область, где мембрана слабо связана с кортексом: результирующее давление приводит к разрыву и формированию пузыря.

7.5. Выводы

Проведенные в настоящем разделе исследования позволили установить, что постгипертонический лизис гепатоцитов крыс при регидратации осуществляется либо путем порционного выброса части внутриклеточного содержимого, либо путем непрерывного его оттока во внеклеточную среду. Мембрана сохраняет свойство избирательной проницаемости при значительном растяжении, а также после образования в ней макроскопической поры, выброса части внутриклеточного содержимого из клетки наружу и самопроизвольного “залечивания” поры.

Численное значение модуля изотропного растяжения мембраны гепатоцитов крыс имеет аномально низкое значение порядка $8,0 \times 10^{-3}$ Н/м, которое в 50 раз меньше модуля изотропного растяжения мембран эритроцитов человека. Аномально низкое значение модуля упругости мембран гепатоцитов крысы свидетельствует о способности данных клеток испытывать значительные трансмембранные перепады осмотического давления и деформации при эндоцитозе без образования макроскопического разрыва мембран.

Получены численные значения коэффициента фильтрации L_p плазматических мембран гепатоцитов крыс в среде непроникающего вещества NaCl и в среде, содержащей ДМСО. Установлено, что в условиях одинаковых осмотических нагрузок присутствие в среде проникающего через клеточную мембрану вещества снижает коэффициент фильтрации на три порядка. Численное значение коэффициента проницаемости k_p плазматических мембран гепатоцитов крыс для молекул ДМСО имеет достаточно высокое значение $(2,04 \pm 0,188) \times 10^{-7}$ м/с, что может быть обусловлено существованием для молекул ДМСО двух путей трансмембранного массопереноса.

В сложном каскаде превращений в клетке при действии различных повреждающих факторов, в том числе значительных осмотических градиентов, которые имеют место в цикле “замораживание – отогрев”, цитоскелет является завершающей точкой приложения стрессового удара, дезорганизация которого вызывает нарушение мембран-цитоскелетных взаимодействий. Образование в мембранах липидных доменов при локальном разрыве и релаксации мембранного скелета приводит к изменению упругих свойств мембраны на данных участках и, как следствие, сопровождается возникновением деформаций клеточных мембран в виде пузырей.

Материалы раздела 7 опубликованы в работах [461–463, 466, 474, 475, 477–480, 490–493, 537]

РАЗДЕЛ 8

ТРАНСПОРТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ НЕПРЕРЫВНОЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ

Нарушение термодинамического равновесия в системе “клетка – окружающая среда” при образовании и развитии внеклеточных кристаллов льда может компенсироваться двумя путями: либо за счет непрерывного оттока воды из клетки, либо за счет образования внутриклеточных кристаллов льда при значительном переохлаждении цитоплазмы. В обоих случаях при достаточно низких температурах повреждение клеток становится неизбежным. Поэтому для максимальной сохранности клеток трансмембранный поток воды должен быть таким, чтобы, с одной стороны, обеспечить щадящее обезвоживание и, с другой стороны, исключить вероятность внутриклеточного льдообразования или уменьшить количество внутриклеточного льда. Трансмембранный поток воды контролируется скоростью охлаждения клеточной суспензии и лимитируется транспортными характеристиками плазматических мембран клеток. Следовательно, оптимальной скоростью охлаждения, специфичной для конкретного типа клеток, является та максимальная скорость, при которой существует баланс трансмембранного водного потока, обеспечивающий достаточное, но не критическое, обезвоживание клеток, исключающее внутриклеточное льдообразование.

При охлаждении клеток меняется состояние мембранного бислоя: жидкокристаллическая фаза превращается в твердый гель. Вследствие гетерогенности и сложности состава мембран фазовый переход в них происходит не сразу по всей поверхности, а занимает широкий температурный интервал, что приводит к перераспределению их компонентов. Латеральное разделение мембранных компонентов может быть вызвано также деформацией

плазматических мембран в процессе обезвоживания клеток в каналах. Считается, что фазовое разделение липидов и белков приводит к образованию микродефектов в структуре бислоя на границе твердой и жидкой фаз, вследствие чего вполне вероятно изменение транспортных характеристик мембраны вплоть до нарушения ее барьерной функции [5].

Следовательно, возможность количественного прогноза реакции клеток на замораживание для данного температурного режима и для определенного типа клеток, а, следовательно, и оптимизация процесса криоконсервирования, должны базироваться на знании коэффициентов проницаемости их мембран для молекул воды L_{pg} и криопротектора k_{pg} в зоне формирования внеклеточных кристаллов льда. Решение такой задачи осложняется тем, что в условиях непрерывного роста внеклеточных кристаллов следует учитывать целый ряд факторов, таких как переохлаждение, возрастающую концентрацию растворенных в жидкой фазе веществ, размер кристаллов и др. В связи с этим аналитическое выражение кинетики изменения клеточного объема, вне – и внутриклеточных концентраций при непрерывном охлаждении может быть получено лишь при условии целого ряда допущений.

В задачу данного раздела исследований входило экспериментально оценить возможность использования физико-математической модели, предложенной Е. А. Гордиенко [5], для определения транспортных характеристик плазматических мембран клеток при субнулевых температурах и на ее основе разработать алгоритм прогнозирования оптимальных скоростей охлаждения клеточных суспензий.

8.1. Экспериментальная проверка адекватности физико-математической модели для определения транспортных характеристик плазматических мембран клеток при непрерывной внеклеточной кристаллизации

В работе [5] для определения транспортных характеристик мембран клеток

при субнулевых температурах предложен алгоритм расчета изменения объема клеток и концентраций растворенных внутриклеточных веществ в процессе кристаллизации клеточной суспензии при наличии проникающего криопротектора. В разработанной физико-математической модели феноменологическое описание пассивного транспорта воды и проникающих через клеточную мембрану веществ также основывается на методах термодинамики необратимых процессов – подхода предложенного Kedem O. и Katchalsky A. [180, 181]. Указанный алгоритм расчета [5] предполагает, что коэффициенты фильтрации клеточных мембран L_{pg} и их проницаемости для криопротектора k_{pg} с понижением температуры кристаллизующейся суспензии подчиняются аррениусовым зависимостям и мембрана при этом остается интактной:

$$L_{pg}(T) = L_p(T_0) \exp \left[\frac{U_0}{RT_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right]$$

$$k_{pg}(T) = k_p(T_0) \exp \left[\frac{U_1}{RT_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right],$$

где T_0 – исходная (до начала охлаждения) температура клеточной суспензии, U_0 и U_1 – соответственно энергии активации процесса переноса через плазматическую мембрану молекул воды и растворенного вещества, R — универсальная газовая постоянная. Если охлаждение производится со скоростью β , то $T_0 \frac{d}{dt} = \beta \frac{d}{d\hat{T}}$,

где $\hat{T} = \frac{T}{T_0}$ – относительная температура суспензии. Считается, что внеклеточный

лед возникает при нулевом переохлаждении внеклеточной среды и в процессе замораживания находится в термодинамическом равновесии с окружающим его внеклеточным раствором. Эффектами, связанными с кривизной и размерами кристаллов льда и соответствующими лаплассовыми эффектами пренебрегают. Согласно теоретическим подходам [5], в условиях внеклеточной кристаллизации осмотическое равновесие в системе относительно проникающего (π_1) и непроникающего (π_2) через плазматическую мембрану веществ с учетом

объемной доли жидкой незамерзающей фракции χ в замораживаемой суспензии описывается следующими равенствами:

$$\hat{\pi}_1^{\text{out}} = \frac{(1-\alpha g_0)\hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_1^{\text{in}}(y-\alpha)g_0}{1-g_0y-\chi(1-g_0)}, \quad \hat{\pi}_2^{\text{out}} = \frac{(1-\alpha g_0)\hat{\pi}_{2\infty} - (1-\alpha)g_0}{1-g_0y-\chi(1-\alpha g_0)}, \quad (8.1)$$

где $\hat{\pi}_1^{\text{out}} = \pi_1^{\text{out}}/\pi_{20}^{\text{in}}$, $\hat{\pi}_2^{\text{out}} = \pi_2^{\text{out}}/\pi_{20}^{\text{in}}$ – приведенные значения внеклеточного осмотического давления соответственно проникающего

$$\pi_1^{\text{out}} = \frac{\pi_{1\infty} - g_0\pi_1^{\text{in}}(V/V_0 - \alpha)}{1 - g_0V/V_0} \text{ и непроникающего} \quad \pi_2^{\text{out}} = \frac{\pi_{2\infty} - (1-\alpha)g_0\pi_{20}^{\text{in}}}{1 - g_0V/V_0}$$

веществ; $\hat{\pi}_1^{\text{in}} = \pi_1^{\text{in}}/\pi_{20}^{\text{in}}$ – приведенное значение внутриклеточного осмотического давления проникающего через плазматическую мембрану вещества; π_{20}^{in} – начальное значение суммарного осмотического давления непроникающих веществ внутри клетки; $\pi_{1\infty}, \pi_{2\infty}$ – асимптотические значения осмотического давления соответственно проникающего и непроникающего через плазматическую мембрану веществ, соответствующие равномерному их распределению вдоль системы; $\hat{\pi}_{1\infty}, \hat{\pi}_{2\infty}$ – приведенные асимптотические значения осмотического давления соответственно проникающего ($\hat{\pi}_{1\infty} = \pi_{1\infty}/\pi_{20}^{\text{in}}$) и непроникающего ($\hat{\pi}_{2\infty} = \pi_{2\infty}/\pi_{20}^{\text{in}}$) веществ; $y = V/V_0$ – относительный объем клетки; g_0 – начальное значение отношения суммарного объема клеток к полному объему клеточной суспензии; α – объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ.

Соотношения (8.1) были получены в предположении, что при росте кристаллов льда растворенные вещества концентрируются в жидких межкристаллических каналах, молекулярно не захватываясь льдом, а, следовательно, концентрации растворенных веществ в жидком внеклеточном растворе изменяются в соответствии с фазовой диаграммой.

Система дифференциальных уравнений, описывающая кинетику изменения

относительного объема клетки и концентраций проникающего и непроникающего через плазматическую мембрану веществ внутри клетки в процессе внеклеточной кристаллизации, имеет вид:

$$\frac{dy}{d\hat{T}} = p \exp \left[a(\hat{T}-1)/\hat{T} \right] \left\{ \sigma_1 \hat{\pi}_1^{\text{in}} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \left[1 + \sigma_1 \frac{\hat{\pi}_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \hat{\pi}_1^{\text{in}}(y-\alpha)g_0}{\hat{\pi}_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0} \right] \hat{\pi}_2^{\text{out}} \right\},$$

$$\begin{aligned} \frac{d\hat{\pi}_1^{\text{in}}}{d\hat{T}} = & \frac{p}{y-\alpha} \left\{ \left[\sigma_1 \hat{\pi}_1^{\text{in}} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - (1 + \sigma_1 \Phi_{\text{out}}) \hat{\pi}_2^{\text{out}} \right] \times [(1-\sigma_1) \hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_1^{\text{in}}] \times \right. \\ & \left. \times \exp \left[a(\hat{T}-1)/\hat{T} \right] - q(\hat{\pi}_1^{\text{in}} - \Phi_{\text{out}} \hat{\pi}_2^{\text{out}}) \exp \left[b(\hat{T}-1)/\hat{T} \right] \right\}, \end{aligned} \quad (8.2)$$

$$\text{где } \Phi_{\text{out}} = \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \hat{\pi}_1^{\text{in}}(y-\alpha)g_0}{\hat{\pi}_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0}, p \equiv \frac{T_0}{\beta \tau_0}, q \equiv \frac{\tau_0(T_0)}{\tau_1(T_0)}, a \equiv \frac{U_0}{R_0 T_0}, b \equiv \frac{U_1}{R_0 T_0},$$

$\tau_0 = (\gamma_0 L_{\text{pg}} \pi_{20}^{\text{in}})^{-1}$, $\tau_1 = (\gamma_0 k_{\text{pg}})^{-1}$, γ_0 – исходное поверхностно-объемное отношение клетки, σ_1 – коэффициент отражения плазматической мембраны для проникающего через мембрану вещества.

Сравнение экспериментальных данных об изменении объема клеток в процессе кристаллизации клеточной суспензии и расчетных данных, полученных по указанному алгоритму в условиях идентичных проведенным экспериментам, при их максимальном совпадении, позволяет получить численные значения коэффициентов фильтрации L_{pg} и проницаемости k_{pg} .

Для экспериментальной проверки адекватности предложенной термодинамической модели, аналитически описывающей процессы трансмембранного переноса веществ в условиях непрерывного роста кристаллов льда в окружающей клетке среде, была использована перевиваемая культура клеток почек сирийского хомячка (ВНК-21). Клетки имеют форму близкую к сферической и диаметр большого сечения около 10-12 мкм. Поверхностно-объемное отношение клеток составляет $\gamma_0 = 0,5 \times 10^5 \text{ м}^{-1}$. В качестве криозащитной среды использовали 0,34 М, 0,68 М и 1,37 М растворы глицерина,

приготовленные на среде суспендирования клеток [538].

Для корректного определения транспортных характеристик плазматических мембран клеток в условиях непрерывного роста внеклеточных кристаллов льда необходимы специально подобранные экспериментальные условия: скорости охлаждения и температурный диапазон исследований. В работах [209, 210] было показано, что скорость охлаждения биологической системы в области положительных температур существенно влияет на параметры проницаемости плазматических мембран при субнулевых температурах а, следовательно, и на прогнозируемую оптимальную скорость охлаждения. Так, при увеличении скорости охлаждения фрагментов ткани яичника обезьяны в температурном интервале $25^{\circ}\text{C} - 4^{\circ}\text{C}$ от $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $40^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ прогнозируемая оптимальная скорость охлаждения, определенная на основании параметров проницаемости L_{pg} при температурах ниже 0°C , падает в условиях замораживания в изотонической среде D-PBS от $20,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $8,2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а при наличии 0,85 М глицерина от $9,0^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $5,6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ [209]. При аналогичных условиях охлаждения в области положительных температур фрагментов ткани яичника лошади прогнозируемая оптимальная скорость охлаждения при замораживании в изотонической среде PBS падает от $65,0^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $8,2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а при наличии 0,85 М глицерина от $11,9^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $8,8^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ [210]. Чтобы исключить влияние скорости охлаждения до начала фазового перехода в системе на проницаемость плазматических мембран клеток ВНК-21 в зоне роста кристаллов льда, суспензию охлаждали с постоянной скоростью от комнатной температуры 24°C до температуры нуклеации. Были выбраны две программы: одноэтапное замораживание со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -25°C и двухэтапное со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры начала фазового перехода и далее со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -25°C . Выбор скоростей охлаждения в зоне формирования внеклеточного льда был обусловлен необходимостью достижения максимально возможного температурного интервала, в котором биофизическим ответом клеток на внеклеточное кристаллообразование было бы обезвоживание. Кроме того, увеличение скорости охлаждения на этапе фазового перехода обуславливает

изменение первичной морфологии образующихся кристаллов льда, особенности которой влияют на массообмен между клеткой и окружающей средой. Обоснованием выбора конечной температуры замораживания явились следующие соображения. При снижении температуры в результате концентрирования внеклеточного раствора увеличивается движущая сила осмотического потока и, соответственно, увеличивается сопротивление клеточной мембраны этому потоку. Сопротивление мембраны транспорту воды может достичь порогового значения, в результате чего не исключена вероятность внутриклеточной кристаллизации или же повреждения клеточной мембраны. Поэтому конечной температурой замораживания должна быть температура, при которой еще происходит адекватный выход внутриклеточной воды. В данных условиях замораживания конечная температура -25°C была определена экспериментально. Скорость отогрева составляла $3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Уравнения (8.2) решались численно методом Рунге-Кутты 4-го порядка с использованием разработанной компьютерной программы. Кинетику изменения концентрации C внеклеточного раствора в процессе замораживания задавали при расчетах аналитически путем аппроксимации известной из литературы [6] фазовой диаграммы плавления водного раствора глицерина в следующем виде:

$$C = -819 \cdot 10^{-4} T^3 + 0,58 T^2 - 1,40 \cdot 10^2 T + 1,12 \cdot 10^4,$$

где T – текущая температура.

Фигурирующие в уравнениях (8.2) транспортные коэффициенты L_{pg} и k_{pg} подбирали методом наименьших квадратов с использованием компьютерной программы и определяли из условия наилучшего совпадения теоретических кривых и экспериментальных зависимостей изменения клеточного объема от температуры в процессе кристаллизации, рассчитанных и полученных в одних и тех же условиях.

На рис. 8.1 и рис. 8.2. показана кинетика обезвоживания клеток почек сирийского хомячка в процессе формирования и роста внеклеточных кристаллов льда различной морфологии.

При одноэтапном замораживании суспензии клеток (рис. 8.1) со скоростью

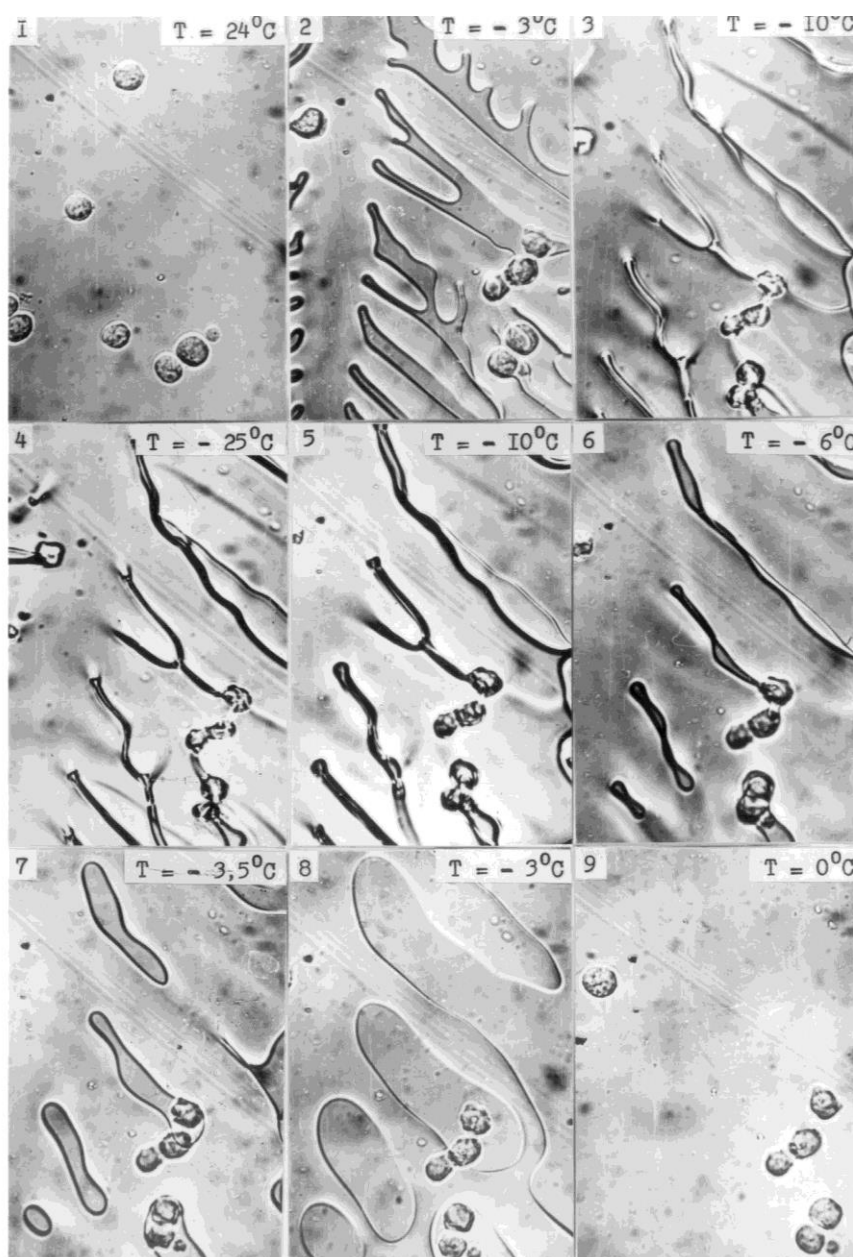


Рис. 8.1. Кинетика процесса замораживания – оттаивания клеток почек сирийского хомячка по одноэтапной программе при содержании в суспензионной среде 1,37 М концентрации глицерина: 1 – исходное состояние клеток в среде замораживания; 2–4 – дегидратация клеток при развитии внеклеточных кристаллов (охлаждение); 5–9 – регидратация клеток при плавлении внеклеточных кристаллов (отогрев). Увеличение при съемке $\times 120$.

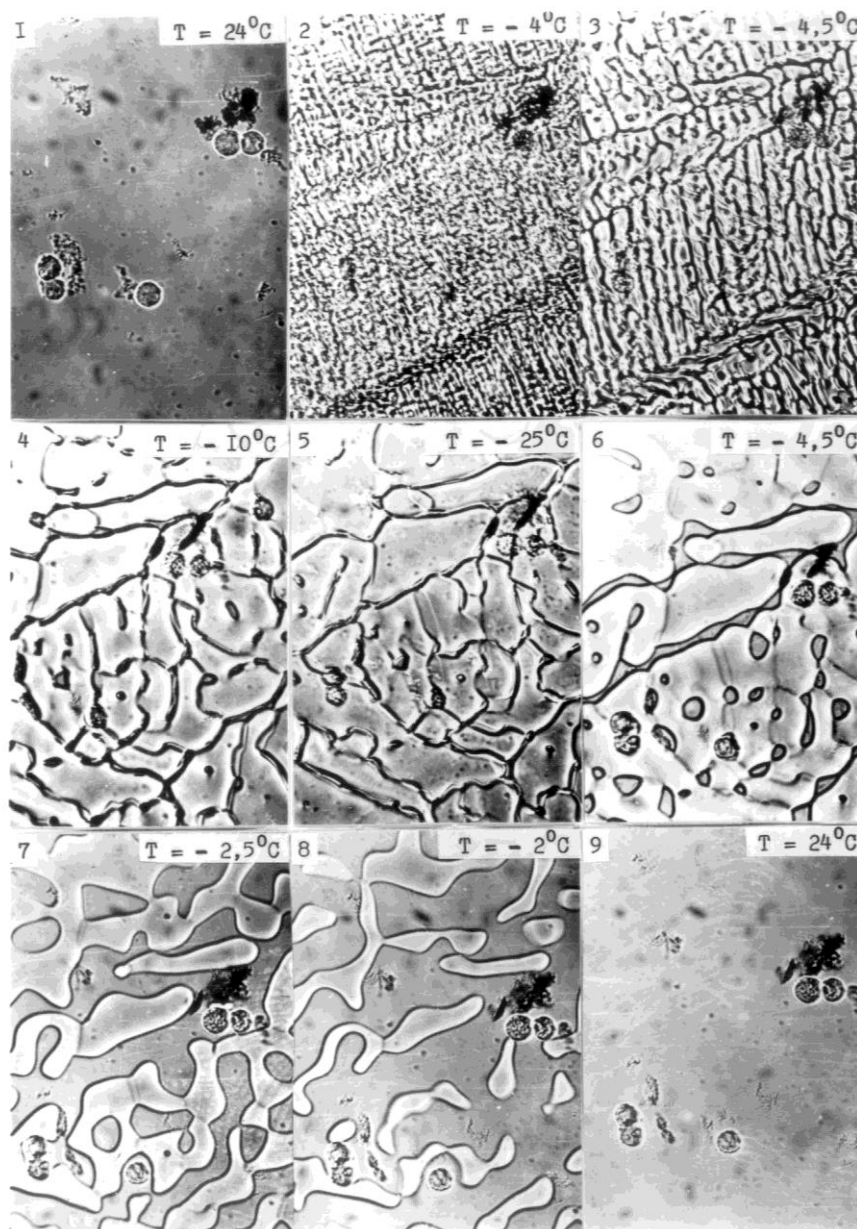


Рис. 8.2. Кинетика процесса замораживания — оттаивания клеток почек сирийского хомячка по двухэтапной программе при содержании в суспензионной среде 1,37 М концентрации глицерина: 1 — исходное состояние клеток в среде замораживания; 2–5 дегидратация клеток при развитии внеклеточных кристаллов (охлаждение); 6–9 — регидратация при плавлении внеклеточных кристаллов (отогрев). Увеличение при съемке $\times 120$.

1°C/мин фазовый переход происходит в условиях близких к равновесным и сопровождается ростом довольно крупных кристаллов льда дендритного типа. Кристаллы льда обрастают клетки, оттесняя их в каналы. По мере снижения температуры видимый размер клеток уменьшается в результате их обезвоживания вплоть до –25°C (рис. 8.1, 4). В процессе отогрева (рис. 8.1, 5-9) происходит постепенное восстановление исходного размера клеток.

При двухэтапном замораживании (рис. 8.2) увеличение скорости на этапе фазового перехода до 5°C/мин приводит к формированию мелкокристаллической структуры, укрупнение которой по мере снижения температуры происходит за счет рекристаллизационных процессов (рис. 8.2, 2-5). Внутриклеточная кристаллизация отсутствует. Дегидратированные в процессе замораживания клетки после отогрева также восстанавливают исходный размер (рис. 8.2, 9).

На рис. 8.3 приведены расчетные и экспериментальные кинетические кривые изменения относительного объема клеток в различных условиях замораживания клеточной суспензии, свидетельствующие об их удовлетворительном совпадении. Смещение экспериментальной кривой относительно теоретической в область более низких температур обусловлено склонностью системы к переохлаждению.

Для проверки степени расхождений между экспериментальными и теоретическими кривыми мы сравнили скорости изменения относительных клеточных объемов $v = \frac{d(V/V_0)}{dT}$ в обоих случаях. С этой целью экспериментальная и теоретическая кривые $V/V_0 = f(T)$ были аппроксимированы полиномами, полученные аналитические зависимости продифференцированы и построены зависимости $v = f(T)$. Сравнение линейных регрессий показало, что разница в скоростях изменения относительных клеточных объемов составляет менее 10%.

Как следует из графиков на рис. 8.3, уровень обезвоживания клеток при температуре –25°C различен и зависит от условий замораживания. При скорости охлаждения 1°C/мин клетки успевают обезводиться в большей степени, чем при

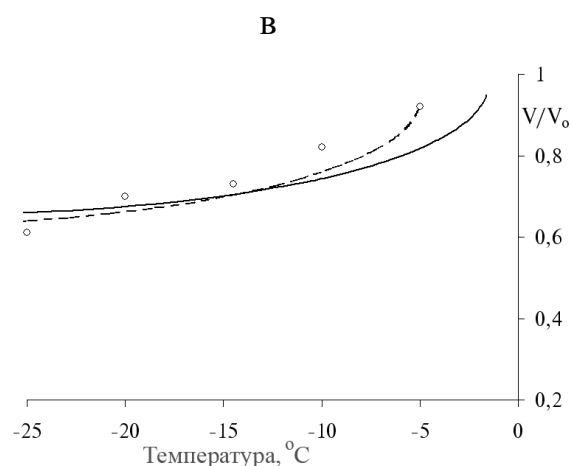
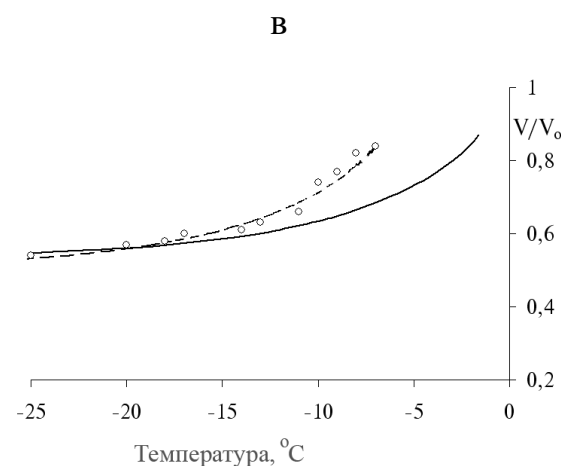
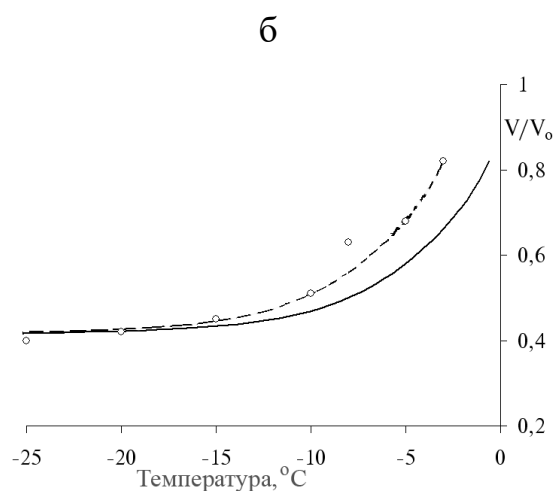
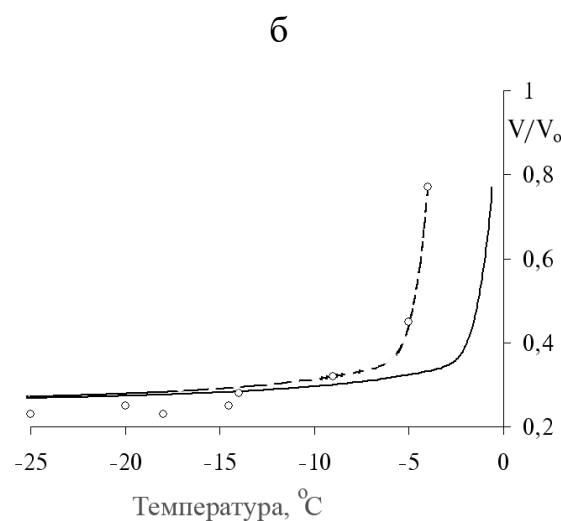
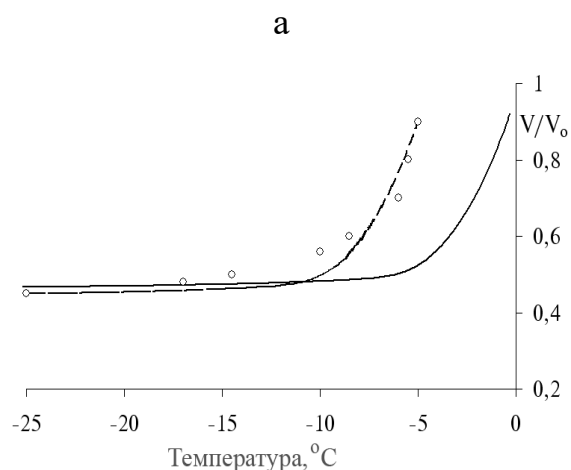
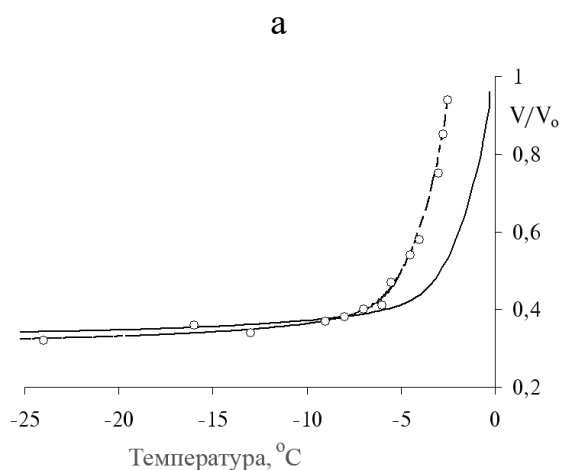


Рис. 8.3.1

Рис. 8.3.2

Рис. 8.3. Зависимость относительного объема клеток почек сирийского хомячка от субнулевой температуры при замораживании клеточной суспензии по одноэтапной программе (рис. 8.3, 1) и двухэтапной программе (рис. 8.3, 2): а – 0,34 М глицерина, б – 0,68 М глицерина, в – 1,37 М глицерина в суспензионной среде; о – экспериментальные данные, сплошная линия – теоретический расчет.

скорости охлаждения $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Влияние исходной концентрации криопротектора в среде на степень обезвоживания, по-видимому, обусловлено тем, что на этапе подготовки клеток к замораживанию происходит частичное замещение внутриклеточной воды глицерином. В связи с тем, что клетки исходно насыщены различной концентрацией криопротектора, разность химических потенциалов между внутриклеточной средой и концентрированным маточным раствором в каналах при одной и той же отрицательной температуре различна. Поэтому, чем выше исходная насыщенность клеток криопротектором, тем при меньшей потере внутриклеточной воды наступает термодинамическое равновесие.

В табл. 8.1 представлены полученные в области кристаллизации клеточной суспензии численные значения эффективных коэффициентов проницаемости плазматических мембран клеток почек сирийского хомячка для молекул воды L_{pg} и глицерина k_{pg} в зависимости от исходной концентрации криопротектора в среде и скорости охлаждения. Как видно, при увеличении концентрации глицерина в среде оба коэффициента снижаются. При охлаждении клеточной

Таблица 8.1

Транспортные характеристики плазматических мембран клеток почек сирийского хомячка в различных условиях замораживания клеточной суспензии.

Концентрация глицерина, С, моль/л	Скорость охлаждения			
	$1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$		$5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	
	$L_{pg}, 10^{-13} \text{ м}^3/\text{Нс}$	$k_{pg}, 10^{-8} \text{ м/с}$	$L_{pg}, 10^{-13} \text{ м}^3/\text{Нс}$	$k_{pg}, 10^{-8} \text{ м/с}$
0,34	$0,846 \pm 0,072$ (n=25)	$0,667 \pm 0,032$	$1,410 \pm 0,130$ (n=22)	$1,110 \pm 0,230$
0,68	$0,635 \pm 0,038$ (n=29)	$0,500 \pm 0,044$	$0,769 \pm 0,048$ (n=27)	$0,606 \pm 0,014$
1,37	$0,052 \pm 0,004$ (n=26)	$0,041 \pm 0,007$	$0,159 \pm 0,029$ (n=25)	$0,125 \pm 0,052$

Примечание: различия между значениями статистически достоверны ($P > 0,999$).

суспензии по одноэтапной программе эта зависимость носит линейный характер:

$$L_{pg} = 11,3760 - 1,0741C, \quad k_{pg} = 8,9655 - 0,8467C;$$

по двухэтапной – логарифмический:

$$L_{pg} = 22,3170 - 9,0241 \ln(C), \quad k_{pg} = 17,5720 - 7,1053 \ln(C)$$

Коэффициенты проницаемости L_p и k_p связаны соотношением:

$$k_p = (1-\sigma) \frac{L_p R T}{K_0},$$

где U – парциальный молярный объем растворенного вещества, K – константа, определенная для данной мембраны и данного растворенного вещества [180, 181, 482]. Поэтому, естественно, что их зависимости от условий замораживания клеточной суспензии аналогичны.

В соответствии с теоретическими представлениями работы [5] коэффициент проницаемости мембраны для молекул проникающего криопротектора k_{pg} однозначно зависит от температуры согласно уравнению Аррениуса и не зависит от скорости охлаждения. В табл. 8.2 приведены литературные данные о коэффициентах проницаемости плазматических мембран различных типов клеток для молекул воды L_{pg} в зависимости от скорости охлаждения и концентрации криопротекторов. Анализ показывает, что однозначной корреляции между коэффициентом проницаемости L_{pg} и скоростью охлаждения нет. Имеет место как его независимость от скорости охлаждения (сперматозоиды мышей, гепатоциты крыс), так и повышение (сперматозоиды устрицы, коня) или снижение (сперматозоиды человека, хряка) при увеличении скорости охлаждения. Однако для всех представленных типов клеток в присутствии криопротекторов и при увеличении их концентрации в среде замораживания гидравлическая проницаемость закономерно снижается.

Уменьшение эффективного коэффициента проницаемости мембран для молекул глицерина k_{pg} с увеличением исходной концентрации раствора (табл. 8.1) может быть обусловлено понижением температуры кристаллизации внеклеточного раствора при возрастании концентрации криопротектора в криозащитной среде (в соответствии с законом Аррениуса). Другие расхождения экспериментальных и расчетных данных, по-видимому, объясняются не учтенными в теоретическом алгоритме расчета эффектами кривизны кристаллов льда, образующихся в процессе замораживания клеточной суспензии, и

Таблица 8.2

Проницаемость плазматических мембран клеток для воды при субнулевых температурах (литературные данные).

Объект	Среда замораживания	Скорость охл. (°C/мин)	Коэффициент проницаемости L _{pg} , м³/Нс (мкм/мин атм)	Энергия активации E _{Lp,к} Дж/моль (ккал/моль)	Оптимальная скорость охлаждения (°C/мин)	Ист. метод
1	2	3	4	5	6	7
сперматозоиды человека	Буферный раствор(BWW)	5 10	3,70×10 ⁻¹⁴ (0,220) 1,90×10 ⁻¹⁴ (0,110)	391,2 (93,5) 312,5 (74,7)	14,0	[164] ДСК
	6,0% глицерин +10% яичного желтка в BWW	5 10	1,01×10 ⁻¹⁴ (0,060) 0,67×10 ⁻¹⁴ (0,040)	194,6 (46,5) 131,8 (31,5)	16,0	
сперматозоиды мыши	Буферный раствор (D-PBS)+15% яичного желтка	5 20	1,70×10 ⁻¹⁵ (0,010) 1,70×10 ⁻¹⁵ (0,010)	211,5 (50,6) 85,7 (20,5)	39,0	[158] ДСК
	1,0% глицерин+6,0% раффинозы+15,0% яичного желтка в D-PBS	5 20	1,36×10 ⁻¹⁵ (0,008) 1,53×10 ⁻¹⁵ (0,009)	143,5 (34,3) 112,6 (26,9)	26,0	
	4,0% глицерин+16% раффинозы +15% яичного желтка в D-PBS	5 20	0,68×10 ⁻¹⁵ (0,004) 0,68×10 ⁻¹⁵ (0,004)	83,7 (20,0) 50,6 (12,1)	44,0	
сперматозоиды собаки	без криопротектора	5 10	0,61×10 ⁻¹⁵ (0,0036) 0,49×10 ⁻¹⁵ (0,0029)	109,9 (26,3) 58,5 (14,0)	27,0	[169] ДСК
	0,5% глицерин	5 10	0,56×10 ⁻¹⁵ (0,0033) 0,51×10 ⁻¹⁵ (0,0030)	82,4 (19,7) 54,33 (13,0)	33,0	
	3,0% глицерин	5 10	0,51×10 ⁻¹⁵ (0,0030) 0,51×10 ⁻¹⁵ (0,0030)	61,0 (14,6) 43,1 (10,3)	32,0	
	6,0% глицерин	5	0,51×10 ⁻¹⁵ (0,0030)	99,0 (23,9)	9,0	
		10	0,94×10 ⁻¹⁵ (0,0055)	130,8 (31,3)		
	0,5% ДМСО	5 10	0,56×10 ⁻¹⁵ (0,0033) 0,46×10 ⁻¹⁵ (0,0027)	98,2 (23,5) 54,8 (13,1)	29,0	
	3,0% ДМСО	5 10	0,68×10 ⁻¹⁵ (0,0040) 0,48×10 ⁻¹⁵ (0,0028)	74,8 (17,9) 46,8 (11,2)	29,0	

Продолжение табл. 8.2

1	2	3	4	5	6	7
сперматозоиды устрицы Crassostrea gigas, diploid (haploid sperm)	без криопротектора	5	$0,27 \times 10^{-15}$ (0,0015)	61,9(14,8)	53,0	[204] ДСК
		20	$0,36 \times 10^{-15}$ (0,0020)	41,8(10,0)		
	8% ДМСО	5	$0,23 \times 10^{-15}$ (0,0013)	51,4(12,3)		
		20	$0,37 \times 10^{-15}$ (0,0021)	45,6(10,9)		
		5	$0,27 \times 10^{-15}$ (0,0015)	43,1(10,3)		
		20	$0,50 \times 10^{-15}$ (0,0028)	50,2(12,0)		
сперматозоиды устрицы Crassostrea gigas, tetraploid (diploid sperm)	без криопротектора	5	$0,30 \times 10^{-15}$ (0,0017)	41,3(10,3)	43,0	
		20	$0,37 \times 10^{-15}$ (0,0021)	41,4(9,9)		
	8% ДМСО	5	$0,30 \times 10^{-15}$ (0,0017)	41,3(10,3)		
		20	$0,37 \times 10^{-15}$ (0,0021)	41,4(9,9)		
		5	$0,30 \times 10^{-15}$ (0,0017)	41,3(10,3)		
		20	$0,37 \times 10^{-15}$ (0,0021)	41,4(9,9)		
сперматозоиды хряка	без криопротектора	5	$5,4 \times 10^{-15}$ (0,03)	151,0(36,1)	43,0	[171] ДСК
		20	$3,6 \times 10^{-15}$ (0,02)	120,0(28,7)		
	6% глицерин	5	$1,62 \times 10^{-15}$ (0,009)	117,5(28,1)		
		20	$1,08 \times 10^{-15}$ (0,006)	72,3(17,3)		
		5	$1,62 \times 10^{-15}$ (0,009)	117,5(28,1)		
		20	$1,08 \times 10^{-15}$ (0,006)	72,3(17,3)		
сперматозоиды рыбы Xiphophorus helleri	HBSS(Hank's)	20	$0,78 \times 10^{-15}$ (0,0046)	50,10(11,97)	89,0	[205] ДСК
		20	$1,06 \times 10^{-15}$ (0,0063)	83,80(20,04)		
		20	$1,40 \times 10^{-15}$ (0,0083)	91,00(21,75)		
	HBSS+14%глицерин	20	$1,06 \times 10^{-15}$ (0,0063)	83,80(20,04)		
		20	$1,40 \times 10^{-15}$ (0,0083)	91,00(21,75)		
		20	$1,40 \times 10^{-15}$ (0,0083)	91,00(21,75)		
сперматозоиды рыбы Xiphophorus maculatus	HBSS	20	$1,59 \times 10^{-15}$ (0,0093)	121,2(29,0)	28,0	[207] ДСК
		20	$0,91 \times 10^{-15}$ (0,0050)	40,9(9,8)		
		20	$0,99 \times 10^{-15}$ (0,0060)	67,3 (16.1)		
	HBSS+14%глицерин	20	$0,91 \times 10^{-15}$ (0,0050)	40,9(9,8)		
		20	$0,99 \times 10^{-15}$ (0,0060)	67,3 (16.1)		
		20	$0,99 \times 10^{-15}$ (0,0060)	67,3 (16.1)		
сперматозоиды коня	среда Kenney	5	$0,374 \times 10^{-14}$ (0,022)	283,82 (67,9)	29,0	[207] ДСК
		20	$0,561 \times 10^{-14}$ (0,033)	197,29 (47,2)		
	Lactose+EDTA+2,5%(0,34M) глицерин	5	$0,119 \times 10^{-14}$ (0,007)	112,86(27,0)		
		20	$0,136 \times 10^{-14}$ (0,008)	45,56(10,9)		
		5	$0,119 \times 10^{-14}$ (0,007)	112,86(27,0)		
		20	$0,136 \times 10^{-14}$ (0,008)	45,56(10,9)		
EBVT лимфоциты человека	физиологическая среда суспендирования	5,0	$0,170 \times 10^{-13}$ (0,10)	67,72(16,2)	-	[199] криомикро- скопия
		10,0	$0,153 \times 10^{-13}$ (0,09)	62,70 (15,0)	-	
		20,0	$0,187 \times 10^{-13}$ (0,11)	64,37 (15,4)	-	
	среда Williams E	5,10,20	$4,330 \times 10^{-13}$ (2,69)	317,0 (75,9)	-	
		5,10,20	$0,873 \times 10^{-13}$ (0,542)	137,0 (32,8)	-	
		5,10,20	$0,715 \times 10^{-13}$ (0,444)	107,0 (25,7)	-	
гепатоциты крысы Sprague- Dawley	среда Williams E	5,10,20	$4,330 \times 10^{-13}$ (2,69)	317,0 (75,9)	-	[197] криомикрос- копия
	1М ДМСО	5,10,20	$0,873 \times 10^{-13}$ (0,542)	137,0 (32,8)	-	
	2М ДМСО	5,10,20	$0,715 \times 10^{-13}$ (0,444)	107,0 (25,7)	-	

Продолжение табл.8.2

1	2	3	4	5	6	7.
кератиноциты человека	физиологическая среда Дюльбекко	-	$0,058 \times 10^{-13}$ (0,035)	44,8 (10,69)	-	[191] криомикроскопия*
гранулоциты человека	физиологическая среда	-	$0,27 \times 10^{-13}$ (0,1664)	49,74 (11,9)	-	[187,194,195] криомикроскопия*
моноциты человека	1М ДМСО	-	$0,021 \times 10^{-13}$ (0,013)	59,77(14,3)	-	[187,192,193] криомикроскопия*
Эмбрионы коровы (от одноклеточного до стадии бластоцисты)	физиологическая среда	-	$1,15 \times 10^{-13}$ (0,70)	50,16 (12,0)	-	[189,190] криомикроскопия*
Эмбрионы мыши (от одноклеточного до стадии бластоцисты)	физиологическая среда	-	$0,82 \times 10^{-13}$ (0,50)	41,8 (10,0)	-	[189,190] криомикроскопия*
ткань печени древесной лягушки <i>Rana sylvatica</i>	фосфатный буфер (PBS)	5,0	$2,99 \times 10^{-13}$ (1,76)	315,59 (75,5)	-	[201,208] ДСК
	культуральная среда RPMI	5,0	$3,67 \times 10^{-13}$ (2,16)	320,60(76,7)	-	
	среда RPMI+0,4М глюкоза	5,0	$2,00 \times 10^{-13}$ (1,18)	288,42(69,0)	-	
ткань печени крысы Sprague-Dawley	физиологическая среда	5,0	$3,16 \times 10^{-13}$ (1,90)	265,0 (63,4)	-	[202,203] ДСК
опухолевая ткань матки	физиологическая среда	5,0	$1,17 \times 10^{-13}$ (0,70)	191,3 (45,7)	-	[200] ДСК
		20,0	$0,74 \times 10^{-13}$ (0,44)	94,2 (22,5)	-	
гепатоциты свиньи	-	-	$0,24 \times 10^{-13}$ (0,384)	330,0 (71,6)	-	[543] теор. модель

изменение объема клеток контролировалось при постоянных дискретных температурах после нуклеации льда

переохлаждения, неизбежно возникающего в тонкой пленке кристаллизующегося раствора. В соответствии с полученными результатами скорость охлаждения при более низких концентрациях криопротектора влияет на кривизну образующихся кристаллов льда значительней, чем при высоких концентрациях. Другими словами, повышение исходной концентрации криопротектора во внеклеточной среде влияет на кривизну внеклеточных кристаллов сильнее, чем скорость охлаждения. В результате этого эффект зависимости кривизны кристаллов от скорости охлаждения при больших исходных концентрациях криопротектора нивелируется. Поскольку в процессе замораживания мембрана претерпевает существенные физико-химические изменения, то даже и в том случае, когда они не приводят к ее однозначному повреждению, предположение о сохранении интактности мембраны может внести коррективы в расхождение между экспериментальными и расчетными данными. Возможно, что значения транспортных характеристик мембран зависят и от скорости потоков через них воды и криопротектора. Искажение формы клеточной мембраны в процессе обезвоживания также может влиять на скорость массообмена между клетками и окружающей их средой вследствие диффузионных ограничений в примембранных слоях жидкости.

Тем не менее, несмотря на отмеченные выше расхождения между теоретическими и расчетными данными, степень их совпадения, учитывая принятые в теоретической модели приближения, можно считать вполне удовлетворительной.

8.2. Теоретическое прогнозирование оптимальных скоростей охлаждения клеток почек сирийского хомячка

Как было сказано выше, наиболее адекватно поведение биологической системы при замораживании описывают транспортные характеристики, определенные при наибольшей скорости охлаждения, при которой доминирующим биофизическим ответом клеток является обезвоживание.

Используя экспериментально измеренные параметры проницаемости L_{pg} и k_{pg} при $5^\circ\text{C}/\text{мин}$, методом численного моделирования нами были получены кинетические кривые изменения объема клеток почек сирийского хомячка при скоростях охлаждения суспензии в интервале $5\text{--}100^\circ\text{C}/\text{мин}$ в присутствии 0,34 М и 0,68 М глицерина и спрогнозированы наиболее вероятные оптимальные скорости охлаждения данного типа клеток [539].

Критерием оценки оптимальной скорости охлаждения может служить максимально допустимый, безопасный уровень обезвоживания клеток. Р. Mazur [540] показал, что повреждающий яйцеклетки и эмбрионы внутриклеточный лед возникает в том случае, если при обезвоживании в них остается более 10–15% воды. При определении прогнозируемой оптимальной скорости охлаждения сперматозоидов ряда млекопитающих оптимальной считалась та, при замораживании с которой в клетках остается не более 5% исходного объема воды, при этом температурный предел принимался либо -15°C [541], либо -30°C [158, 164, 169, 171]. Известно, что при температуре -30°C образование внутриклеточного льда в биологических объектах неизбежно происходит гомогенным механизмом [59, 125, 542]. Данную температуру можно рассматривать как предельную, до достижения которой теоретически возможно обезвоживание клеток.

На рис. 8.4 приведены кинетические кривые изменения клеточного объема клеток почек сирийского хомячка, рассчитанные с использованием вышеописанной термодинамической модели и определенных транспортных характеристик L_{pg} и k_{pg} . Моделирование транспорта воды при разных скоростях охлаждения позволило оценить процент внутриклеточной воды, остающейся в клетках при температуре -30°C , пользуясь соотношением:

$$\frac{V - V_b}{V_0 - V_b} \times 100\%,$$

где V – объем клетки при -30°C ; V_b – осмотически неактивный объем; V_0 – исходный объем клетки. Прогнозируемые оптимальные скорости охлаждения были определены графически на основании данных, представленных на рис. 8.5.

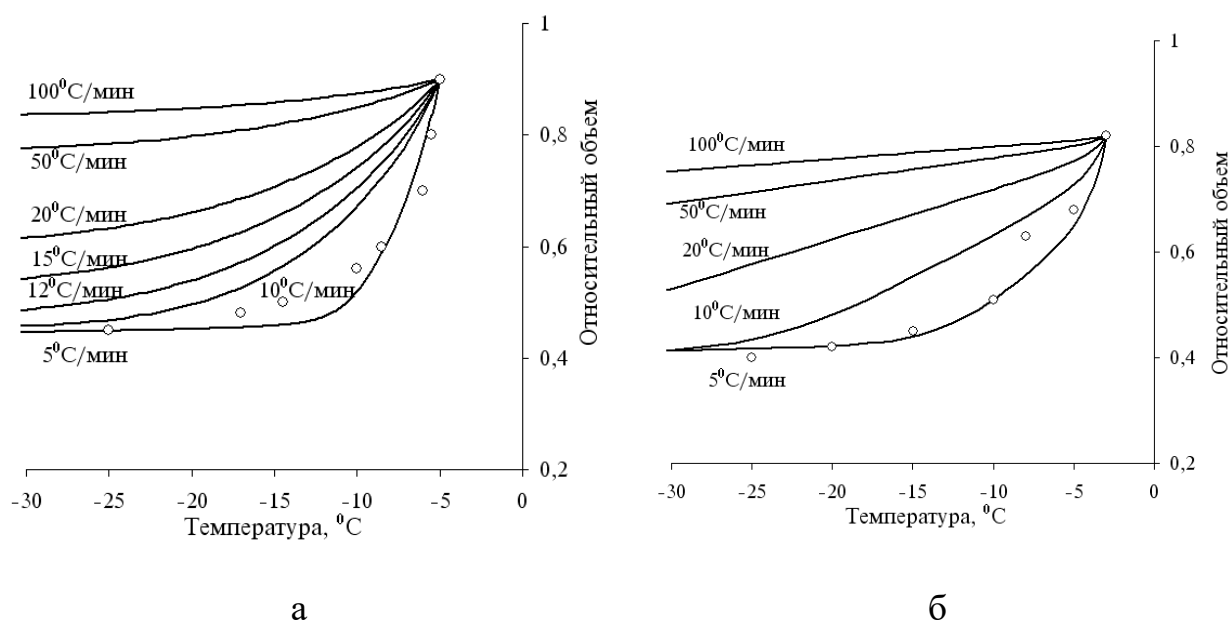


Рис. 8.4. Кинетические кривые изменения относительного объема клеток почек сирийского хомячка при различных скоростях охлаждения в присутствии глицерина в среде: а – 0,34 М, б – 0,68 М. Сплошные линии – расчетные данные, о – экспериментальные данные.

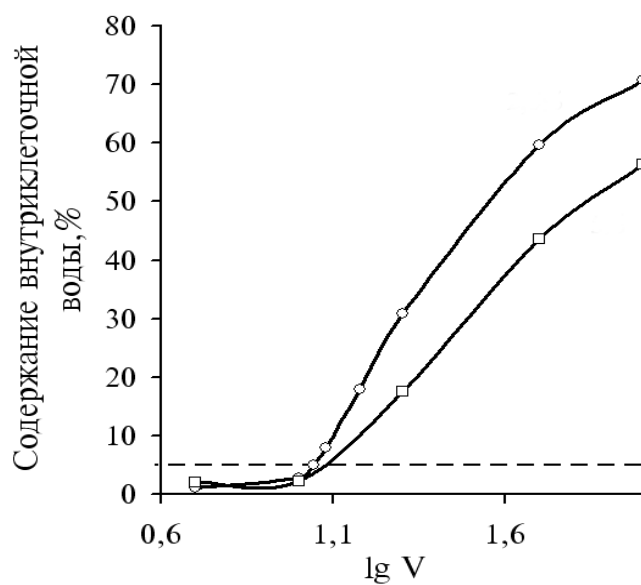


Рис. 8.5. Прогнозируемое содержание воды в клетках почек сирийского хомячка при температуре – 30°C в зависимости от скорости охлаждения и концентрации глицерина в среде: о – 0,34 М, □ – 0,68 М.

При концентрации глицерина в суспензионной среде 0,34 М и 0,68 М прогнозируемые оптимальные скорости охлаждения соответственно составляют не более 11°C/мин и 12°C/мин. Реально внутриклеточный лед может возникнуть гетерогенным механизмом при температурах гораздо выше –30°C. При этих температурах, обычно в интервале –5...–20°C, потенциально в клетках остается значительно больше воды, чем по результатам проведенной оценки. В связи с этим, полученные прогнозируемые скорости являются несколько завышенными. Однако важность их определения состоит в том, что они позволяют существенно ограничить интервал экспериментального уточнения скоростей охлаждения максимально оптимизирующих процесс криоконсервирования.

8.3. Выводы

Проведенные в данном разделе исследования показали, что, несмотря на целый ряд допущений, принятых в рассмотренной физико-математической модели, степень расхождений между экспериментальными и теоретическими кривыми изменения относительных клеточных объемов составляет менее 10%. Это позволяет считать использование данной модели для определения транспортных характеристик плазматических мембран ядерных клеток в области субнулевых температур вполне адекватным. Предложенная теоретическая модель может быть также использована для расчета важных с криобиологической точки зрения эффектов обезвоживания клеток, их переохлаждения и концентрирования внеклеточных и внутриклеточных веществ. Более того, совместное проведение экспериментальных исследований и расчетов, аналогичных описанным, может быть использовано для оценки концентрации внутриклеточных веществ и эффективного переохлаждения цитоплазмы, исходя только из данных о зависимости изменения объема клеток от температуры в процессе замораживания.

Количественная оценка транспортных характеристик плазматических мембран клеток почек сирийского хомячка в области субнулевых температур

позволила разработать алгоритм прогнозирования оптимальных скоростей охлаждения, который может быть использован при экспресс поиске оптимальных скоростей охлаждения любого типа ядерных клеток.

Материалы раздела 8 опубликованы в работах [538, 539]

ВЫВОДЫ

В работе на основе сочетания теоретического и экспериментального моделирования решена научная проблема, связанная с установлением механизмов зарождения и роста внеклеточных кристаллов льда, механизмов влияния криопротекторов на кинетические характеристики процесса льдообразования, а также механизмов повреждения ряда биологических объектов физико–химическими факторами, которые возникают и действуют при изменении агрегатного состояния в криоконсервированных образцах. Теоретически обоснованы и экспериментально апробированы способы определения численных значений биофизических параметров плазматических мембран клеток, которые необходимы для контроля условий трансмембранного массопереноса веществ в широком температурном диапазоне при определении оптимальных режимов консервирования.

1. Впервые доказано, что процесс нуклеации льда в модели внеклеточной среды на основе лиофилизированной плазмы крови человека практически полностью протекает по гетерогенному механизму в исследованном диапазоне переохлаждений и скоростей охлаждения, причем вклад гетерогенной нуклеации составляет 98,7%.

2. Впервые установлено, что в биологических растворах механизм роста внеклеточных кристаллов льда и механизм формирования внеклеточной морфологической структуры льда различной дисперсности обусловлен как нормальной, так и дислокационной составляющей роста реальных кристаллов. Оба механизма роста кристаллов льда ингибируются при увеличении концентрации криопротекторов в маточном растворе, но дислокационная составляющая ингибируется сильнее, чем нормальная. По ингибирующей активности нормальной составляющей исследованные криопротекторы располагаются в ряд: ЭГ > ПЭГ-1500 > ДМСО > ПВП-12000, а дислокационной – ЭГ > ДМСО > ПВП-12000 > ПЭГ-1500.

3. Выявлено, что увеличение концентрации ЭГ, ДМСО и ПЭГ-1500 в

растворе понижает скорость образования центров роста кристаллов льда. ПВП-12000 при низких концентрациях способен активировать процесс зародышеобразования путем снижения поверхностной энергии на границе раздела фаз в результате адсорбции его молекул на растущей грани кристалла, а при высоких концентрациях – ингибировать процесс за счет прочного связывания молекул воды и увеличения вязкости раствора в пограничном слое на границе раздела твердой и жидкой фаз.

4. Установлено, что при кристаллизации биологических растворов переохлаждение является наиболее сильным фактором, влияющим на скорость роста и размер внеклеточных кристаллов льда. При заданном переохлаждении существуют критические концентрации криопротекторов, при достижении которых меняется механизм их ингибирующего влияния на дисперсность кристаллической фазы. При концентрации криопротекторов ниже критической превалирует ингибирование скорости роста грани кристалла, при концентрации выше критической – ингибирование скорости образования центров роста.

5. Методом низкотемпературной рентгенографии установлено, что при замораживании биологических растворов в кристаллической структуре льда образуются дефекты различного типа, которые являются источниками деформационных напряжений, и релаксация которых может явиться источником механического повреждения клеток в зоне низких температур.

6. Показано, что наиболее вероятным фактором повреждения спермиев человека при охлаждении со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ является рекристаллизация внеклеточного льда. Криомикроскопически обоснована наиболее эффективная двухэтапная программа замораживания спермиев человека под защитой 1,37 М глицерина.

7. Установлено, что наиболее эффективным способом ингибирования вне – и внутриклеточного льдообразования при медленных скоростях замораживания ($5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) эмбрионов мышей ранних стадий развития является сочетание предварительной поэтапной дегидратации и насыщения клеток проникающим криопротектором. Криозащитная среда, представляющая собой смесь 5,37 М ЭГ

и 0,7 М сахарозы, может быть использована для криоконсервирования эмбрионов мышей ранних стадий развития, поскольку способна стекловаться даже при медленных скоростях замораживания.

8. Выяснено, что в растворах низкомолекулярных неэлектролитов (этанол 1,2-ПД, глицерин), характеризующихся высоким значением коэффициента распределения $Q \approx 1$, преобладают явления кренирования и сферуляции эритроцитов, а в растворах высокомолекулярных неэлектролитов (ПЭГ-400, 600, 1500), для которых $Q \approx 0,5$, трансформация эритроцитов сопровождается планоцитозом и образованием инвагинированных форм. Коэффициент распределения Q между вне – и внутриклеточной средой для низкомолекулярных спиртов убывает в ряду этанол > 1,2-пропандиол > глицерин.

9. Определено, что эритроциты пуповинной крови человека теряют устойчивость к гиперосмотическому воздействию в 2,3 М водном растворе NaCl после 7 мин экспозиции. Повышенную чувствительность к охлаждению эритроциты пуповинной крови приобретают при концентрации NaCl выше 0,85 М. Охлаждение снижает критические концентрации потери устойчивости клеток к гипертонии более чем в два раза.

10. Установлено, что в области концентраций 0,85 – 1,28 М NaCl (1550 – 2512 мОсм/л), трансформация эритроцитов человека при обезвоживании сопровождается существенным изменением рельефа клеточной поверхности и элиминацией во внеклеточную среду гликопротеинов в результате частичной деструкции гликокаликса, что является пусковым механизмом криогемолиза.

11. Показано, что развитие патологического процесса при вибрационной болезни сопровождается прогрессивным увеличением в периферической крови больных количества стоматоцитов и что снижение гипотермической устойчивости формы эритроцитов может служить диагностическим тестом степени выраженности патологического процесса.

12. Установлено, что постгипертонический лизис гепатоцитов крыс обусловлен флуктуационным образованием макроскопической липидной поры в плазматической мембране, которая способна к “самозалечиванию”, что

подтверждается сохранением мембраной свойства избирательной проницаемости при значительном растяжении и после сброса мембранного напряжения.

13. На основе теории деформации биологических мембран получено уравнение, которое с учетом экспериментально измеренных морфометрических параметров любого типа клеток позволяет определить модуль упругости изотропного растяжения их мембран. Установлено, что мембраны гепатоцитов крыс способны испытывать аномально большое (свыше 100%) растяжение без образования макроскопического разрыва. Модуль изотропного растяжения мембраны гепатоцитов крыс составляет примерно $8,0 \times 10^{-3}$ Н/м.

14. Определены значения коэффициентов проницаемости плазматических мембран гепатоцитов крыс для молекул воды и ДМСО. Установлено, что при одинаковых осмотических нагрузках (2246 – 2250 мОсм/л) в присутствии проникающего криопротектора ДМСО коэффициент фильтрации L_p на три порядка ниже $((4,45 \pm 0,04) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Нс})$, чем в присутствии непроникающего хлорида натрия $((2,25 \pm 0,25) \times 10^{-11} \text{ м}^3/\text{Нс})$.

15. Обоснован метод определения коэффициента фильтрации L_{pg} и коэффициента проницаемости k_{pg} плазматических мембран любого типа клеток при субнулевых температурах, разработан и экспериментально подтвержден алгоритм теоретического прогнозирования оптимальной скорости охлаждения клеток.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pegg D. E. Principles of cryopreservation / D. E. Pegg // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – V. 368. – P. 39–57.
2. Pegg D. E. The History and Principles of Cryopreservation / D. E. Pegg // *Seminars in reproductive medicine.* – 2002. – V. 20, № 1. – P. 5–13.
3. Фуллер Б. Криоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетия / Б. Фуллер, К. Грин, В. И. Грищенко // *Пробл. криобиологии.* – 2003. – № 2. – С. 62–83.
4. Gao D. Mechanisms of cryoinjury in living cells / D. Gao, J. K. Critser // *ILAR J.* – 2000. – V. 41, № 4. – P. 187–196.
5. Гордиенко Е. А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / Е. А. Гордиенко, Н. С. Пушкарь. – К. : Наук. думка, 1994. – 143 с.
6. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах / [Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Иткин Ю. А. и др.] ; отв. ред. Е. Я. Панков. – К. : Наукова думка, 1977. – 243 с.
7. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: principle, literature review and preliminary of our own experiments / J. Bakhach, V. Casoli, J. C. Guimberteau // *Ann Chir Plast Esthet.* – 2007. – V. 52, № 5. – P. 531–47.
8. Зацепина Г. Н. Свойства и структура воды / Зацепина Г. Н. – М. : Изд-во Московского университета, 1974. – 167 с.
9. Mazur P. A two-factor hypothesis of freezing injury / P. Mazur, S. P. Leibo, E. N. Y. Chu // *Exp. Cell Res.* – 1972. – V. 71, № 2. – P. 345–355.
10. Lovelock J. E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing / J. E. Lovelock // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1953. – V. 10, № 3. – P. 414–426.
11. Muldrew K. Investigations into quantitative post-hypertonic lysis theory using cultured fibroblasts / K. Muldrew, J. P. Acker, R. Wan // *Cryobiology.* – 2000. –

V. 41, № 4. – P. 337.

12. Meryman H. T. The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury / H. T. Meryman // *The Frozen Cell. CIBA Foundation Symposium* ; Ed. G. E. W. O'Connor. – London : Churchill Press, 1970. – P. 565–569.

13. Fahy G. M. Analysis of “solution effects” injury. Equations for calculation phase diagram information for the ternary systems NaCl - dimethylsulfoxide – water and NaCl-glycerol-water / G. M. Fahy // *Biophys J.* – 1980. – V. 32, № 2. – P. 837–850.

14. Mazur P. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes / P. Mazur, K. W. Cole // *Cryobiology.* – 1985. – V. 22, № 6. – P. 509–536.

15. Nei T. Mechanism of freezing injury to erythrocytes: Effect of initial cell concentration on the post-thaw hemolysis / T. Nei // *Cryobiology.* – 1981. - V. 18, № 3. – P. 229–237.

16. Pegg D. E. On the mechanism of injury of slowly frozen erythrocytes / D. E. Pegg, M. Daiper // *Biophys. J.* – 1988. – V. 54, № 3. – P. 471–488.

17. Effects of cell concentration on viability and metabolic activity during cryopreservation / W. De Loecker, V. Koptelov, V. I. Grischenko, P. De Loecker // *Cryobiology.* – 1998. – V. 37, № 1. – P. 103–109.

18. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications / P. Mazur // *Am. J. Physiol.* – 1984. – V. 247, № 3, Pt. 1. – P. 125–142.

19. Mazur P. Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in volume in the survival of frozen human erythrocytes / P. Mazur, K. W. Cole // *Cryobiology.* – 1989. – V. 26, № 1. – P. 1–29.

20. Розанов Л. Ф. Криомикроскопическое изучение процессов замораживания и отогрева клеточных суспензий : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук : спец. 03.00.02 “Биофизика” / Л. Ф. Розанов. – Киев, 1977. – 23 с.

21. Кулешова Л. Г. Роль структуры внеклеточного льда в процессе

криоповреждения клеток / Л. Г. Кулешова, Л. Ф. Розанов // Моделирование криобиологических процессов : [сб. науч. трудов / отв. ред. Е. А. Гордиенко]. – Харьков, 1988. – С. 25–34.

22. Steponkus P. L. Cryomicroscopy of isolated rye mesophyll cells / P. L. Steponkus, R. J. Evans, J. Singh // *Cryo-Letters*. – 1982. – V. 3, № 2. – P. 101–114.

23. Extra – and intracellular ice formation in mouse oocytes / P. Mazur, S. Seki, I. L. Pinn [et al.] // *Cryobiology*. – 2005. – V. 51, № 1. – P. 29–53.

24. Extra – and intracellular ice formation in Stage I and II *Xenopus laevis* oocytes / J. F. Guenther, S. Seki, F. W. Kleinhans [et al.] // *Cryobiology*. – 2006. – V. 52, № 3. – P. 401–416.

25. Koshimoto C. Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose / C. Koshimoto, E. Gamliel, P. Mazur // *Cryobiology*. – 2000. – V. 41, № 3. – P. 204–231.

26. Кулешова Л. Г. Кинетика льдообразования в живых клетках и модельных системах : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук : спец. 03.00.22 “Криобиология” / Л. Г. Кулешова. – Харьков, 1983. – 24 с.

27. Козлова О. Г. Морфолого-генетический анализ кристаллов / Козлова О. Г. – М. : Изд-во МГУ, 1991. – 224 с.

28. Takamatsu H. Viability of deformed cells / H. Takamatsu, B. Rubinsky // *Cryobiology*. – 1999. – V. 39, № 3. – P. 243–251.

29. Koushafar H. Effect of antifreeze proteins on frozen primary prostatic adenocarcinoma cells / H. Koushafar, B. Rubinsky // *Urology*. – 1997. – V. 49, № 3. – P. 421–425.

30. Ishiguro H. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification / H. Ishiguro, B. Rubinsky // *Cryobiology*. – 1994. – V. 31, № 5. – P. 483–500.

31. Mazur P. Relative contribution of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen erythrocytes / P. Mazur, W. F. Rall, N. Rigopoulos // *Biophys. J.* – 1981. – V. 36, № 3. – P. 653–675.

32. Mazur P. Contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate / P. Mazur, N. Rigopoulos // *Cryobiology*. – 1983 – V. 20, № 3. – P. 274–289.

33. Pegg D. The “unfrozen fraction” hypothesis of freezing injury to human erythrocytes: a critical examination of the evidence / D. Pegg, M. Diaper // *Cryobiology*. – 1989. – V. 26, № 1. – P. 30–40.

34. Quantitative examination of a perfusion microscope for the study of osmotic response of cells / H. Takamatsu, Y. Komori, S. Zawlodzka, M. Fujii // *J. Biomech. Eng.* – 2004. – V. 126. – P. 402–409.

35. Zawlodzka S. Osmotic injury of PC-3 cells by hypertonic NaCl solutions at temperature above 0°C / S. Zawlodzka, H. Takamatsu // *Cryobiology*. – 2005. – V. 50, № 1. – P. 58–70.

36. Takamatsu H. Contribution of extracellular ice formation and the solution effects to the freezing injury of PC-3 cells suspended in NaCl solutions / H. Takamatsu, S. Zawlodzka // *Cryobiology*. – 2006 – V. 53, № 1. – P. 1–11.

37. On the mechanism of cell lysis by deformation / H. Takamatsu, R. Takeya, S. Naito, H. Sumimoto // *J. Biomech.* – 2005. – V. 38. – P. 117–124.

38. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood intracellular freezing / P. Mazur // *J. Gen. Physiol.* – 1963. – V. 47. – P. 347–369.

39. Acker J. P. Membrane damage occurs during the formation of intracellular ice / J. P. Acker, L. E. McGann // *Cryo Letters*. – 2001. – V. 22, № 4. – P. 241–254.

40. Mazur P. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells / P. Mazur // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1965. – V. 125. – P. 658–676.

41. The aqueous pore in the red blood cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water / A. K. Solomon, B. Chasan, J. A. Dix [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1983. – V. 414. – P. 97–124.

42. Water transport across mammalian cell membranes / A. S. Verkman, A. N. Hoek, T. Ma [et al.] // *Amer. J. Physiol Cell Physiol.* – 1996. – V. 270, № 1. – P. 12–30.

43. Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in vitreous ice / G. Ren, V. S. Reddy, A. Cheng [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – V. 98, № 4. – P. 1398–1403.
44. The architecture of a water-selective pore in the lipid bilayer visualized by electron crystallography in vitreous ice / A. K. Mitra, G. Ren, V. S. Reddy [et al.] // *Novartis Found Symp.* – 2002. – V. 245. – P. 33–46.
45. Toner M. Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells / M. Toner, E. G. Cravalho, M. Karel // *J. Appl. Phys.* – 1990. – V. 67. – P. 1582–1593.
46. Mazur P. The temperature of intracellular ice formation in mouse oocytes vs. the unfrozen fraction at that temperature / P. Mazur, I. L. Pinn, F. W. Kleinhans // *Cryobiology.* – 2007. – V. 54, № 2. – P. 223–233.
47. Mazur P. Relationship between intracellular ice formation in oocytes of the mouse and *Xenopus* and the physical state of the external medium – a revisit / P. Mazur, F. W. Kleinhans // *Cryobiology.* – 2008. – V. 56, № 1. – P. 22–27.
48. Muldrew K. Mechanisms of intracellular ice formation / K. Muldrew, L. E. McGann // *Biophys. J.* – 1990. – V. 57, № 3. – P. 525–532.
49. Toner M. Water transport and estimated transmembrane potential during freezing of mouse oocytes / M. Toner, E. G. Cravalho, D. R. Armant // *J Membr. Biol.* – 1990. – V. 115, № 3. – P. 261–272.
50. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein / G. Preston, T. Carroll, W. Gugginno, P. Agre // *Science.* – 1992. – V. 256, № 5055. – P. 385–387.
51. The possible influence of osmotic poration on cell membrane water permeability / K. Muldrew, J. Schachar, P. Cheng [et al.] // *Cryobiology.* – 2009. – V. 58, № 1. – P. 62–80.
52. Muldrew K. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury / K. Muldrew, L. E. McGann // *Biophys. J.* – 1994. – V. 66, № 2, Pt. 1. – P. 532–541.
53. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains / A. Tanghe, P. Van

Dijck, F. Dumortier [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 68, № 12. – P. 5981–5989.

54. Edashige K. Expression of mRNAs of the aquaporin family in mouse oocytes and embryos / K. Edashige, M. Sakamoto, M. Kasai // *Cryobiology.* – 2000. – V. 40, № 2. – P. 171–175.

55. Artificial expression of aquaporin–3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation / K. Edashige, Y. Yamaji, F.W. Kleinhans, M. Kasai // *Biol. Reprod.* – 2003. – V. 68, № 1. – P. 87–94.

56. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option / M. Hagedorn, A. Peterson, P. Mazur, F. W. Kleinhans // *Cryobiology.* – 2004 – V. 49, № 2. – P. 181–189.

57. Altering fish embryos with aquaporin–3: an essential step toward successful cryopreservation / M. Hagedorn, S. L. Lance, D. M. Fonseca [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2002. – V. 67, № 3. – P. 961–966.

58. Starfish oocytes form intracellular ice at unusually high temperatures / M. Koseoglu, A. Eroglu, M. Toner, K. C. Sadler // *Cryobiology* – 2001. – V. 43, № 23. – P. 248–259.

59. Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide / J. O. M. Karlsson, E. G. Cravalho, I. H. M. Borel Rinkes [et al.] // *Biophys. J.* – 1993. – V. 65, № 6. – P. 2524–2536.

60. Shimada K. Visualization of intracellular ice crystals formed in very rapidly frozen cells at -27°C / K. Shimada, E. Asahina // *Cryobiology.* – 1975. – V. 12, № 3. – P. 209–218.

61. Han X. Measurement of the size of intracellular ice crystals in mouse oocytes using a melting point depression method and the influence of intracellular solute concentrations / X. Han, J. K. Critser // *Cryobiology.* – 2009. – V. 59, № 3. – P. 302–307.

62. Pegg D. E. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissue and organs / D. E. Pegg // *Cryobiology.* – 2010. – V. 60, № 3 – P. S 36–S 44.

63. Acker J. P. Intercellular ice propagation: experimental evidence for ice

growth through membrane pores / J. P. Acker, J. A. W. Elliott, L. E. McGann // *Biophys. J.* – 2001. – V. 81, № 3. – P. 1389–1397.

64. Irimia D. Kinetics and mechanism of intercellular ice propagation in a micropatterned tissue construct / D. Irimia, J. O. M. Karlsson // *Biophys. J.* – 2002. – V. 82, № 4. – P. 1858–1868.

65. Irimia D. Kinetics of intracellular ice formation in one-dimensional arrays of interaction biological cells / D. Irimia, J. O. M. Karlsson. // *Biophys. J.* – 2005. – V. 88, № 1. – P. 647–660.

66. Intracellular ice formation is affected by cell interactions / J. P. Acker, A. Larese, H. Yang [et al.] // *Cryobiology.* – 1999. – V. 38, № 4 – P. 363–371.

67. Tsuruta T. Effects of glycerol on intracellular ice formation and dehydration of onion epidermis / T. Tsuruta, Y. Ishimoto, T. Masuoka // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 1998. – V. 858. – P. 217–226.

68. Acker J. P. The role of cell-cell contact on intracellular ice formation / J. P. Acker, L. E. McGann. // *Cryo Letters.* – 1998. – V. 19, № 6. – P. 367–374.

69. Berger W. K. Freeze-induced shrinkage of individual cells and cell-to-cell propagation of intracellular ice in cell chains from salivary glands / W. K. Berger, B. Uhrik // *Experientia.* – 1996. – V. 52, № 9. – P. 843–850.

70. Veenstra R. D. Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins / R. D. Veenstra. // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1996. – V. 28, № 4. – P. 327–337.

71. Acker J. P. Cell-cell contact affects membrane integrity after intracellular freezing / J. P. Acker, L. E. McGann // *Cryobiology.* – 2000. – V. 40, № 1. – P. 54–63.

72. A microscale model for prediction of breast cancer cell damage during cryosurgery / A. Zhang, L. X. Xu, G. A. Sandison, J. Zhang // *Cryobiology.* – 2003. – V. 47, № 2. – P. 143–154.

73. Karlsson J. O. M. Theoretical analysis of unidirectional intercellular ice propagation in stratified cell clusters / J. O. M. Karlsson // *Cryobiology.* – 2004. – V. 48, № 3. – P. 357–361.

74. Иткин Ю. А. Изучение влияния структуры льда на процесс

обезвоживания и внутриклеточную кристаллизацию при замораживании клеточной суспензии / Ю. А. Иткин, В. Л. Бронштейн, Л. Ф. Розанов // Криобиология и криомедицина. – 1977. – Вып. 3. – С. 35–41.

75. Rubinsky B. A cryomicroscope using directional solidification for the controlled freezing of biological material / B. Rubinsky, M. Ikeda // Cryobiology. – 1985. – V. 22, № 1. – P. 55–68.

76. Redefining cooling rates in terms of ice front velocity and thermal gradient: First evidence of relevance to freezing injury of lymphocytes / J. Beckman, Ch. Korber, G. Rau [et al.] // Cryobiology. – 1990. – V. 27, № 3. – P. 279–287.

77. Survival of directional solidified B-lymphoblasts under various crystal growth conditions / A. Hubel, E. G. Cravalho, B. Nunner, Ch. Korber // Cryobiology. – 1992. – V. 29, № 2. – P. 183–198.

78. Rubinsky B. Effects of ice crystal habit on the viability of glycerol protected red blood cells / B. Rubinsky, A. L. DeVries // Cryobiology. – 1989. – V. 26, № 6. – P. 580.

79. Ishiguro H. Influence of fish antifreeze proteins on the freezing of cell suspensions with cryoprotectant penetrating cells / H. Ishiguro, B. Rubinsky // Int. J. Heat Mass Transfer. – 1998. – V. 41, № 13. – P. 1907–1915.

80. Antifreeze proteins induce intracellular nucleation / A. Larese, J. Acker, K. Muldrew [et al.] // Cryo-Letters. – 1996. – V. 17, № 3. – P. 175–182.

81. Antifreeze glycoproteins promote intracellular freezing of rat cardiomyocytes at high subzero temperatures / J. A. Mugnano, T. Wang, J. R. J. Layne [et al.] // Am. J. Physiol. – 1995. – V. 269, № 2. – R 474–R 479.

82. Chemical adjuvant cryosurgery with antifreeze proteins / H. Koushfar, L. Pham, C. Lee, B. Rubinsky // J. Surg. Oncol. – 1997. – V. 66, № 2. – P. 114–121.

83. Бронштейн В. Л. Физико-математический анализ повреждения клеток при замораживании: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. физ-мат. наук : спец. 03.00.02 “Биофизика” / В. Л. Бронштейн. – Москва, 1978. – 17 с.

84. Механизм повреждения молочно кислого стрептококка *S. cremoris* T18₁₅ при замораживании / В. Л. Бронштейн, Ю. А. Иткин, Г. Г. Шурда, В. Г. Исерович

// Криобиология и криомедицина. – 1983. – Вып. 12. – С. 35–38.

85. Бриджмен П. В. Физика высоких давлений / Бриджмен П. В. ; пер. с англ. М. П. Воляровича. – М. – Л. : Объедин. науч. – техн. изд-во НКТП СССР, 1935. – 402 с.

86. Осецкий А. И. О возможном механизме повреждения криоконсервируемых биологических объектов за счет пластической релаксации давлений в замкнутых жидкофазных включениях / А. И. Осецкий, А. Л. Кирилук, Т. М. Гурина // Пробл. криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 3. – С. 272–281.

87. Осецкий А. И. Экспериментальное определение пороговых концентраций криопротекторных веществ, обеспечивающих ингибирование механических повреждений криоконсервируемых биообъектов / А. И. Осецкий, А. Л. Кирилук // Пробл. криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 245–247.

88. Применение метода пластической деформации для определения пороговых концентраций криопротекторных веществ при криоконсервировании дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* / А. И. Осецкий, А. Л. Кирилук, Т. М. Гурина, И. П. Высеканцев // Пробл. криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 1. – С. 71–79.

89. Фридель Ж. Дислокации / Фридель Ж. ; пер. с английского под ред А. Л. Ройтбурда. – М. : Мир, 1967. – 643 с.

90. Маэно Н. Наука о льде / Маэно Н. ; пер. с японского А. И. Леонова / под ред. В. Ф. Петренко. – М. : Мир, 1988. – 229 с.

91. Luyet B. Anatomy of the freezing process in physical systems / B. Luyet // Cryobiology ; Ed. H. T. Meryman. – New York : Academic Press, 1966. – P. 115–138.

92. Han B. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing / B. Han, J. C. Bischof // Cryobiology. – 2004. – V. 48, № 1. – P. 8–21.

93. Volmer M. Kinetic der Phasenbildung / Volmer M. – Dresden-Leipzig : Steinkopf, 1939. – 232 s.

94. Turnbull D. Rate of nucleation in condensed systems / D. Turnbull, J. C. Fisher // J. Chem. Phys. – 1949. – V. 17, № 1. – P. 71–73.

95. Turnbull D. Kinetics of heterogeneous nucleation / D. Turnbull // J. Chem.

Phys. – 1950. – V. 18, № 2. – P. 198–203.

96. Turnbull D. Formation of crystal nuclei in liquid metals / D. Turnbull // J. Chem. Phys. – 1950. – V. 21, № 10. – P. 1022–1023.

97. Гиббс Дж. В. Термодинамические работы / Гиббс Дж. В. ; пер. с английского под ред. В. К. Семенченко. – М. – Л. : Государственное издательство технико-теоретической литературы. – 1950. – 492 с.

98. Френкель Я. И. Кинетическая теория жидкостей / Френкель Я. И. – Л. : Наука, 1975. – 592 с.

99. Meryman H. T. Review of biological freezing / H. T. Meryman // Cryobiology ; Ed. H. T. Meryman. – New York : Academic Press, 1966. – P. 1–114.

100. Izutsu K. Effect of cryoprotectants on the eutectic crystallization of NaCl in frozen solutions studied by differential scanning calorimetry (DSC) and broad-line pulsed NMR / K. Izutsu, S. Yoshioka, S. Kojima // Chem. Pharm. Bull. – 1995. – V. 43. – P. 1804–1806.

101. Han B. Phase change behavior of biomedically relevant solutions / B. Han, R. V. Devireddy, J. C. Bischof // ASME 2002 International Mechanical Engineering Congress and Exposition IMECE2002–32549, 2002.

102. The thermodynamics of intracellular ice nucleation in the freezing of erythrocytes / W. M. Toscano, E. G. Cravalho, O. M. Silveiras, C. E. Huggins // J. Heat. Transfer. – 1975. – V. 97. – P. 326–332.

103. Kristiansen J. Leakage of a trapped fluorescent marker from liposomes : effects of eutectic crystallization of NaCl and internal freezing / J. Kristiansen // Cryobiology. – 1992. – V. 29, № 5. – P. 575–584.

104. Chen N. J. Effect of cryoprotectants on eutectics of NaCl–2H₂O/ice and KCl/ice studied by temperature wave analysis and differential scanning calorimetry / N. J. Chen, J. Morikawa, T. Hashimoto // Thermochim. Acta. – 2005. – V. 431. – P. 106–112.

105. Chen N. J. Effect of amino acids on the eutectic behavior of NaCl solutions studied by DSC / N. J. Chen, J. Morikawa, T. Hashimoto // Cryobiology. – 2005. – V. 50, № 3 – P. 264–272.

106. Ogawa S. Inhibition effect of sugar-based amphiphiles on eutectic formation in the freezing-thawing process of aqueous NaCl solution / S. Ogawa, S. Osanai // *Cryobiology*. – 2007. – V. 54, № 2. – P. 173–180.

107. Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons : I. Binary systems water-polyalcohol / P. Boutron, P. Mehl, A. Kaufmann, P. Angibaud // *Cryobiology*. – 1986. – V. 23, № 5. – P. 453–469.

108. Пушкар М. С. Ушкодження біологічних об'єктів при низьких температурах внаслідок термічних напруг / М. С. Пушкар, В. М. Куракса, Є. О. Гордієнко // *Вісник Академії наук УРСР*. – 1987. – № 5. – С. 26–31.

109. Куракса В. М. Исследование метастабильных состояний водных растворов 1,2 – пропандиола и их влияние на повреждение эритроцитов и почки при криоконсервировании : автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.22 “Криобиология” / В. М. Куракса. – Харьков, 1987. – 20 с.

110. Zinchenko V. D. Acoustic emission during cooling and heating of aqueous solutions of polyethylene glycols of molecular masses from 300 to 3000 / V. D. Zinchenko, A. V. Zinchenko // *Cryobiology*. – 2003. – V. 47, № 1. – P. 40–43.

111. Зінченко О. В. Фізико-хімічні процеси в криобіологічних системах при склуванні і в твердій фазі : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора біол. наук : спец. 03.00.22 “Криобіологія” / Зінченко О. В. – Харків, 1997. – 44 с.

112. Зинченко А. В. Термомеханические и электрические явления в суспензиях клеток печени при замораживании / А. В. Зинченко, А. Ю. Петренко, В. А. Моисеев // *Доклады АН Украины*. – 1994. – № 2. – С. 75–78.

113. Лебединский А. С. Влияние циклического изменения температуры в твердой фазе на сохранность криоконсервированных гепатоцитов / А. С. Лебединский, А. В. Зинченко, А. Ю. Петренко // *Пробл. криобиологии*. – 2002. – № 3. – С. 48–51.

114. Takahashi T. Calorimetric studies of the state of water in deeply frozen human monocytes / T. Takahashi, A. Hirsh // *Biophys. J.* – 1985. – V. 47, № 3. – P. 373–380.

115. Bank H. Visualization of freezing damage. II. Structural alterations during warming / H. Bank // *Cryobiology*. – 1973. – V. 10, № 2. – P. 157–170.
116. Rall W. F. Innocuous biological freezing during warming / W. F. Rall, D. S. Reid, J. Farrant // *Nature*. – 1980. – V. 286, № 5772. – P. 511–514.
117. Rall W. F. Analysis of slow warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods / W. F. Rall, D. S. Reid, C. Polge // *Cryobiology*. – 1984. – V. 21, № 1. – P. 106–121.
118. Seki S. Kinetics and activation energy of recrystallization of intracellular ice in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling / S. Seki, P. Mazur // *Cryobiology*. – 2008. – V. 56, № 3. – P. 171–180.
119. Jin B. Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival / B. Jin, K. Kusanagi, M. Ueda, [et al.] // *Cryobiology*. – 2008. – V. 56, № 3. – P. 233–240.
120. Whittingham D. G. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C / D. G. Whittingham, S. P. Leibo, P. Mazur // *Science*. – 1972. – V. 178. – P. 411–414.
121. Leibo S. P. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos / S. P. Leibo // *The freezing of mammalian embryos : Ciba Foundation Symposium 52, London, 18th-20th January 1977 ; Ed. K. Elliott. – Amsterdam, Oxford, New York : Elsevier / Excerpta Medica / North-Holland, 1977. – P. 69–96.*
122. Rall W.F. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol / W.F. Rall, C. Polge // *J. Reprod. Fertil.* – 1984. – V. 70. – P. 285–292.
123. Fertilization and development of mouse oocytes cryopreserved using a theoretically optimized protocol / J. O. M. Karlsson, A. Eroglu, T. L. Toth, [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1996. – V. 11, № 6. – P. 1296–1305.
124. Karlsson J. O. M. A theoretical model of intracellular devitrification / J. O. M. Karlsson // *Cryobiology*. – 2001. – V. 42, № 3. – P. 154–169.
125. Karlsson J. O. M. A model of diffusion-limited ice growth inside biological cells during freezing / J. O. M. Karlsson, E. G. Cravalho, M. Toner // *J. Appl. Phys.* – 1994. – V. 75, № 9. – P. 4442–4455.

126. The effect of storage temperature on the stability of frozen erythrocytes / G. Spieles, M. Kresin, K. Loges [et al.] // *Cryobiology*. – 1995. – V. 32, № 4. – P. 366–378.
127. MacFarlane D. R. Theory of devitrification in multicomponent glass forming systems under diffusion control / D. R. MacFarlane, M. Fragoulis // *Phys. Chem. Glasses*. – 1986. – V. 27. – P. 228–234.
128. Changes in cell size during the cooling, warming and post-thawing periods of the freeze-thaw cycle / J. B. Griffiths, C. S. Cox, D. J. Beadle [et al.] // *Cryobiology*. – 1979. – V. 16, № 2. – P. 141–151.
129. Schwartz G. J. Volumetric changes during the thawing of frozen cells / G. J. Schwartz, K. R. Diller // *Cryo-Letters*. – 1980. – V. 1, № 4. – P. 129–134.
130. Knox J. M. Volumetric changes in cells during freezing and thawing / J. M. Knox, G. S. Schwartz, K. R. Diller // *J. Biomech. Eng.* – 1980. – V. 102. – P. 91–97.
131. Harris L. W. Relative effects of cooling and warming rates on mammalian cells during the freeze-thaw cycle / L. W. Harris, J. B. Griffiths // *Cryobiology*. – 1977. – V. 14, № 6. – P. 662–669.
132. Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: Interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol / S. P. Leibo, J. Farrant, P. Mazur [et al.] // *Cryobiology*. – 1970. – V. 6, № 4. – P. 315–332.
133. Mazur P. Interactions of cooling velocity, temperature, and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast / P. Mazur, J. J. Schmidt // *Cryobiology*. – 1968. – V. 5, № 1. – P. 1–17.
134. Akhtar T. The effect of cooling and warming rates on the survival of cryopreserved L-cells / T. Akhtar, D. E. Pegg, J. Foreman // *Cryobiology*. – 1979. – V. 16, № 5. – P. 424–429.
135. The effect of cooling rate and warming rate on the packing effect in human erythrocytes frozen and thawed in the presence of 2 M glycerol / D. E. Pegg, M. P. Diaper, H. L. Skaer, C. J. Hunt // *Cryobiology*. – 1984. – V. 21, № 5. – P. 491–502.
136. Farrant J. Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury / J. Farrant, G. J. Morris // *Cryobiology*. – 1973. – V. 10, № 2. – P. 134–140.

137. Friedler S. Cryopreservation of embryos and ova / S. Friedler, L. C. Giudice, M. D. Lamb // *Fertil. Steril.* – 1988. – V. 49, № 4. – P. 743–764.

138. Boutron P. Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glassforming tendency in aqueous cryoprotective solutions / P. Boutron // *Cryobiology.* – 1986. – V. 23, № 1. – P. 88–102.

139. MacFarlane D. R. Devitrification in glass-forming aqueous solutions / D. R. MacFarlane // *Cryobiology.* – 1986. – V. 23, № 3. – P. 230–244.

140. Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures / M. J. Ashwood-Smith, G.W. Morris, R. Fowler [et al.] // *Hum Reprod.* – 1988. – V. 3, № 6. – P. 795–802.

141. Кулешова Л. Г. Повреждение клеток почек сирийского хомячка при замораживании / Л. Г. Кулешова, Г. Ф. Худяков // *Криобиология и криомедицина.* – 1983. – Вып. 12. – С. 24–28.

142. Webb M. Dehydration-induced hexagonal phase formation in phospholipids bilayers / M. Webb, P. L. Steponkus // *Cryobiology.* – 1990. – V. 27, № 6. – P. 666–667.

143. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing / T. J. Anchordoguy, A. S. Rudolph, J. F. Carpenter, J. H. Crowe // *Cryobiology.* – 1987. – V. 24, № 4. – P. 324–331.

144. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules / J. H. Crowe, J. F. Carpenter, L. M. Crowe, T. J. Anchordoguy // *Cryobiology.* – 1990. – V. 27, № 3. – P. 219–231.

145. Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces / E. A. Disalvo, F. Lairion, F. Martini [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. – V. 1778, № 12. – P. 2655–2670.

146. Effects of freezing on membranes and proteins in LNCaP prostate tumor cells / W. F. Wolters, S. K. Balasubramanian, E. L. Ongstad [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2007. – V. 1768, № 3. – P. 728–736.

147. Balasubramanian S. K. Membrane hydration correlates to cellular biophysics during freezing in mammalian cells / S. K. Balasubramanian, W. F.

Wolkers, J. C. Bischof // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – V. 1788, № 5. – P. 945–953.

148. Kasai M. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocysts as a tool to identify the type of cryoinjury / M. Kasai, K. Ito, K. Edashige // *Hum Reprod*. – 2002. – V. 17, № 7. – P. 1863–1874.

149. Гроот С. Неравновесная термодинамика / С. де Грот, П. Мазур ; пер. с англ. В. Т. Хозяинова / под ред. Д. Н. Зубарева. – М. : Мир, 1964. – 456 с.

150. Lovelock J. E. Biophysical aspect the freezing and thawing of living cells. – *Proc. R. Soc. Med*. – 1954. – V. 47, № 1. – P. 60–62.

151. Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its activation energy / E. E. Noiles, P. Mazur, P. F. Watson [et al.] // *Biol. Reprod*. – 1993. – V. 48, № 1. – P. 99–109.

152. Curry M. R. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa / M. R. Curry, B. J. Redding, P. F. Watson // *Cryobiology*. – 1995. – V. 32, № 2. – P. 175–181.

153. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa / J. A. Gilmore, L. E. McGann, J. Liu [et al.] // *Biol. Reprod*. – 1995. – V. 53, № 5. – P. 985–995.

154. Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa / C. E. Willoughby, P. Mazur, A. T. Peter, J. K. Critser. // *Biol. Reprod*. – 1996. – V. 55, № 3. – P. 715–727.

155. Mc Grath J.J. Experimental and analytical techniques for determining permeability parameters of individual cells and cell populations / J. J. Mc Grath, S. Nowlen, R. Ligon // *Cryobiology*. – 1983. – V. 20, № 6. – P. 712.

156. A microscope diffusion device for the study of osmotic phenomena in individual cells / J. J. Mc Grath, S. M. Tu, K. Sherban, M. Melkerson // *Cryobiology*. – 1985. – V. 22, № 6. – P. 627–628.

157. A microscopic diffusion chamber for measure of the osmotic properties of individual cells / P. D. Schreuders, S. J. Aggarwal, K. Diller, C. R. Baxter // *Cryobiology*. – 1987. – V. 24, № 6. – P. 552–553.

158. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents / R. V. Devireddy, D. J. Swanlund, K. P. Roberts, J. C. Bischof // *Biol. Reprod.* – 1999. – V. 61, № 3. – P. 764–775.

159. Water permeability and its activation energy for individual hamster pancreatic islet cells / C. Liu, C. T. Benson, D. Gao [et al.] // *Cryobiology.* – 1995. – V. 32, № 5. – P. 493–502.

160. Toupin C. J. Permeability of human granulocytes to dimethyl sulfoxide / C. J. Toupin, L. E. Maguer, L. E. McGann // *Cryobiology.* – 1989. – V. 26, № 5. – P. 422–430.

161. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation / J. A. Gilmore, J. Liu, A. T. Peter, J. K. Critser // *Biol. Reprod.* – 1998. – V. 58, № 1. – P. 28–36.

162. Noiles E. E. The temperature dependence in the hydraulic conductivity, L_p , of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0°C / E. E. Noiles, J. L. Bailey, B. T. Storey. // *Cryobiology.* – 1995. – V. 32, № 3. – P. 220–238.

163. Effects of Percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation / M. J. Phelps, J. Liu, J. D. Benson [et al.] // *Biol. Reprod.* – 1999. – V. 61, № 4. – P. 1031–1041.

164. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing / R. V. Devireddy, D. J. Swanlund, K. P. Roberts [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2000. – V. 15, № 5. – P. 1125–1135.

165. Curry M. R. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations / M. R. Curry, J. D. Millar, P. F. Watson // *Biol. Reprod.* – 1994. – V. 51, № 5. – P. 1014–1021.

166. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function / M. A. Henry, E. E. Noiles, D. Gao [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1993. – V. 60, №

5. – P. 911–918.

167. Motility of cryopreserved mouse spermatozoa affected by temperature of collection and rate of thawing / J. M. Sztejn, J. S. Farley, A. F. Young, L. E. Mobraaten // *Cryobiology*. – 1997. – V. 35, № 1. – P. 46–52.

168. Songsasen N. Cryopreservation of mouse sperm. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice / N. Songsasen, S. P. Leibo // *Cryobiology*. – 1997. – V. 35, № 3. – P. 255–269.

169. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents / S. Thirumala, M. S. Ferrer, A. Al-Jarrah [et al.] // *Cryobiology*. – 2003. – V. 47, № 2. – P. 109–124.

170. Differences among dog in responses of their spermatozoa cryopreserved at various cooling and warming rates / I. Yu, N. Songsasen, R. A. Godke, S. P. Leibo // *Cryobiology*. – 2002. – V. 44, № 1. – P. 57–72.

171. Subzero water transport characteristics of boar spermatozoa confirm observed optimal cooling rates / R. V. Devireddy, B. Fahrig, R. A. Godke, S. P. Leibo // *Mol. Reprod. Dev.* – 2004. – V. 67, № 4. – P. 446–457.

172. The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level / P. S. Fiser, R. V. Fairfull, C. Hansen [et al.] // *Mol. Reprod. Dev.* – 1993. – V. 34, № 2. – P. 190–195.

173. Mazur P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova: Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability / P. Mazur, W. F. Rall, S. P. Leibo // *Cell Biophys.* – 1984. – V. 6, № 3. – P. 197–213.

174. Mazur P. Is Intracellular Ice Formation the Cause of Death of Mouse Sperm Frozen at High Cooling Rates? / P. Mazur, C. Koshimoto // *Biol. Reprod.* – 2002. – V. 66, № 5. – P. 1485–1490.

175. Levin R. L. A membrane model describing the effect of temperature on the water conductivity of erythrocyte membranes at subzero temperatures / R. L. Levin, E. G. Cravalho, C. E. Huggins // *Cryobiology*. – 1976. – V. 13, № 4. – P. 415–429.

176. Ling C.R. Analysis of cell freezing and dehydration / C. R. Ling, C. L. Tien

// ASME paper № 69–WA/NT–31, 1969.

177. Levin R. L. Water transport in a cluster of closely packed erythrocytes at subzero temperatures / R. L. Levin, E. G. Cravalho, C. E. Huggins // *Cryobiology*. – 1977. – V. 14, № 6. – P. 549–558.

178. The thermodynamics of water transport for biological cells during freezing / O. M. Silveiras, E. G. Cravalho, W. M. Toscano [et al.] // *J. Heat Transfer*. – 1975. – V. 97, № 4. – P. 582–588.

179. Mansoori G. A. Kinetics of water loss from cells at subzero centigrade temperatures / G. A. Mansoori // *Cryobiology*. – 1975. – V. 12, № 1. – P. 34–45.

180. Kedem O. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to nonelectrolytes / O. Kedem, A. Katchalsky // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1958 – V. 27, № 2. – P. 229–246.

181. Kedem O. A physical interpretation of the phenomenological coefficients of membrane permeability / O. Kedem, A. Katchalsky // *J. Gen. Physiol*. – 1961. – V. 45, № 2. – P. 143–179.

182. Levin R.L. An optimum method for the introduction of removal of permeable cryoprotectants: Isolated cells / R.L. Levin, T.E. Miller // *Cryobiology*. – 1981. – V. 14, № 1. – P. 32–48.

183. Diller K. R. An irreversible thermodynamic analysis of cell freezing in the presence of membrane permeable additives. I. Numerical and transient cell volume data / K. R. Diller, M. E Lynch // *Cryo-Letters*. – 1983. – V. 4, № 5. – P. 295–308.

184. Diller K. R. An irreversible thermodynamic analysis of cell freezing in the presence of membrane permeable additives. II. Transient electrolyte and additive concentrations / K. R. Diller, M. E Lynch // *Cryo-Letters*. – 1984. – V. 5, № 2. – P. 117–130.

185. Diller K.R. An irreversible thermodynamic analysis of cell freezing in the presence of membrane permeable additives. III. Transient water and additive fluxes / K. R. Diller, M. E Lynch // *Cryo-Letters*. – 1984. – V. 5, № 2. – P. 131–144.

186. Network thermodynamic modeling with bond graphs for membrane transport during cell freezing / K. R. Diller, J. J. Beaman, J. P. Montoya, P. C.

Breedfeld // Transact. ASME, J. Heat. Transfer. – 1988. – V. 110. – P. 938–945.

187. Диллер К. Р. Измерение и моделирование осмотического поведения клеток при замораживании / К. Р. Диллер // Криобиология. – 1990. – № 1. – С. 11–20.

188. Diller K. R. Automated computer analysis of cell size changes during cryomicroscope freezing: a biased trident convolution mask technique / K. R. Diller, M. J. Knox // Cryo-Letters. – 1983. – V. 4, № 1. – P. 77–92.

189. Mazur P. Do embryos respond as ideal osmometers during slow freezing? / P. Mazur // Cryobiology. – 1986. – V. 23, № 6. – P. 549–550.

190. Walcerz D. B. Permeability measurements of mouse embryo membranes at temperatures above and below freezing / D. B. Walcerz, S. J. Aggarwal, K. R. Diller // Phys. Med. and Biol. – 1988. – V. 33, № 1. – P. 308.

191. Aggarwal S.J. Hydraulic permeability and activation energy of human keratinocytes at subzero temperatures / S. J. Aggarwal, K. R. Diller, C. R. Baxter // Cryobiology. – 1988. – V. 25, № 3. – P. 203–211.

192. Cryomicroscopy of human monocytes to determine membrane permeability / C. McCaa, K. R. Diller, S. J. Aggarwal, T. Takahashi // Cryobiology. – 1986. – V. 23, № 6. – P. 576–577.

193. Cryomicroscopy of monocytes to determine membrane permeability at freezing temperatures / C. McCaa, S. J. Aggarwal, T. Takahashi, K. R. Diller // Cryobiology. – 1987. – V. 24, № 6. – P. 546–547.

194. Schwartz G. J. Analysis of the water permeability of human granulocytes at subzero temperatures in the presence of extracellular ice / G. J. Schwartz, K. R. Diller // J. Biomech. Eng. – 1983. – V. 105, № 4. – P. 360–366.

195. Yordy D. Cryomicroscopy of granulocytes to determine membrane permeability at freezing temperature / D. Yordy, S. J. Aggarwal, K. R. Diller // Cryobiology. – 1987. – V. 24, № 6. – P. 543.

196. Levin R. L. Water permeability of yeast cells at subzero temperatures / R. L. Levin, M. Ushiyama, E. G. Cravalho // J. Membr. Biol. – 1979. – V. 46, № 2. – P. 91–124.

197. Smith D. J. The effect of dimethylsulfoxide on the water transport response of rat hepatocytes during freezing / D. J. Smith, M. Schulte, J. C. Bischof // *J. Biomech. Eng.* – 1998. – V. 120, № 5. – P. 549–558.

198. Bischof J. C. Ice formation in isolated human hepatocytes and human liver tissue / J. C. Bischof, C. M. Ryan, R. G. Tompkins [et al.] // *ASAIO J.* – 1997. – V. 43, № 4. – P. 271–278.

199. Devireddy R. V. Measurement of water transport during freezing in cell suspensions using a differential scanning calorimeter / R. V. Devireddy, D. Rana, J. C. Bischof // *Cryobiology.* – 1998. – V. 36, № 2. – P. 124–155.

200. Devireddy R. V. Microscopic and calorimetric assessment of freezing processes in uterine fibroid tumor tissue / R. V. Devireddy, J. E. Coad, J. C. Bischof // *Cryobiology.* – 2001. – V. 42, № 4. – P. 225–243.

201. Liver freezing response of the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*, in the presence and absence of glucose. I. Experimental measures / R. V. Devireddy, P. R. Barrette, K. B. Storey, J. C. Bischof // *Cryobiology.* – 1999. – V. 38, № 4. – P. 310–326.

202. Pazhayannur P. V. Measurement and simulation of water transport during freezing in mammalian liver tissue / P. V. Pazhayannur, J. C. Bischof // *J. Biomech. Eng.* – 1997. – V. 119, № 3. – P. 269–277.

203. Devireddy R.V. Measurement of water transport during freezing in mammalian liver tissue: Part II – The use of differential scanning calorimetry / R. V. Devireddy, J. C. Bischof // *J. Biomech. Eng.* – 1998. – V. 120, № 5. – P. 559–569.

204. Variation in the membrane transport properties and predicted optimal rates of freezing for spermatozoa of diploid and tetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* / Y. He, Q. Dong, T. R. Tiersch, R. V. Devireddy // *Biol. Reprod.* – 2004. – V. 70, № 5. – P. 1428–1437.

205. A theoretically estimated optimal cooling rate for the cryopreservation of sperm cells from a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri* / S. Thirumala, C. Huang, Q. Dong [et al.] // *Theriogenology.* – 2005. – V. 63, № 9. – P. 2395–2415.

206. Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platyfish, *Xiphophorus maculatus* / D. Pinisetty, C. Huang, Q. Dong [et al.] // *Cryobiology*. – 2005. – V. 50, № 3. – P. 250–263.

207. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry / R. V. Devireddy, D. J. Swanlund, T. Olin [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2002. – V. 66, № 1. – P. 222–231.

208. Liver freezing response of the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*, in the presence and absence of glucose. II. Mathematical modeling / R. V. Devireddy, P. R. Barratt, K. B. Storey, J. C. Bischof // *Cryobiology*. – 1999. – V. 38, № 4. – P. 327–338.

209. Subzero water transport characteristics and optimal rates of freezing rhesus monkey (*Macaca mulatta*) ovarian tissue / G. Li, S. Thirumala, S. P. Leibo, R. V. Devireddy // *Mol. Reprod. Dev.* – 2006. – V. 73, № 12. – P. 1600–1611.

210. Devireddy R. V. Suprazero cooling conditions significantly influence subzero permeability parameters of mammalian ovarian tissue / R. V. Devireddy, G. Li, S. P. Leibo // *Mol. Reprod. Dev.* – 2006. – V. 73, № 3. – P. 330–341.

211. Noiles E. E. Water permeability, L_p , of mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton / E. E. Noiles, K. A. Thompson, B. T. Storey // *Cryobiology*. – 1997. – V. 35, № 1. – P. 79–92.

212. Diller K. R. New techniques in cryomicroscopy / K. R. Diller // *Cryobiology*. – 2002. – V. 45, № 3. – P. 250–251.

213. Справочник по переливанию крови и кровезаменителей / [Аграненко В. А., Андреев Ю. Н., Васильев П. С. и др.] ; под ред. О. К. Гаврилова. – М. : Медицина, 1982. – 304 с.

214. Клиническая гематология / [Антонеску М, Апэтяну В, Берчану Шт. и др.] ; под ред. Шт. Берчану. – Бухарест : Медицинское изд-во, 1985. – 1221 с.

215. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии / Тодоров Й. ; пер. с болгарского И. Георгиевой, К. Скачковой / под ред. Г.

Рапопорта. – [3-е русское издание] – София : Медицина и физкультура, 1961. – 783 с.

216. World Health Organization. Laboratory manual and sperm – cervical mucus interaction. – Cambridge: University Press, 2000. – 128 p.

217. Биология развития млекопитающих. Методы : пер. с англ. Д. Г. Полтевой / под ред. М. Манк. – М. : Мир, 1990. – 406 с.

218. Амстиславский С. Я. Методы биотехнологии в практике разведения животных / Амстиславский С. Я., Максимовский Л. Ф., Воротников М. Т. – Новосибирск : ИЦиГ СО АН СССР, 1991. – 170 с.

219. А.с. №1463757 СССР, С12 N5/00/. Способ получения изолированных клеток печени / Л. П. Кравченко, А. Н. Андриенко, О. А. Семенченко, А. Ю. Петренко, А. Н. Сукач (СССР). – №4221432/28-13; заявл. 02.04.87; опубл. 07.03.89, БИ № 9. – С. 125.

220. Ишков Г. С. Кримио-микроскопическое исследование процесса замораживания клеточных суспензий в градиенте температур : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук : спец. 03.00.22 “Криобиология” / Г. С. Ишков. – Харьков, 1986. – 22 с.

221. Diller K. R. A cryomicroscope for the study of freezing and thawing process in biological cells / K. R. Diller, E. G. Cravalho // Cryobiology. – 1970. – V. 7, № 4–6. – P. 191–199.

222. Diller K. R. Quantitative low temperature optical microscopy of biological systems / K. R. Diller // J. Microsc. – 1982. – V. 126, № 1. – P. 9–28.

223. Low temperature light microscopy and its application to study freezing in aqueous solutions and biological cell suspensions / Ch. Korber, S. English, P. Schwindke [et al.] // J. Microsc. – 1986. – V. 141, № 3. – P. 263–276.

224. Кулешова Л. Г. Кримио-микроскопический комплекс для криобиологических исследований / Л. Г. Кулешова // Сохранение генетических ресурсов : международная конференция, Санкт-Петербург, 19-22 октября 2004 г. : материалы конф. – Цитология. – 2004. – Т. 46, № 9. – С. 809–810.

225. Пат. 13671 Україна, МПК⁴ G 02 B 21/28. Пристрій для

кріомікроскопічних досліджень / Новіков О. М., Кулешова Л. Г., Блохін С. В., Олійник С. Т.; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – №3704855/SU ; заявл. 24.02.1984 ; надрук. 25.04.1997, Бюл. № 2. – С. 3.1.309.

226. McCaa C. A new convection cryostage design based on simplified fabrication procedures / C. McCaa, K. R. Diller // *Cryo-Letters*. – 1987. – V. 8, № 3. – P. 168–175.

227. Schwartz G. J. Design and fabrication of a simple, versatile cryomicroscopy stage / G. J. Schwartz, K. R. Diller // *Cryobiology*. – 1982. – V. 19, № 6. – P. 529–538.

228. Мелешко Л. О. Исследование зависимости линейной скорости кристаллизации от толщины слоя / Л. О. Мелешко // *Ж.Ф.Х.* – 1960. – Т. 34, вып. 1. – С. 39–42.

229. Прищепа Л. Т. Зависимость линейной скорости кристаллизации от толщины препарата и температуры / Л. Т. Прищепа // *Механизм и кинетика кристаллизации : Всесоюзное совещание, 12-15 октября, 1971 г. : тезисы докладов.* – Минск : Наука и техника, 1971. – С. 40.

230. Любов Б. Я. Теория кристаллизации в больших объемах / Любов Б. Я. – М. : Наука, 1975. – 256 с.

231. Приборы и методы физического металловедения / пер. с английского под ред. Ф. Вейнберга. – М. : Мир, 1973. – Вып. 1. – С. 276–331.

232. Уманский Я. С. Физика металлов. Атомное строение металлов и сплавов / Я. С. Уманский, Ю. А. Скаков. – М. : Атомиздат, 1978. – 352 с.

233. Бакли Г. Рост кристаллов / Бакли Г. ; пер с англ. М. А. Кулакова / под ред. О. М. Аншелеса и В. А. Франк-Каменецкого. – М. : Изд-во иностранной литературы. – 1954. – 406 с.

234. Беляев В. И. Об определении критического размера зародышевых кристаллов / В. И. Беляев // *Известия Академии наук СССР. Серия геофизическая.* – 1960. – № 8. – С. 1278–1281.

235. Самыгин Г. А. Причины вымерзания растений / Самыгин Г. А. – М. : Наука, 1974. – 192 с.

236. Розенталь О. М. О работе льдозарождения в воде / О. М. Розенталь // ЖСХ. – 1965. – Т. 6, № 4. – С. 635–636.

237. Доменикан Н. И. О кинетике кристаллизации переохлажденных жидкостей по методу мелких капель / Н. И. Доменикан // Механизм и кинетика кристаллизации : Всесоюзное совещание, 12-15 октября, 1971 г. : тезисы докладов. – Минск : Наука и техника, 1971. – С. 15.

238. Turnbull D. Microscopic observation of the solidification of small metal droplets / D. Turnbull, R. E. Cech. // J. Appl. Phys. – 1950. – V. 21, № 8. – P. 804–810.

239. Панов В. И. Методика оценки устойчивости пересыщенных растворов / В. И. Панов, А. Н. Новиков // Промышленная кристаллизация. Т. XX : [сб. науч. трудов / под ред. В. И. Панова]. – Л. : Химия, 1969. – С. 65–72.

240. Michelmore R. W. Nucleation rates of ice in undercooled water and aqueous solutions of polyethylene glycol / R. W. Michelmore, E. Franks // Cryobiology. – 1982. – V. 19, № 2. – P. 163–171.

241. Anomalous heat capacities of supercooling water and heavy water / D. H. Rasmussen, A. P. MacKenzie, C. A. Angell, J. C. Tucker // Science. – 1973. – V. 181, № 4097. – P. 342–344.

242. Козлов Г. А. Кинетика изотермической кристаллизации капель воды, составляющих дисперсную фазу эмульсии типа вода-масло / Г. А. Козлов, А. А. Равдель // Коллоидный журнал. – 1971. – Т. 33, № 6. – С. 847–853.

243. Hamada Sh. Nucleation in liquid sulfur droplets / Sh. Hamada, J. Nakarawa, T. Shirai // Bull. Chem. Soc. Japan. – 1970. – V. 43, № 10. – P. 3096–3101.

244. Pound G. M. Kinetics of nucleation in supercooled liquid tin / G. M. Pound, V. K. La Mer // J. Amer. Chem. Soc. – 1952. – V. 74, № 9. – P. 2323–2331.

245. Современная кристаллография. Т. 3. Образование кристаллов / [Чернов А. А., Гиваргизов Е. И., Багдасаров Х. С., Кузнецов В. А.]. – М.: Наука, 1980. – 407с.

246. Виноград-Финкель Ф. Р. Применение рентгенографии для исследования замороженной крови / Ф. Р. Виноград-Финкель, Л. Л. Разумова, С. Н. Кудряшова // Биофизика. – 1960. – Т. 5, № 2. – С. 229–234.

247. Хейкер Д. М. Рентгеновская дифрактометрия / Д. М. Хейкер, Л. С. Зевин ; под ред. Г. С. Жданова. – М. : Изд-во физ.-мат. литературы, 1963. – 380 с.
248. Уманский Я. С. Рентгенография металлов и полупроводников / Уманский Я. С. – М. : Metallurgia, 1969. – 496 с.
249. Гласкер Дж., Трублад К. Анализ кристаллической структуры / Дж. Гласкер, К. Трублад ; пер. с англ. В. Г. Дашевского. – М. : Мир, 1974. – 237 с.
250. Пинес Б. Я. Лекции по структурному анализу / Пинес Б. Я. – Харьков : Изд-во Государственного университета , 1957. – 456 с.
251. Горелик С. С. Рентгенографический и электроннооптический анализ / Горелик С. С., Расторгуев Л. Н., Скаков Ю. А. – М. : Metallurgia, 1970. – 352 с.
252. Китайгородский А. И. Рентгеноструктурный анализ мелкокристаллических и аморфных тел / Китайгородский А. И. – М. : ГТТИ, 1952. – 588 с.
253. Бржан В. С. Рентгенографические исследования кристаллизации сорбированной воды / В. С. Бржан // Кристаллография. – 1959. – Т. 4, вып. 4. – С. 631–633.
254. Кузнецов В.В. Физическая и коллоидная химия : [учеб. пособие для биол. специальностей ун-тов] / В.В. Кузнецов, В.Ф. Усть-Качкинцев. – М. : Высшая школа, 1976. – 277 с.
255. McGrath J. J. Quantitative measurement of cell membrane transport : Technology and applications / J. J. McGrath // Cryobiology. – 1997. –V. 34, № 4. – P. 315–334.
256. Кулешова Л. Г. Морфометрический анализ реакций клеток на физико-химические факторы криоконсервирования / Л. Г. Кулешова // Новые приложения морфометрии и математическое моделирование в медико-биологических исследованиях: научно практическая конференция, 9-11 октября 1990 г. : тезисы докладов. – Харьков : Харьковский научно-исследовательский институт терапии, 1990. – С. 113.
257. Improvement in the resolution of three-dimensional data sets collected using optical serial sectioning / F. Macias-Garza, K. R. Diller, A. C. Bovik [et al.] // J.

Microsc. – 1989. – V. 153, № 2 – P. 205–221.

258. McGrath J. J. Experimental and analytical techniques for determining permeability parameters individual cells and cell populations / J. J. McGrath, S. Nowlen, R. Ligon // Cryobiology. – 1983. – V. 20, № 6. – P. 712.

259. Волюмометрия как метод изучения проницаемости мембранного аппарата яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих / Н. Д. Безуглый, Ф. И. Осташко, Е. Г. Волков, В. М. Пенцов // Научн. - техн. бюл. НИИ животновод. Лесостепи и Полесья УССР. – 1986. – № 43. – С. 29–35.

260. Diller K. R. Computer automated cell size and shape analysis in cryomicroscopy / K. R. Diller, S. J. Aggarwal // J. Microsc. – 1987. – V. 146, № 2. – P. 209–219.

261. The permeability of unfertilized oocytes to 1,2 propandiol a comparison of mouse and human cells / B. J. Fuller, J. E. Hunter, A. G. Bernard [et al.] // Cryo-Letters. – 1992. – V. 13, № 5. – P. 287–292.

262. Bessis M. Living Blood Cells and their Ultrastructure / Bessis M. – Berlin, Heidelberg, New-York : Springer, 1973. – 767 p.

263. Морфологическая характеристика эритроцитов периферической крови здоровых людей [Сканирующая электронная микроскопия] / Г. И. Козинец, И. В. Ряполова, З. Г. Шишканова [и др.] // Пробл. гематологии и переливания крови. – 1977. – № 7. – С. 19–21.

264. Козинец Г. И. Поверхностная архитектура клеток периферической крови в норме и при заболеваниях крови / Г. И. Козинец, Ю. А. Симоварт. – Таллин : Валгус, 1984. – 115 с.

265. Крымский Л. Д. Растровая электронная микроскопия сосудов и крови / Крымский Л. Д., Нестайло Г. В., Рыбалов А. Г. – М. : Медицина, 1976. – 168 с.

266. Попл Дж. Спектры ядерного магнитного резонанса высокого разрешения / Попл Дж., Шнейдер В., Бернштейн Г. ; пер. с англ. В. Ф. Быстрова / под ред. Н. Д. Соколова. - М. : Изд-во иностранной литературы, 1962. – С. 70–131.

267. А.с. 1642342 СССР, МКИ G01 №24/08/. Способ оценки проникновения

веществ в клеточные суспензии / В. Д. Зинченко, М. И. Щетинский, В. И. Мусатов, В. А. Моисеев (СССР). – №4360297/14; заявл. 08.01.88; опубл.15.04.91, Бюл. № 14. – С. 171.

268. Луппа Х. Основы гистохимии / Луппа Х. ; пер. с нем. / под ред. Н. Т. Райхлина. – М. : Мир, 1980. – 343 с.

269. Кононский А. И. Гистохимия / Кононский А.И. – К. : Вища школа, 1976. – 280 с.

270. Кисели Д. Практическая микротехника и гистохимия / Кисели Д. ; пер. с венгерского Г. Дьенеш, Й. Пушкеш / под ред. Д. Ромханы. – Будапешт : Академия наук Венгрии. – 1962. – 399 с.

271. Крыленков В. А. Прижизненное выявление внешних примембранных слоев (гликокаликса) клеток с помощью альцианового синего. 1. Обоснование и описание метода / В. А. Крыленков, С. В. Левин, К. А. Самойлова // Цитология. – 1979. – Т. XXI, № 2. – С. 157–163.

272. Крыленков В. А. Прижизненное выявление внешних примембранных слоев (гликокаликса) клеток с помощью альцианового синего. 2. Влияние обработки трипсином на сорбцию гликокаликсом альцианового синего / В. А. Крыленков, С. В. Левин, К. А. Самойлова // Цитология. – 1979. – Т. XXI, № 4. – С. 470–473.

273. Арцишевская Р. А. Функциональные и структурные изменения поверхности эритроцитов человека после облучения УФ-лучами разной длины волны / Р. А. Арцишевская, К. А. Самойлова // Цитология. – 1983. – Т. XXV, № 12. – С. 1387–1392.

274. Самойлова К.А. Выход веществ из лимфоцитов периферической крови человека, облученных коротковолновыми УФ лучами / К. А. Самойлова, А. П. Миронова, Р. А. Арцишевская // Цитология. – 1984. – Т. XXVI, № 1. – С. 102–107.

275. Арцишевская Р. А. Десорбция гликопротеинов с поверхности лимфоцитов периферической крови человека после облучения коротковолновыми УФ лучами / Р. А. Арцишевская, А. П. Миронова, К. А.

Самойлова // Цитология. – 1984. – Т. XXVI, № 2. – С. 209–214.

276. Адлер Ю. П. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий / Адлер Ю. П., Маркова Е. В., Грановский Ю. В. – М. : Наука, 1976. – 279 с.

277. Саутин С. Н. Планирование эксперимента в химии и химической технологии / Саутин С. Н. – Л. : Химия, 1975. – 48 с.

278. Дрейпер Н. Прикладной регрессионный анализ / Н. Дрейпер, Г. Смит ; пер. с англ. Ю. П. Адлера, В. Г. Горского – [2-е изд., перераб. и доп.]. – М. : Финансы и статистика, 1986. – 366 с.

279. Стьюпер Э. Машинный анализ связи химической структуры и биологической активности / Стьюпер Э., Брюггер У., Джурс П. ; пер. с англ. В. П. Дмитриева / под ред. А. Евсеева. – М. : Мир, 1982. – 235 с.

280. Закс Л. Статистическое оценивание / Закс Л. – М. : Статистика, 1976. – 598 с.

281. Rasmussen D. H. Supercooling and nucleation of ice in single cells / D. H. Rasmussen, M. N. Macaulay, A. P. MacKenzie // Cryobiology. – 1975. – V. 12, № 4. – P. 328–339.

282. Козлов Г. А. Об образовании центров кристаллизации при замораживании крови с защитными веществами / Г. А. Козлов, В. И. Теодорович, А. А. Равдель // Биофизика. – 1967. – Т. XII, № 3. – С. 483–488.

283. Козлов Г. А. Кинетика изотермической кристаллизации переохлажденных капель крови / Г. А. Козлов, В. И. Теодорович // Биофизика. – 1970. – Т. XV, № 4. – С. 657–664.

284. Кулешова Л. Г. Механизм внеклеточной нуклеации льда в криобиологических системах / Л. Г. Кулешова // Біофіз. вісник. – 2006. – вип. 17, № 1. – С. 65–70.

285. Мелихов И. В. О нуклеации в диспергированных жидкостях / И. В. Мелихов, В. А. Присяжнюк // ЖФХ. – 1979. – Т. LIII, № 5. – С. 1108–1113.

286. Marquardt D. W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters / D. W. Marquardt // J. Soc. Ind. Appl. Math. – 1963. – V. 11, № 2. – P.

431-435.

287. Малкин В. И. О скорости роста кристаллов салол в области стеклообразного состояния / В. И. Малкин // ЖФХ. – 1954. – Т. XXVIII, вып. 11. – С. 1966–1968.

288. Данилов В. И. Об экспериментальной проверке теории роста кристаллов / В. И. Данилов, В. И. Малкин // Проблемы металловедения и физики металлов : [второй сб. трудов / ред. Б. Я. Любов]. – М. : Metallurgizdat, 1951. – С. 25–30.

289. Данилов В. И. Экспериментальная проверка теории роста кристаллов и связь равновесных форм с формами роста / В. И. Данилов, В. И. Малкин // ЖФХ. – 1954. – Т. 28, вып. 10. – С. 1837–1844.

290. Слоисто-спиральный рост кристаллов / А. А. Чернов // УФН. – 1961. – Т. LXXIII, № 2. – С. 277–331.

291. Финагина Е. В. Исследование влияния переохлаждения на рост первичных кристаллов / Е. В. Финагина // Кристаллизация и фазовые превращения : [сб. статей / под ред. Н. Н. Сироты]. – Минск : Наука и техника, 1971. – С. 10–15.

292. Быховский А. И. О механизмах роста кристаллов бетола из расплава / А. И. Быховский // Кристаллизация и фазовые переходы : [сб. статей / под ред. Н. Н. Сироты]. – Минск : Изд-во Академии наук БССР, 1962. – С. 79–82.

293. Быховский А. И. О механизме роста кристаллов при $\alpha \leftrightarrow \beta$ превращении парадихлорбензола / А. И. Быховский, Л. И. Ларионов, Д. Е. Овсиенко // Кристаллография. – 1961. – Т. 6, вып. 2. – С. 284–286.

294. Овсиенко Д. Е. О механизме роста кристаллов салол из расплава / Д. Е. Овсиенко, Г. А. Алфинцев // Механизм и кинетика кристаллизации : [сб. статей / отв. ред. Н. Н. Сирота и др.]. – Минск : Наука и техника, 1964. – С. 98–109.

295. Новиков А. Н. Механизм роста кристаллов льда в сложных биологических системах / А. Н. Новиков, Л. Г. Кулешова, Т. П. Линник // Биофизика. – 1991. – Т. 36, № 1. – С. 122–127.

296. Kuleshova L. G. Mechanism of the intercellular ice crystal growth in

composite cryobiological system / L. G. Kuleshova, A. N. Novikov // Society for cryobiology "Cryo'94" : 31st Annual meeting, August, 21-26, 1994: Abstracts. – Kyoto (Japan), 1994. – № 23.

297. Темкин Д. Е. О скорости роста кристаллической иглы в переохлажденном расплаве / Д. Е. Темкин // ДАН СССР. – 1960. – Т. 132, № 6. – С. 1307–1310.

298. Мелешко Л. О. Исследование температурной зависимости линейной скорости роста кристаллизации салолла, бетолла, салипирина, антипирина и кодеина / Л. О. Мелешко // Механизм и кинетика кристаллизации : [сб. статей / отв. ред. Н. Н. Сирота и др.]. – Минск : Наука и техника, 1964. – С. 113–120.

299. Исследование кинетики роста кристаллов циклогексана из расплава / Д. Е. Овсиенко, Г. А. Алфинцев, А. В. Мохарт, И. А. Шрамченко // Механизм и кинетика кристаллизации : [сб. статей / под ред. Н. Н. Сироты]. – Минск : Наука и техника, 1969. – С. 147–153.

300. Новиков А. Н. Влияние физико-химических свойств криопротекторов на скорость роста и размер кристаллов льда в модельных системах / А. Н. Новиков, Т. П. Линник // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов : [сб. науч. трудов / отв. ред. В. И. Луговой]. – Харьков, 1990. – С. 99–103.

301. Салли И. В. К теории роста кристаллов из пересыщенных растворов / И. В. Салли // Механизм и кинетика кристаллизации : [сб. статей / под ред. Н. Н. Сироты]. – Минск : Наука и техника, 1969. – С. 299–306.

302. Кулешова Л. Г. Влияние переохлаждения и ряда криопротекторов на дисперсность кристаллов льда в биологических системах / Л. Г. Кулешова // IV з'їзд Українського біофізичного товариства, Донецьк, 19-21 грудня 2006 р. : тези доповідей. – Донецьк : Донецький національний університет, 2006. – С. 395–396.

303. Криопротекторы / [Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В.]. – К. : Наук. думка, 1978. – 204 с.

304. Сирота Н. Н. Влияние включений на процесс кристаллизации (влияние модификаторов, роль кристаллохимического сродства) / Н. Н. Сирота //

Кристаллизация и фазовые переходы : [сб. статей / под ред. Н. Н. Сироты]. – Минск : Изд-во Академии наук БССР, 1962. – С. 82–106.

305. Каменецкая Д. С. О влиянии примесей на зарождение центров кристаллизации / Д. С. Каменецкая // Рост кристаллов : Первое Всесоюзное совещание по росту кристаллов 5-10 марта 1956 г. : доклады. – М. : Академия наук СССР, 1957. – С. 39–47.

306. Данилов В. И. Влияние растворимых примесей на зарождение центров кристаллизации в переохлажденных жидкостях / В. И. Данилов, Д. С. Каменецкая // Проблемы металловедения и физики металлов : [второй сб. трудов / ред. Б. Я. Любов]. – М. : Metallurgizdat, 1951. – С. 3–18.

307. Kimizura N. Ice nucleation and supercooling behavior of polymer aqueous solution / N. Kimizura, C. Viriyarattanasak, N. Suzuki // Cryobiology. – 2008. – V. 56, № 1. – P. 80–87.

308. Rasmussen D. H. Effect of solute on ice-solution interfacial free energy: calculation from measured homogeneous nucleation temperatures / D. H. Rasmussen, A. F. MacKenzie // Water Structure at the Water–Polymer Interface. – 1972. – V. 161. – P. 126–145.

309. Zobrist B. Ice nucleation in aqueous solutions of poly ethylene glycol with different molar mass / B. Zobrist, U. Weers, T. Koop // J. Chem. Phys. – 2003. – V. 118, № 22. – P. 10254–10261.

310. Панов В. И. О влиянии ПАВ на качество кристаллов при кристаллизации из растворов / В. И. Панов, А. Н. Новиков, В. А. Присяжнюк // Промышленная кристаллизация. Т. XX : [сб. науч. трудов / под ред. В. И. Панова]. – Л. : Химия, 1969. – С. 65–72.

311. К вопросу о кинетике кристаллизации сульфата кальция из его пересыщенных растворов / С. И. Ремпель, А. А. Кинжалов, Л. Д. Скрылев [и др.] // Кристаллизация и фазовые превращения : [сб. статей / под ред. Н. Н. Сироты]. – Минск : Наука и техника, 1971. – С. 237–244.

312. Кулешова Л. Г. Порівняльний аналіз впливу низки чинників на кінетичні характеристики позаклітинного льодоутворення / Л. Г. Кулешова //

Біофізичні механізми функціонування живих систем : Міжнародна конференція присвячена 70-річчю від дня народження проф. Гойди О.А., Львів, 16-18 жовтня 2008 р. : тези доповідей. – Львів : Львівський національний університет ім. Івана Франка, 2008. – С. 18–19.

313. Кулешова Л. Г. Кристаллизация водных растворов некоторых криопротекторов / Л. Г. Кулешова, В. А. Моисеев, Ю. А. Иткин // Криобиология и криомедицина. – 1976. – вып. 2. – С. 27–31.

314. Кулешова Л. Г. Исследование структурных особенностей замороженных водных растворов ПЭО-400 / Л. Г. Кулешова // Современные вопросы криобиологии : [сб. науч. трудов / отв. ред. Н.С. Пушкаръ]. – Киев : Наук. думка, 1976. – С. 11–13.

315. Boutron P. Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-dimethylsulfoxide / P. Boutron, A. Kaufmann // Cryobiology. – 1978. – V. 15, № 2. – P. 93–108.

316. Асхабов А. М. Процессы и механизмы кристаллогенезиса / Асхабов А. М. – Ленинград : Наука, 1984. – 168 с.

317. Boutron P. Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in solutions of 2,3-butanediol containing mainly the levo and dextro isomers in water, buffer, and euro-collins / P. Boutron // Cryobiology. – 1993. – V. 30, № 1. – P. 86–97.

318. Effects of solute methoxylation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions / B. Wowk, M. Darwin, S. B. Harris [et al.] // Cryobiology. – 1999. – V. 39, № 3. – P. 215–227.

319. Baudot A. D. Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide / A. D. Baudot, L. Alger, P. Boutron // Cryobiology. – 2000. – V. 40, № 2. – P. 151–158.

320. Межмолекулярные взаимодействия в системе полиэтиленгликоль – вода. / В. Д. Зинченко, В. В. Манк, В. А. Моисеев, Ф. Д. Овчаренко // Коллоидный журнал. – 1976. – Т. 38. – С. 44–49.

321. Пушкаръ Н. С. Гидратация криопротекторов / Пушкар Н. С., Емец Б. Г., Калугин Ю. В. [и др.]. – Х. ИПКБиМ, 1972. – 23 с. – (Препринт / Академия

наук СССР, Институт проблем криогенной биологии и медицины ; ИПКБиМ, 1972).

322. Животова Е. Н. Исследование физических состояний оксиэтилированных производных глицерина методом ДСК и криомикроскопии / Е. Н. Животова, Л. Г. Кулешова, А. В. Зинченко // Актуальные вопросы теоретической и прикладной физики и биофизики «Физика. Биофизика – 2006»: Вторая всеукраинская научно-техническая конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, 17-22 апреля 2006 г. : материалы конф. – Севастополь: Севастопольский национальный технический университет, 2006. – С. 23–26.

323. Животова Е. Н. Исследование физических состояний бинарных систем вода-оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n = 5$ и 25 при температурах ниже 273 К методом криомикроскопии / Е. Н. Животова, Л. Г. Кулешова, А. В. Зинченко, В. В. Чеканова // Доповіді НАН України. – 2007. – № 4. – С. 78–84.

324. Zhivotova E. N. Physical states of aqueous solutions of oxyethylated glycerol with polymerization degree of $n=30$ at temperatures lower than 283 K / E.N. Zhivotova, A. V. Zinchenko, L. G. Kuleshova, V. V. Chekanova A. M. Kompaniets // Cryo-Letters. – 2007. – V. 28, № 4. – P. 261–270.

325. Zhivotova E. N. Physical states of a binary system water-oxyethylated glycerol (polymerization degree is $n=5$) at temperatures lower than 273 K / E. N. Zhivotova, A. V. Zinchenko, L. G. Kuleshova, E. V. Dukhopelnykov // Фізика низьких температур (КМУ – ФТН – 2007): Конференція молодих учених, 5-7 червня 2007 р. : тези доповідей. – Х. :Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б. І. Веркіна НАН України, 2007. – С. 21.

326. Zhivotova E .N. Low-temperature phase behaviour of the binary system water-oxyethylated glycerol of polymerization degree $n=5$ and intermolecular interactions in the system / E. N. Zhivotova, A. V. Zinchenko, L. G. Kuleshova, E. V. Dukhopelnykov, V. V. Chekanova // Molecular Physics. – 2008. – V. 106, № 14. – P. 1751–1759.

327. Животова Е. Н. Фазовые переходы и стеклование в водных растворах

оксиэтилированного глицерина при температурах ниже 273 К / Е. Н. Животова, А. В. Зинченко, Л. Г. Кулешова, Е. В. Духопельников, В. В. Чеканова, А. М. Компаниец // Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия : конференция, Пущино, 28-30 октября 2008 г. : материалы конф. – Биофизика живой клетки. – 2008. – Т. 9. – С. 52–53.

328. Zhivotova E .N. Phase behaviour of a system water-oxyethylated glycerol of polymerization degree $n=25$ / E. N. Zhivotova, A. V. Zinchenko, L. G. Kuleshova, E. V. Dukhopelnykov // Physics of liquid matter: Modern problems: 4th International Conference, May 23-26, 2008: Abstracts. – Kyiv: Taras Shevchenko Kyiv National University, 2008. – P. 179.

329. Zhivotova E .N. Phase behaviour of the binary system water+oxyethylated glycerol of polymerization degree $n=25$ / E. Zhivotova, A. Zinchenko, L. Kuleshova, E. Dukhopelnykov, V. Chekanova, A. Kompaniets // Structure and Dynamics of Hydrogen-Bonded Systems: International Conference, 26-27 October 2009: Book of Abstracts. – Miramare, Trieste (Italy): International Centre for Theoretical Physics, 2009. – P.45.

330. Пушкарь Н. С. Физико-химические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / Н. С. Пушкарь, Е. А., Гордиенко, Л. Г. Кулешова, О. И. Гордиенко, Л. Ф. Розанов, Г. С. Ишков // Криобиология. – 1985. – № 1. – С. 23–29.

331. Пушкарь Н. С. Физико-химические основы и перспективы развития технологии низкотемпературного консервирования биологических объектов / Н. С. Пушкарь, О. И. Гордиенко, Л. Г. Кулешова, Г. С. Ишков // Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины : международная конф., 10-12 февраля 1988 г. : тезисы докладов. – Харьков, 1988. – С. 79.

332. Пушкарь Н. С. Исследование физических процессов в биологических объектах при глубоком охлаждении / Н. С. Пушкарь, Е. А. Гордиенко, А. И. Осецкий, О. И. Гордиенко, Л. Г. Кулешова // Проблемы криобиологии. – 1995. – № 3. – С. 30–37.

333. Паращук Ю. С. Влияние процессов замораживания – оттаивания на

морфофункциональные показатели спермиев человека / Ю. С. Паращук, Е. А. Гордиенко, Л. Г. Кулешова // Криобиология. – 1988. – № 2. – С. 19-21.

334. Грищенко В. И. Ультраструктура сперматозоидов человека после криоконсервации / В. И. Грищенко, Ю. С. Паращук, А. С. Капрельянц // Криобиология и криомедицина. – 1984. – Вып. 14. – С. 50–54.

335. Белоус А. М. Криоконсервация репродуктивных клеток / Белоус А. М., Грищенко В. И., Паращук Ю. С. – К. : Наук. думка, 1986. – 208 с.

336. Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa / R. V. Devireddy, D. J. Swanlund, A. S. Alghamdi [et al.] // Reproduction. – 2002. – V. 124, № 5. – P. 643–648.

337. Пат. 13689 Україна, МПК A01N1/00. Спосіб консервування сперми людини / Грищенко В. І., Пушкар М. С., Паращук Ю. С., Гордієнко Є. О., Капрел'янц О. С. ; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України – № 3456575/SU ; заявл. 18.06.82 ; надрук. 25.04.97, Бюл. № 2.31.15.

338. Pushkar N. S. Role of Osmotic Factors in Cell Injury During Freeze-Thawing of Cell Suspensions / N. S. Pushkar, L. F., Rozanov, E. A. Gordienko, L. G. Kuleshova // The Society for Low Temperature Biology: International Meeting University of Leuven, 19-23 july, 1994: Proceedings. – Leuven (Belgium). – 1994. – P. 22.

339. Leibo S. P. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing / S. P. Leibo, P. Mazur, S. C. Jackowski // Exp. Cell. Res. – 1974. – V. 89, № 1. – P. 79–88.

340. Agca Y. Cryobiology of embryos, germ cells, and ovaries / Y. Agca // ILAR Journal. – 2000. – V. 41, № 4. – P. 207–220.

341. Shaw J. M. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue / J. M. Shaw, A. Oranratnachai, A. O. Trounson // Theriogenology. – 2000. – V. 53, № 1. – P. 59–72.

342. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and

stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing / I. Wilmut // *Life Sci.* – 1972. – V. 11, № 22, Part. II. – P. 1071–1079.

343. Карлсон Б. Основы эмбриологии по Пэттену: в 2 т / Карлсон Б. ; пер. с англ. М. Калецкой ; под ред. Б. В. Конюхова. – М. : Москва, 1983. – Т. 1. – 357 с.

344. Clegg K. B. Quantitative aspects of RNA synthesis and polyadenylation in 1-cell and 2-cell mouse embryos / K. B. Clegg, L. Piko // *J. Embryol. Exp. Morph.* – 1983. – V. 74. – P. 169–182.

345. Stage – specific expression of a family of proteins that are major products of zygotic gene activation in the mouse embryo / J. E. Conover, G. L. Temeles, J. W. Zimmermann [et al.] // *Dev. Biol.* – 1991. – V. 144, № 2. – P. 392–404.

346. Кулешова Л. Г. Криомикроскопический анализ замораживания эмбрионов мыши ранних стадий развития / Л. Г. Кулешова, О. В. Пишко // *Пробл. криобиологии.* – 2005. – Т. 15, № 2. – С. 119–128.

347. Смольянинова Е. И. Влияние различных этапов криоконсервирования методом сверхбыстрого замораживания на осмотическую устойчивость и морфофункциональную сохранность эмбрионов мыши / Е. И. Смольянинова, О. Б. Хроменкова, Г. В. Жерноклев // *Пробл. криобиологии.* – 2001. – № 2. – С. 49–55.

348. Выживаемость эмбрионов мышей после сверхбыстрого замораживания разными способами с использованием различных криопротекторов / А. С. Кривохарченко, Л. И. Вильянович, Г. А. Серобян [и др.] // *Пробл. репродукции.* – 1995. – № 4. – С. 13–18.

349. Hochi S. Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses / S. Hochi // *J. Reprod. Dev.* – 2003. – V. 49, № 1. – P. 13–21.

350. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification / S. Hochi, T. Fujimoto, J. Braun, N. Oguri // *Theriogenology.* – 1994. – V. 42, № 3. – P. 483–488.

351. Hochi S. Direct transfer of equine blastocysts frozen – thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose / S. Hochi, K. Maruyama, N. Oguri //

Theriogenology. – 1996. – V. 46, № 7. – P. 1217–1224.

352. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8- cell mouse embryos / T. Mukaida, S. Wada, K. Takahashi [et al.] // Hum. Reprod. – 1998. – V. 13, № 10. – P. 2874–2879.

353. Nowshari M. A. Effect of cryoprotectants and their concentration on post – thaw survival and development of expanded mouse blastocysts frozen by a simple rapid – freezing procedure / M. A. Nowshari, G. Brem // Theriogenology. – 1998. – V. 50, № 7. – P. 1001–1013.

354. Пишко О. В. Осмотическое поведение ооцитов и эмбрионов мыши на различных этапах криоконсервирования : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук : спец. 03.00.19 “Криобиология “ / О. В. Пишко. – Харьков, 2005. – 20 с.

355. Черницкий Е. А. Структура и функция эритроцитарных мембран / Е. А. Черницкий, А. Б. Воробей. – Минск : Наука и техника, 1981. – 243 с.

356. Isomaa B. Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes / B. Isomaa, H. Hagerstrand, G. Paatero // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – V. 899, № 1. – P. 93–103.

357. Butikofer P. Modulation of erythrocytes vesiculation by amphiphilic drugs / P. Butikofer, U. Brodbeck, P. Ott // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – V. 901, № 2. – P. 291–295.

358. Черный В. В., Пауличке М. Влияние амфифильных молекул на форму эритроцитов / В. В. Черный, М. Пауличке // Биол. мембраны. – 1990. – Т. 7, № 8. – С. 838–842.

359. Гендедь Л. Я. Структурно-функциональные взаимодействия физиологически активных соединений с биомембранами / Л. Я. Гендедь, К. Е. Круглякова // Метод спиновых меток и зондов: Проблемы и перспективы : [сб. статей / под ред. Н. М. Эммануэля, Р. И. Жданова]. – М. : Наука, 1986. – С. 163–194.

360. Лунева О. Г. Особенности связывания органических неэлектролитов эритроцитарной мембраны / О. Г. Лунева, Л. Я. Гендель, К. Е. Круглякова //

Биофизика. – 2002. – Т. 47, вып. 1. – С. 38–44.

361. Кулешова Л. Г. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений / Л. Г. Кулешова, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Пробл. криобиологии. – 2001. – № 1. – С. 8–14.

362. Jay A. W. L. Geometry of the human erythrocyte / A. W. L. Jay // Biophys. J. – 1975. – V. 15, № 3. – P. 205–222.

363. Маркин В. С. Организация мембран в плоскости слоя и форма клетки. Биологические следствия теории / В. С. Маркин // Биофизика. – 1981. – Т. XXVI. – Вып. 1. – С. 158–167.

364. Козлов М. М. Свободная энергия и спонтанная кривизна заряженной мембраны с гликокаликсом / М. М. Козлов, Д. Г. Лерхе, В. С. Маркин // Биол. мембраны. – 1985. – Т. 2, № 8. – С. 806–811.

365. Sheetz M. P. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions / M. P. Sheetz, S. J. Singer // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1974. – V. 71. – P. 4457–4461.

366. Sheetz M. P. Equilibrium and kinetic effects of drugs on the shapes of human erythrocytes / M. P. Sheetz, S. J. Singer // J. Cell. Biol. – 1976. – V. 70, № 1. – P. 247–251.

367. Ивенс И. Механика и термодинамика биологических мембран / И. Ивенс, Р. Скейлак. : пер. с англ. Ю. А. Ермакова / под ред. В. С. Маркина, С. А. Регирера. – Москва : Мир, 1982. – 304 с.

368. Heerklotz H. Titration calorimetry of surfactant membrane partitioning and membrane solubilization / H. Heerklotz, J. Seeling // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1508, № 1–2. – P. 69–85.

369. Permeability alterations and antihemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes / B. Isomaa, H. Hagerstrand, G. Paatero, A. C. Engblom // Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – V. 860. – P. 510 – 524.

370. Коваленко С. Є. Можливі механізми антигемолітичної дії хлорпромазину / С. Є. Коваленко, Л. І. Алексєєва, Л. Г. Кулешова, І. Ф. Коваленко, В. С. Холодний, Є. О. Гордієнко, О. І. Гордієнко // Пробл.

криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 2. – С. 137–146.

371. Gordiyenko O. I. Possible mechanisms of chlorpromazine antihemolitical effect / O. I. Gordiyenko, S. E. Kovalenko, L. G. Kuleshova // 16th Meeting of the European Association for Red Cell Research, March 16-19, 2007 : Theses. – Oxford (Great Britain), 2007. – PC11.

372. Кулешова Л. Г. Трансформация эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда Н-спиртов. Часть 1. Морфологический аспект взаимодействия / Л. Г. Кулешова // Пробл. криобиологии – 1999. – № 1. – С. 9–13.

373. Кулешова Л. Г. Трансформация эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда Н-спиртов. Часть 2. Перераспределение неэлектролитов в системе “клетка – среда” / Л. Г. Кулешова, Ю. В. Кучеренко // Проб. криобиологии – 1999. – № 2. – С. 12–16.

374. Зинченко В. Д. Форма эритроцитов и характер распределения неэлектролитов ряда Н-спиртов между клеткой и средой / В. Д. Зинченко, Л. Г. Кулешова, Ю. В. Кучеренко, М. И. Щетинский // II съезд биофизиков России, 23-27 августа 1999 г. : тезисы докл. – Москва : Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 1999. – Т. II. – С. 506.

375. Kuleshova L. G. Erythrocytes' shape as indicator of peculiarities of redistribution of substances in the “cell-medium” system / L. G. Kuleshova // 14th Meeting of the European Association for Red Cell Research, April 24-28, 2003 : – Theses. – Roscoff (France), 2003. – P. 41–42.

376. Stokke B. J. The human erythrocyte membrane skeleton may be an ionic gel. 2. Numerical analyses of cell shapes and shape transformations / B. J. Stokke, A. Mikkelsen, A. Elgsaeter // Eur. Biophys. J. – 1985. – V. 13, № 4. – P. 219–233.

377. Heat-induced alterations in monkey erythrocyte membrane phospholipid organization and skeletal protein structure and interactions / A. Kumar, S. R. P. Gudi, S. M. Gokhale [et al] // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – V. 1030, № 2. – P. 269–278.

378. Паршина Е. Ю. Влияние новых гибридных антиоксидантов – ихфанов – на морфологию эритроцитов / Е. Ю. Паршина, Л. Я. Гендель, А. Б. Рубин // Биофизика. – 2004. – Т. 49, вып. 6. – С. 1094–1098.

379. Пичугин Ю. И. Лиотропный ряд криопротекторов / Ю. И. Пичугин, А. Н. Новиков, С. Т. Олейник // Криобиология и криомедицина. – 1984. – № 7. – С. 12–13.

380. Гордієнко О. І. Механізми пасивної проникності до неелектролітів та індекс сферичності еритроцитів людини : дис. ... доктора фіз.-мат. наук : 03.00.02 / Гордієнко Ольга Іванівна. – Харків, 2004. – 277 с.

381. A semi-empirical conformational analysis of the interaction of n-alkanols with dipalmitoylphosphatidylcholine / R. Brasseur, P. Chatelain, E. Goormaghtigh, J. M. Ruyscheq // Biochim. Biophys. Acta. – 1985. – V. 814, № 2. – P. 227–236.

382. Harris R. A. Membrane fluidity and alcohol actions / R. A. Harris, R. J. Hitzemann // Cur. Alcohol. – 1981. – V. 8. – P. 379–404.

383. Interaction of amphiphilic molecules with biological membranes. A model for nonspecific and specific drug effects with membranes / L. Herbette, C. A. Napolitano, F. C. Messineo, A. M. Katz // Adv. Myocardiol. – 1985. – V. 5. – P. 333–346.

384. Quinn P. J. Membrane lipid phase behavior and lipid-protein interactions / P. J. Quinn // Subcell. Biochem. – 1989. – V. 14. – P. 25–95.

385. Новиков А. Н. Адсорбционная активность этиленгликоля и криопротекторов ряда ПЭО / А. Н. Новиков, О. В. Липина, С. Т. Олейник // Криобиология и криомедицина. – 1983. – Вып. 13. – С. 39–42.

386. Lipid-polyethylene glycol interactions: I. Induction of fusion between liposomes / L. T. Boni, T. P. Stewart, J. L. Alderfer, S. W. Hui // J. Membrane Biol. – 1981. – V. 62, № 1–2. – P. 65–70.

387. Lipid-polyethylene glycol interactions: II. Formation of defects in bilayers / L. T. Boni, T. P. Stewart, J. L. Alderfer, S. W. Hui // J. Membrane Biol. – 1981. – V. 62, № 1–2. – P. 71–77.

388. Ohno H. Interaction of human erythrocyte ghosts with liposomes polyethylene glycol / H. Ohno, T. Sakai // BBA. – 1982. – V. 745, № 5. – P. 526–531.

389. Гордиенко О. И. Водный диффузионный обмен и электрические характеристики эритроцитов в средах с криопротекторами / О. И. Гордиенко, И.

А. Некоз, В. И. Шейкин // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов: [сб. науч. трудов / отв. ред. В. И. Луговой]. – Харьков, 1990. – С. 36-41.

390. Землянских Н.Г. Структурно-функциональные изменения мембран эритроцитов в процессе криоконсервирования под защитой ПЭГ-1500 : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук : спец. 03.00.22 “Криобиология” / Н.Г. Землянских. – Харьков, 1991. – 24 с.

391. Effect of poly(ethylene oxide)–containing surfactants on membrane – membrane interaction / K. Arnold, Y. M. Lvov, M. Szogyi, S. Gyorgyi // Stud. Biophys. – 1986. – V. 113, № 1–2. – P. 7–14.

392. McDonald R. I. Membrane fusion due to dehydration by polyethylene glycol, dextran, or sucrose / R. I. McDonald // Biochemistry. – 1985. – V. 24, № 15. – P. 4058–4066.

393. Mircevova L. Contractile protein-intermediary of Ca^{2+} and ATP effect on erythrocyte membrane properties / L. Mircevova, M. Kodicek, H. Pilcova // Stud. Biophys. – 1989. – V. 134, № 1–2. – P. 39–42.

394. Гаврилова И. И. Изучение влияния низкой температуры и криопротекторов на структурно – конформационные переходы в некоторых белках и мембранах эритроцитов : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук : спец. 03.00.22 “Криобиология” / И. И. Гаврилова. – Харьков, 1982. – 24 с.

395. Кучеренко Ю. В. Элиминация белков мембран эритроцитов человека, индуцированная ПЭГ-1500 / Ю. В. Кучеренко, Е. Д. Розанова // Проблемы криобиологии. – 1999. – № 4. – С. 21–23.

396. Денисова О. Н. Трансформация эритроцитов животных после криоконсервирования / О. Н. Денисова, Л. Г. Кулешова, Н. Г. Землянских, Г. Ф. Жегунов // Вісник проблем біології і медицини. – 2005. – вип. 4. – С. 41–44.

397. Денисова О. Н. Морфологические изменения эритроцитов животных после криоконсервирования / О. Н. Денисова, Л. Г. Кулешова, Н. Г. Землянских, Л. А. Бабийчук, Г. Ф. Жегунов // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 2. –

С. 113–214.

398. Гордиенко Е. А. Биофизическая модель явления гипертонического криогемолиза / Е. А. Гордиенко, С. Е. Коваленко // Пробл. криобиологии. – 1996. – № 4. – С. 24–31.

399. Коваленко С. Є. Причина та механізм явища гіпертонічного криогемолізу: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня. канд. біол. наук: спец. 03.00.19 “Кріобіологія” / С.Є. Коваленко. – Харків, 1999. – 18 с.

400. Lovelock J. E. Physical instability and thermal shock in red cells / J. E. Lovelock // Nature. – 1954. – V. 173, № 4406. – P. 659–661.

401. Green F. A. Cold-induced hemolysis in a hypertonic milieu / F. A. Green, C.Y. Jung // J. Membrane. Biol. – 1977. – V. 33. – P. 249–262.

402. Торубарова Н. А. Кроветворение плода и новорожденного / Торубарова Н. А., Кошель И. В., Яцык Г. В. – Москва : Медицина, 1993. – 207 с.

403 Вартанян М. М. Особенности красной крови матери и новорожденного при гипотрофии плода / М. М. Вартанян // Акушерство и гинекология. – 1986. – № 3. – С. 37–38.

404. Гематология детского возраста с атласом миелограмм / [Резник Б. Я., Шапетько В. П., Новицкая В. М., Цыба Л. Н.] ; под ред. Б. Я. Резника. – Киев : Здоров'я, 1974. – 390 с.

405. Кулешова Л. Г. Гипертоническая устойчивость фетальных эритроцитов человека в электролитной среде / Л. Г. Кулешова // Пробл. криобиологии. – 2003. – № 4. – С. 20–27.

406. Голованов М. В. Способ определения гипертонической устойчивости эритроцитов / М. В. Голованов // Гематол. и трансфузиол. – 1991. – № 7. – С. 39–40.

407. Morris G.J. Effects of cooling rate on thermal shock hemolysis / G.J. Morris, J. Farrant // Cryobiology. – 1973. – V. 10, № 2. – P. 119–125.

408. Takahashi T. Thermal shock hemolysis in human red cells. I. The effects of temperature, time and osmotic stress / T. Takahashi, R. J. Williams // Cryobiology. – 1983. – V. 20, № 5. – P. 507–520.

409. Леонова В. Г. Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека / Леонова В. Г. – Новосибирск : Наука, 1987. – 242 с.

410. Оцінка стану популяції еритроцитів людини по їх розподілу за індексом сферичності / О. І. Гордієнко, Є. О. Гордієнко, Л. І. Алексєєва, І. Ф. Коваленко // Доповіді НАН України. – 2002. – № 10. – С. 172–177.

411. Rachman J. E. Studies on the mechanism of erythrocyte aging and destruction / J. E. Rachman, B. J. Wright, E. A. Cerny // Mechanisms of aging and development. – 1973. – Vol.2, № 2. – P.151–162.

412. Авратинский О. И. Структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов у здоровых новорожденных в первые дни жизни / О. И. Авратинский // Акушерство и гинекология. – 1986. – № 3. – С. 33–34.

413. Кассирский И. А. Клиническая гематология / И. А. Кассирский, Г. А. Алексеев. – М. : Медицина, 1970. – 780 с.

414. Meryman H. T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury / H. T. Meryman // Cryobiology. – 1971. – V. 8, № 5.— P. 489–500.

415. Кулешова Л. Г. Постгіпертонічний кріогемоліз фетальних еритроцитів людини в електролітному середовищі / Л.Г. Кулешова // III з'їзд Українського біофізичного товариства, 8-11 жовтня 2002 р. : тези доповідей. – Львів : Львівський національний університет імені Івана Франка, 2002. – С. 229.

416. Кулешова Л. Г. Криогемоліз фетальних еритроцитів в гипертонической среде электролита / Л. Г. Кулешова // Пробл. криобиологии. – 2004. – № 2. – С. 36–41.

417. Cold shock – a widespread cellular reaction / G. J. Morris, G. Coulson, M. A. Meyer [et al] // Cryo-Letters. – 1983. – V. 4, № 3. – P. 179–192.

418. Minetti M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells / M. Minetti, M. Ceccarini, A. M. M. Di Stasi // J. Cell. Biochem. – 1984. – № 25, № 2. – P. 61–72.

419. Кулешова Л. Г. Изучение кинетики взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами и солями / Л. Г. Кулешова, Л. Ф. Розанов // Криобиология и криомедицина. – 1980. – вып. 7. – С. 40–44.

420. Кулешова Л. Г. Оценка состояния поверхности эритроцитов в гипертонической среде электролита. 1. Морфологический аспект / Л. Г. Кулешова // Вісник ХДУ. Біофіз.вісник. – 2002. – вип. 2(11) – С. 54–56.

421. Гордиенко Е. А. Физико-математическая модель латерального перераспределения липидов при изотермической деформации / Е. А. Гордиенко, М. В. Войнова // Криобиология. – 1985. – № 3. – С. 43–48.

422. Humphries G. M. K. Lateral phase separation of phospholipids as a basis for increased permeability of membranes towards fluorescent other chemical species / G. M. K. Humphries, I. P. Lovejoy // J. Membr. Biol. – 1984. – V. 80. – P. 249–257.

423. Белоус А. М. Роль белков цитоскелета в холодовой стабильности клеток / А. М. Белоус // Криобиология. – 1990. – № 3. – С. 3–12.

424. Haest C. W. V. Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane / C. W. V. Haest // BBA. – 1982. – V. 694. – P. 331–352.

425. Hsu L. The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeleton components / L. Hsu, M. Morrison // Arc. Biochem. Biophys. – 1983. – V. 227, № 1. – P. 31–38.

426. Бондаренко В. А. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток / В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко, С. В. Руденко // Пробл. криобиологии. – 1992. – № 4. – С. 14–25.

427. Ландау Л. Д. Теория упругости / Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц. – М. : Наука, 1987. – 246 с.

428. Межидов С. Х. Влияние повышенных концентраций хлорида натрия и температуры на состояние цитозоля эритроцитов / С. Х. Межидов, В. А. Моисеев, О. А. Нардид // Биофизика. – 1987. – Т. 32, № 3. – С. 528–530.

429. Savitz D. Osmotic properties of human red cells / D. Savitz, V. W. Sidel, A. K. Solomon // J.Gen.Physiol. – 1964. – V. 48, № 1. – P. 79–94.

430. Гордиенко Е. А. Основные закономерности явления гипертонического криогемолиза / Е. А. Гордиенко, С. Е. Коваленко // Пробл. криобиологии. – 1997. – № 3. – С. 3–7.

431. Поликкар А. Поверхность клетки и ее микросреда / Поликкар А. ; пер. с французского И. В. Цоглиной / под ред. С. Я. Залкинда. – М. : Мир, 1975. – 108 с.
432. Терехов Н. Т. Клиническое применение консервированных эритроцитов / Н. Т. Терехов, М. М. Петров. – Киев : Здоров'я. – 1983. – 144 с.
433. Сигал В. Л. Модельные представления об эритроците в анализе экспериментальных данных по электрофорезу. III. Гликокаликс эритроцитарной мембраны как адсорбционный слой нейтрального полимера / В. Л. Сигал. – М., 1986. – 42 с. – Деп. в ВИНТИ 30.10.86, № 7476-В-86.
434. Кулешова Л. Г. Оценка состояния поверхности эритроцитов человека в гипертонической среде электролита. 2. Состояние внешних примембранных слоев / Л. Г. Кулешова // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник. – 2003. – вип. 1. – С. 89–91.
435. Витік калію і щільність розподілу за індексом сферичності в популяціях еритроцитів при експозиції в гіпертонічних розчинах хлориду натрію / Л. І. Алексєєва, С. Є. Коваленко, В. С. Холодний, О. І. Гордієнко // – Пробл. криобиології. – 2005. – Т. 15, № 2. – С. 159–172.
436. Одиноква В. А. Морфофункциональные изменения эритроцитарных мембран при некоторых экстремальных состояниях / В. А. Одиноква, Н. Н. Квитко, А. Я. Олышанский // Сов. мед. – 1985. – № 10. – С. 20–22.
437. Streichman S. Hypertonic cryohemolysis of pathologic red blood cells / S. Streichman, E. Kahana, I. Tatarsky // Am J Hematol. – 1985. – V. 20, № 4. – P. 373–381.
438. Streichman S. Hypertonic cryohemolysis: A diagnostic test for hereditary spherocytosis / S. Streichman, Y. Gescheidt, I. Tatarsky // Am J Hematol. – 1990. – V. 35, № 2. – P. 104–109.
439. Streichman S. Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: Correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis / S. Streichman, Y. Gescheidt // Am J Hematol. – 1998. – V. 58, № 3. – P. 206–212.
440. Usefulness of cryohemolysis test in the diagnosis of hereditary spherocytosis / R. R. Romero, J. L. Poo, J. A. Robles [et al.] // Arch Med Res. – 1997. –

V. 28, №. 2. – P. 247–251.

441. Cryohemolysis test as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis / A. Iglauer, D. Reinhardt, W. Schrotten, A. Pekrun // *Ann Hematol.* – 1999. – V. 78, № 12. – P. 555–557.

442. Gottfried E. L. Glycerol lysis time of incubated erythrocytes in the diagnosis of hereditary spherocytosis / E. L. Gottfried, N. A. Robertson // *J. Lab Clin. Med.* – 1974. – V. 84. – P. 746–752.

443. Ширяев В. В. Показатель глицериновой устойчивости эритроцитов в оценке эритрона / В. В. Ширяев // *Лабораторная диагностика : III Всесоюзный съезд врачей лаборантов, 15-17 мая 1985 : тезисы докладов.* – Москва, 1985. – С. 196.

444. Лисовский В. А. Трансформация эритроцитов как диагностический тест в клинической практике / В. А. Лисовский, В. Н. Кидалов, В. В. Гуш // *Лаб. дело.* – 1985. – № 10. – С. 594–598.

445. Polarizability of human red blood cells and conformational state of glycocalyx / H. Baumler, I. Djenev, S. Iovtchev [et al.] // *Stud. biophys.* – 1988. – V. 125, № 1. – P. 45–51.

446. Кулешова Л. Г. Сравнительная оценка устойчивости формы эритроцитов гетеротермных животных / Л. Г. Кулешова, В. И. Загнойко // *Пробл. криобиологии.* – 1994. – № 2. – С. 25–28.

447. Проницаемость мембран эритроцитов *Citellus Undulatus* в условиях гипотермического хранения / В. И. Загнойко, О. А. Нардид, Л. Г. Кулешова, А. К. Гулевский, В. А. Моисеев // *Биофизика.* – 1993. – Т. 38, № 4. – С. 687–692.

448. Кулешова Л. Г. Оценка устойчивости формы эритроцитов больных вибрационной болезнью в условиях гипотермического хранения / Л. Г. Кулешова, В. А. Капусник // *I з'їзд Українського товариства кріобіології і кріомедицини, 18-20 жовтня 1995 р. : тези доповідей.* – Харків : Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 1995. – С. 134.

449. Пат. 14814 (Україна) МПК⁵ А61В 10/00. Спосіб визначення ступеню тяжкості вібраційної хвороби / Кулешова Л. Г., Костюк І. Ф., Капусник В. А.;

заявник та патентовласник Харківський державний медичний університет. – № 96062539; заявл. 26.06.96 ; надр. 30.06.97, Б.И. №3. –с. 3.1.21.

450. Кулешова Л. Г. Морфологічні зміни еритроцитів людини за умов охолодження / Л. Г. Кулешова // Фізіологічний журнал. – 2005. – Т. 51, № 3. – С. 73–77.

451. Суворов Г. А. Современные аспекты этиологии, патогенеза, клиники и профилактики вибрационной болезни от воздействия локальной вибрации / Г. А. Суворов, В. Г. Артамонова // Вестн. АМН СССР. – 1992. – № 1. – С. 28–32.

452. А.с. 1508160 СССР МКИ⁴ G 01 N 33/489/. Способ ранней диагностики вибрационной болезни / Н. Х. Перминов, В. Н. Касьяновский, В. П. Касьяновская. – № 4239762/28-14 ; заявл. 04.05.87 ; опубл. 1989, Бюл. №34. – с. 201.

453. Алексеева Г. А. Состояние эритроцитов периферической крови при воздействии вибрации / Г. А. Алексеева, В. М. Погорелов. // Медицина труда и промышленная экология. – 1995. – № 5. – С. 27–30.

454. Изменение агрегационных и физико-химических свойств крови при вибрационной болезни / М. П. Попов, Д. И. Зюбан, А. В. Сорокин [и др.] // Гематол. и трансфузиол. – 1992. – № 11–12. – С. 28–30.

455. Гепатоцит: Функционально-метаболические свойства / [Гулак П. В., Дудченко А. М., Зайцев В. В. и др.] ; под ред. Л. Д. Лукьянова. – М. : Наука, 1985. – 271 с.

456. Ченцов Ю. С. Биоэнергетические, цитохимические и тинкториальные свойства гепатоцитов в норме, при функциональных нагрузках, адаптациях к изменениям среды и при неспецифических повреждениях / Ю. С. Ченцов, М. И. Косых // Цитология. – 1995. – Т. 37, № 2. – С. 1123–1135.

457. Гордиенко Е. А. Реактивный эффект при осмотическом лизисе клеток / Е. А. Гордиенко, И. А. Некоз // Биол. мембраны. – 1989. – Т. 6, № 11. – С. 1170–1173.

458. Baker R. F. Entry of ferritin into human red cells during hypotonic hemolysis / R. F. Baker // Nature. – 1967. – V. 215, № 99. – P. 424–425.

459. Huhn D. Die Erythrocyten Membran Feinstruktur der Gefriergeatzten

membran nach Einwirkung von hypotonen Zosengen und Saponin / D. Huhn, G. D. Pauli, D. Grassmann // *Klin. Wochenschr.* – 1970. – V. 48, № 15. – P. 939–943.

460. Saari J. T. Probability density function of the red cell membrane permeability coefficient / J. T. Saari, J. S. Beck. // *Biophys. J.* – 1974. – V. 14, № 1. – P. 33–38.

461. Кулешова Л. Г. Постгіпертонічний лізис гепатоцитів щура / Л. Г. Кулешова // I з'їзд Українського біофізичного товариства, 20-24 червня 1994 р. : матеріали з'їзду. – Київ : Київський університет ім. Тараса Шевченка, 1994. – С. 138–139.

462. Kuleshova L. G. Regulation of rat's hepatocyte cell volume under non-isotonic conditions / L. G. Kuleshova // *Low Temperature Biology “Cryobiomol – 2003”*: International Conference, 14-18 September, 2003 : book of abstracts – Coimbra (Portugal), 2003. – P. 152.

463. Кулешова Л. Г. Механизм постгипертонического лизиса изолированных гепатоцитов крысы при регидратации / Л. Г. Кулешова // *Пробл. криобиологии.* – 2006. – Т. 16, № 4. – С. 351–362.

464. Chesne S. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes: A critical evaluation of freezing and thawing conditions / S. Chesne, A. Guillouzo // *Cryobiology.* – 1988. – V. 25, № 4. – P. 323–330.

465. Петренко А. Ю., Грищук В. П. Влияние замораживания-отогрева под защитой диметилсульфоксида на сохранность изолированных гепатоцитов крыс / А. Ю. Петренко, В. П. Грищук // *Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов* : [сб. науч. трудов / отв. ред. В. И. Луговой]. – Харьков, 1990. – С. 109–114.

466. Некоз И. А. Особенности гемолиза эритроцитов в водных растворах глицерина / И. А. Некоз, Е. А. Гордиенко, Л. Г. Кулешова, Л. Ф. Розанов // *Криоконсервирование клеток и тканей* : [сб. науч. трудов / отв. ред. Н. С. Пушкаръ]. – Харьков, 1989. – С. 54–61.

467. McGrath J. J. Cryomicroscopy of liposome systems as simple models to study cellular freezing response / J. J. McGrath // *Cryobiology.* – 1984. – V. 21, № 1. –

P. 81–92.

468. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран / В. Ф. Антонов, А. А. Аносов, Н. Э. Богатырева [и др.] // II съезд биофизиков России, 23-27 августа 1999 г. : тезисы докладов. – Москва : Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 1999. – Т. 2. – С. 476–477.

469. Черномордик Л. В. Долгоживущие дефекты в липидном бислое после обратимого пробоа / Л. В. Черномордик, С. И. Сухарев, И. Г. Абидор // Биол. мембраны. – 1985. – Т. 2, № 1. – С. 87–94.

470. Козлов М. М. Теория осмотического лизиса липидных везикул / М. М. Козлов, В. С. Маркин // Биол. мембраны. – 1984. – Т. 1, № 1. – С. 74–78.

471. Гордиенко Е. А. Физико – математическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека. Ч. I. Этап набухания / Е. А. Гордиенко, Ю. Е. Панина // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник. – 1998. – № 1. – С. 79–85.

472. Гордиенко Е. А. Физико – математическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов. Ч. II. Этап гемолиза / Е.А. Гордиенко, Ю.Е. Панина // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник. – 1998. – № 2. – С. 54–58.

473. Gordienko E. A. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon / E. A. Gordienko, Yu. E. Gordienko, O. I. Gordienko // Cryo – Letters. – 2003. – V. 24, № 4. – P. 229–244.

474. Тимофеева Е. В. Теоретическое обоснование способа оценки модуля изотропного растяжения клеточной мембраны гепатоцитов крысы / Е. В. Тимофеева, Л. Г. Кулешова // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник. – 2004 – вип. 1-2(14). – С. 85–87.

475. Гордиенко Е. А. Модуль упругости плазматической мембраны изолированных гепатоцитов крысы / Е. А. Гордиенко, Л. Г. Кулешова, Е. В. Тимофеева // Актуальні проблеми і досягнення кріобіології і кріомедицини. Структурна і морфофункціональна організація стовбурових клітин за умов дії низьких температур : міжнародна конференція, 22-24 листопада 2005 р. : тези доповідей. – Пробл. криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 279.

476. Wanson J. Morphology and functional properties of isolated and cultured

hepatocytes / J. Wanson, D. Bernaert, C. May // Progress in liver diseases ; Ed. H. Popper. – N.Y. : Raven press, 1979. – V. 6. – P. 1–22.

477. Kuleshova L. G. Permeability Factor of Rat Hepatocyte Membranes for Water Molecules in Electrolyte Hypertonic Medium / L. G. Kuleshova, E. A. Gordienko // The Society for Low Temperature Biology: International Meeting University of Leuven, 19-23 july, 1994 : abstracts. – Leuven (Belgium). – 1994. – P. 23.

478. Кулешова Л. Г. Гіпертонічний шок гепатоцитів щура в умовах сольового впливу / Л. Г. Кулешова // І з'їзд Українського біофізичного товариства, 20-24 червня 1994 р. : матеріали з'їзду. – Київ : Київський університет ім. Тараса Шевченка, 1994. – С. 139–140.

479. Кулешова Л. Г. Проницаемость плазматических мембран гепатоцитов крысы для молекул воды в неизотонической среде электролита / Л. Г. Кулешова, Е. А. Гордиенко, И. Ф. Коваленко // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник. – 2002. – вип. 2(11). – С. 39–42.

480. Панков Е. Я. Дискомпартаментность – неспецифическое морфологическое проявление криоповреждения / Е. Я. Панков, Э. И. Обозная, Л. Г. Кулешова, Т. П. Говоруха // Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов : Вторая всесоюзная конференция, 9-11 октября 1984 г. : тезисы докладов. – Харьков : Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, 1984. –Т. 1. – С. 66.

481. Water and non-electrolyte permeability of isolated rat hepatocytes / G. Alpini, A. A. Garrick, M. J. T. Jones [et al.] // Amer. J. Physiol. – 1986. –V. 251, № 6, Pt. 1. – С. 872–882.

482. Котык А. Мембранный транспорт / А. Котык, К. Яначек ; пер. с англ. Ю. А. Ермакова, А. М. Юркевича / под ред. Ю. А. Чизмаджева. – М. : Мир, 1980. – 150с.

483. Холодный В. С. Изучение процессов, происходящих на различных этапах низкотемпературного консервирования в суспензиях ядродержащих клеток костного мозга и кордовой крови : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.19 /

Холодный Виталий Сергеевич. – Харьков, 2003. – 148 с.

484. Тарасов А. И. Осмотические характеристики кроветворных клеток предшественников эмбриональной печени человека / А. И. Тарасов, А. Ю. Петренко, Д. Р. Е. Джонс // Вісник ХНУ №568, Біофізичний вісник. – 2002. – вип. 2 (11). – С. 57–61.

485. Маркин В. С. Статистика пор в бислойных липидных мембранах / В. С. Маркин, М. М. Козлов // Биол. мембраны. – 1985. – Т. 2, № 2. – С. 205–223.

486. Механизмы проницаемости криопротекторов через мембраны эритроцитов / О. И. Гордиенко, Е. А. Гордиенко, Т. П. Линник, А. М. Компаниец // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 4. – С. 9–15.

487. Линник Т. П. Физико-химические факторы криоповреждений и криозащиты спермы петухов в цикле низкотемпературного консервирования : автореф. дис. на соискание доктора биол. наук : спец. 03.00.19 “Криобиология” / Т. П. Линник. – Харьков, 2003. – 36 с.

488. Линник Т. П. Криоконсервирование спермы петухов. I. Цитотоксичность диолов и амидов / Т. П. Линник, О. В. Бизикина // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 2. – С. 72–79.

489. Шевченко Н. А. Действие многоатомных спиртов, амидов и ДМСО на сохранность меристем винограда и картофеля / Н. А. Шевченко, Т. Ф. Стрибуль, Л. Ф. Розанов // Проблемы криобиологии. – 2004. – № 3. – С. 79–85.

490. Розанов Л.Ф. Неспецифические реакции клеток на физико-химические факторы криоконсервирования / Л.Ф. Розанов, Е.А. Гордиенко, Л.Г. Кулешова // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем : [сб. науч. трудов / отв. ред. А.М. Белоус]. – Харьков, 1989. – С. 48-52.

491. Кулешова Л. Г. Реакция мембран структурно-функциональных единиц печени (гепатоцитов) на неблагоприятные условия криоконсервирования / Л. Г. Кулешова // Структурно-функциональные единицы и их компоненты в органах висцеральных систем в норме и патологии: научно-практическая конференция, 1-3 октября 1991 г. : тезисы докладов – Харьков : Харьковский медицинский институт, 1991. – С. 130.

492. Gordienko E. A. Cell membrane bubbling phenomenon in nonisotonic solutions / E. A. Gordienko, L. F. Rosanov, L. G. Kulechova, E. I. Smolyaninova // CRYO'92 : 29th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, June 14-19, 1992 : Abstracts. – Ithaca, New York // Cryobiology. – 1992. – V. 29, № 6. – P. 787.

493. Кулешова Л. Г. Особенности реакций клеток на факторы криоконсервирования / Л. Г. Кулешова // II съезд биофизиков России, 23-27 августа 1999 г. : тезисы докладов. – Москва : Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 1999. – Т. 1. – С. 248.

494. Специфика структурных изменений и деградация ДНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха, подвергнутых различным повреждающим воздействиям / А. Ф. Мосин, В. Л. Габай, Ю. М. Макарова, В. А. Мосина // Цитология. – 1997. – Т. 39, № 2/3. – С. 209–217.

495. Робинсон М. В. Апоптоз клеток иммунной системы / М. В. Робинсон, В. А. Труфакин // Успехи современной биологии. – 1991. – Т. 3, вып. 2. – С. 246–259.

496. Блеббинг плазматической мембраны тимоцитов и апоптоз связаны с нарушением емкостного входа Ca^{2+} в клетки / С. В. Михуткина, А. Б. Салмина, А. В. Сычев [и др.] // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Т. 137, № 6. – С. 628–632.

497. Лишение сыворотки вызывает апоптоз тимоцитов, не требующий синтеза белка и генерации АТР / В. Л. Габай, В. А. Мосина, Ю. М. Макарова [и др.] // Биохимия. – 1995. – Т. 60, вып. 8. – С. 1201–1207.

498. Волянский Ю. Л. Молекулярные механизмы программированной клеточной гибели / Ю. Л. Волянский, Т. Ю. Колотова, Н. В. Васильев // Успехи современной биологии. – 1994. – Т. 114, вып. 6. – С. 679–692.

499. Индукция апоптоза в клетках костного мозга опосредуется активностью пуриnergических рецепторов / Ю. А. Успенская, С. В. Михуткина, Е. И. Таксанова [и др.] // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Т. 138, № 8. – С. 135–138.

500. Involvement of p38 in apoptosis-associated membrane blebbing and nuclear

condensation / R. G. Deschesnes, J. Hout, K. Valerie, J. Landry // *Mol. Biol. Cells.* – 2001. – V. 12, № 6. – P. 1569–1582.

501. Hagmann J. Regulation of plasma membrane blebbing by the cytoskeleton / J. Hagmann, M. M. Burger, D. Dagan // *J. Cell Biochem.* – 1999. – V. 73, № 4. – P. 488–499.

502. Успенская Ю. А. Модуляция доксорубицином биологических эффектов АТФ в клетках костного мозга *in vitro* / Ю. А. Успенская, А. Б. Егорова, В. П. Нефедов // *Бюл. экспериментальной биологии и медицины.* – 2002. – Т. 133, № 5. – С. 487–491.

503. Majno G. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death / G. Majno, I. Joris // *Amer. J. Pathol.* – 1995. – V. 146, № 1. – P. 3–15.

504. Fesus L. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death / L. Fesus, P. J. Davies, M. Piacentini // *Eur. J. Cell Biol.* – 1991. – V. 56, № 2. – P. 170–177.

505. Влияние различных концентраций цис-дихлородиамминплатины (II) в начальный период воздействия на опухолевую прогрессию и программируемую клеточную гибель асцитной карциномы Эрлиха / Б. В. Разин, Е. В. Инжеваткин, В. В. Нефедова [и др.] // *Бюл. экспериментальной биологии и медицины.* – 2001. – Т. 131, № 6. – С. 673–675.

506. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration a switch in the decision between apoptosis and necrosis / M. Leist, B. Single, A. F. Castoldi [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1997. – V. 185, № 8. – P. 1481–1486.

507. Зависимость повреждения и гибели асцитных опухолевых клеток при голодании от содержания в клетках АТФ и свободного кальция / В. Л. Габай, Ю. М. Макарова, В. А. Гуляев, А. Ф. Мосин // *Цитология.* – 1990. – Т. 32, № 7. – С. 712–719.

508. Самуилов В. Д. Программируемая клеточная смерть / В. Д. Самуилов, А. В. Олексин, Е. М. Лагунова // *Биохимия.* – 2000. – Т. 65, вып. 8. – С. 1029–1046.

509. Tsujimoto Y. Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a

determinant for cell death modes / Y. Tsujimoto // *Cell. Death. Differ.* – 1997. – V. 4, № 6. – P. 429–434.

510. Nicotera P. Energy supply and shape of death in neurons and lymphoid cells / P. Nicotera, M. Leist // *Cell. Death. Differ.* – 1997. – V. 4, № 6. – P. 435–432.

511. Oliver F.J. Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease / F. J. Oliver, J. Menissier-de Murcia, G. de Murcia // *Am. J. Hum. Genet.* – 1999. – V. 64, № 5. – P. 1282–1288.

512. Лю Б. Н. Кислородно-перекисная концепция апоптоза: повышение уровня аргументации и развития / Б. Н. Лю, М. Б. Лю // *Успехи современной биологии.* – 2005. – Т. 125, № 6. – С. 567–578.

513. Гасс Г. В. Обратимые крупномасштабные деформации клеточных мембран при электрической обработке клеток: электроиндуцируемое образование блебов / Г. В. Гасс, Л. В. Черномордик // *Биол. мембраны.* – 1989. – Т. 6, № 3. – С. 318–330.

514. Gores G. J. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury / G. J. Gores, B. Herman, J. J. Lemasters // *Hepatology.* – 1990. – V. 11, № 4. – P. 690–698.

515. Gordon F. B. Autophagic sequestration of [14C]sucrose introduced into isolated rat hepatocytes by electrical and non-electrical methods / F. B. Gordon, H. Tolleshaug, P. O. Selgen // *Exp. Cell Res.* – 1985. – V. 160, № 2. – P. 449–458.

516. Faulstich H. Preparation of tetramethylrhodaminyl-phalloidin and uptake of the toxin into short-term cultured hepatocytes by endocytosis / H. Faulstich, H. Trischmann, D. Mayer // *Exp. Cell Res.* – 1983. – V. 144, № 1. – P. 73–82.

517. Blebbing, free calcium, and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes / J. J. Lemasters, J. Di Guiseppi, A. L. Nieminen, B. Hermann // *Nature.* – 1987. – V. 325, № 1. – P. 78–81.

518. Grout B. W. N. Hepatocyte plasma membrane response to hypertonic stress and related cell viability / B. W. N. Grout, B. J. Fuller. // *Cryo-Letters.* – 1982. – V. 3, № 1. – P. 51–56.

519. Кравченко Л. П. Применение криопротекторов при гипотермическом

хранении изолированных гепатоцитов / Л. П. Кравченко, Л. П. Тягилова // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов : [сб. науч. трудов / отв. ред. В. И. Луговой]. – Харьков, 1990. – С. 64–65.

520. Петренко А. Ю. Энергетическое состояние и активность глюконеогенеза в изолированных гепатоцитах крыс до и после криоконсервирования / А. Ю. Петренко, А. Д. Росляков // Физико-химические процессы в криобиологических системах : [сб. науч. трудов / отв. ред. В. А. Моисеев]. – Харьков, 1991. – С. 111–119.

521. Кулешова Л. Г. Микроскопическое изучение кинетики изменения клеточного объема в гипертонических средах / Л. Г. Кулешова, Л. Ф. Розанов, Н. П. Лобасенко // Пробл. гематол. – 1980. – № 4. – С. 32–35.

522. Чернух А. М. Микровезикуляция, вакуолизация и пузыреобразование в эндотелии кровеносных капилляров нормальных и облученных животных / А. М. Чернух, О. В. Алексеев // Арх. анат. – 1969. – № 3. – С. 110–118.

523. Кислов А. Н. Действие осмотического градиента и модуляторов цитоскелета на функциональные свойства никотиновых рецепторов прудовика / А. Н. Кислов, Н. Р. Чекурова, А. А. Катаев // II съезд биофизиков России, 23-27 августа 1999 г. : тезисы докладов. – Москва : Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, 1999. – Т. 1. – С. 241–242.

524. Ровенский Ю. А. Растровая электронная микроскопия нормальных и опухолевых клеток / Ровенский Ю. А. – М. : Медицина, 1979. – 152 с.

525. Reversible plasma membrane ultrastructural changes correlated with electroporabilization in Chinese hamster ovary cells / M. L. Escande-Geraud, M. P. Rols, M. A. Dupont [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1988. – V. 939, № 2. – P. 247–259.

526. Авцын А. П. Ультразвуковые основы патологии клетки / А. П. Авцын, В. А. Шахламов. – М. : Медицина, 1979. – 320 с.

527. Borrelli M. J. A direct correlation between hyperthermia – induced membrane blebbing and survival in synchronous G₁ CHO cells / M. J. Borrelli, P. S. L. Wong, W. C. Dewey // J. Cell. Physiol. – 1986. – V. 126, № 2. – P. 181–190.

528. Повреждение цитоскелета и клеточных мембран при апоптозе / А. Б. Егорова, Ю. А. Успенская, С. В. Михуткина, Е. Ю. Ставицкая // Успехи современной биологии. – 2001. – Т. 121, № 5. – С. 502–510.

529. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation / J. C. Mills, N. L. Stone, J. Erhardt, R. N. Pittman // J. Cell Biol. – 1998. – V. 140, № 3. – P. 627–636.

530. SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis / J. Huot, F. Houle, S. Rousseau [et al.] // J. Cell Biol. – 1998. – V. 143, № 5. – P. 1361–1373.

531. Thrombin stimulates wortmannin-inhibitable phosphoinositide 3-kinase and membrane blebbing in CHRF-288 cells / G. S. Vemuri, J. Zhang, R. Huang [et al.] // Biochem. J. – 1996. – V. 314, № 3. – P. 805–810.

532. Hampton M.B. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis / M. B. Hampton, S. Orrenius // FEBS Lett. – 1997. – V. 414, № 3. – P. 552–556.

533. Dai J. Membrane tether formation from blebbing cells / J. Dai, M. P. Sheetz // Biophys. J. – 1999. – V. 77, № 6. – P. 3363–3370.

534. Козлов М. М. Механизм образования безбелковых участков мембраны эритроцита: разрыв мембранного скелета / М. М. Козлов, Л. В. Черномордик, В. С. Маркин // Биол. мембраны. – 1989. – Т. 6, № 6. – С. 597–611.

535. Mechanically gated channel activity cytoskeleton-deficient plasma membrane blebs and vesicles from *Xenopus* oocytes / Y. Zhang, F. Gao, V. L. Popov [et al.] // J. Physiol. – 2000. – V. 523, № 1. – P. 117–130.

536. Non equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells / G. T. Charras, J. C. Yarrow, M. A. Horton, [et al.] // Nature. – 2005. – V. 435, № 19. – P. 365–369.

537. Розанов Л. Ф. Фазовая теория строения клеток как основа для новой концепции криоповреждения и криозащиты клеточных структур / Л. Ф. Розанов, Е. А. Гордиенко, О. И. Гордиенко, Л. Г. Кулешова, Е. И. Смольянинова // Физико-химические процессы в криобиологических системах : [сб. науч. трудов / отв. ред. В.А. Моисеев]. – Харьков, 1991. – С. 134–140.

538. Кулешова Л. Г. Определение транспортных характеристик плазматических мембран клеток в условиях внеклеточной кристаллизации / Л. Г. Кулешова, И. Ф. Коваленко // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 1. – С. 3–12.

539. Кулешова Л. Г. Теоретическое прогнозирование оптимальных скоростей охлаждения клеточных суспензий / Л. Г. Кулешова, И. Ф. Коваленко // Біофіз. вісник – 2008. – вип. 20 (1). – С. 56–64.

540. Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos / P. Mazur // Cell. Biophys. – 1990. – V. 17, № 1. – P. 53–92.

541. Thirumala S. A simplified procedure to determine the optimal rate of freezing biological systems / S. Thirumala, R. V. Devireddy // J. Biomech. Eng. – 2005. – V. 127, № 2. – P. 295–300.

542. Trad F. S. Effects of cryoprotectants and ice-seeding temperature on intracellular freezing and survival of human oocytes / F. S. Trad, M. Toner, J. D. Biggers // Hum. Reprod. – 1999. – V. 14, № 6. – P. 1569–1577.

543. Kornisky B. A model of low-temperature water transport for hepatocyte spheroids / B. Kornisky, A. Hubel // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1998. – V. 858, № 1. – P. 183–190.