

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

А. М. БЕЛОУС
В. И. ГРИЩЕНКО

КРИО- БИОЛОГИЯ



КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1994

Б
И
Н
И
-
Л
-
Я
-
В
К
-
О
-
С
Т
Р
У
К
Т
У
Р
А
Д
А
Т
У
Р
А
Л
О
Г
И
Я

В монографіи обобщен научный материал, посвященный механизмам криоповреждений и криозащиты биологических объектов, физико-химическим процессам, протекающим в закристаллизованной матрице и молекулярных структурах клеток при охлаждении, замораживании и отогреве. Значительное место уделено низкотемпературной модификации мембранных структур клеток, способам их охлаждения и технологии криоконсервации. Освещены проблемы консервации тканей и органов, основы сублимационного хранения биоматериалов, механизмы естественного и искусственного гипо- и анабиоза. Медицинские аспекты действия холода посвящены проблемам патохимии и патофизиологии гипотермии и локальному криовоздействию на ткани и органы, созданию криоаппаратуры и различных устройств для использования в криохирургии и криотерапии. Затронуты проблемы морозостойкости растений, охраны ресурсов флоры и фауны, консервации репродуктивных клеток.

Для научных работников, аспирантов, студентов и других исследователей, работающих в области криобиологии и криомедицины.

У монографіі узагальнено науковий матеріал, що охоплює механізми криоушкоджень і криозахисту біологічних об'єктів, фізико-хімічні процеси, що відбуваються в закристалізованій матриці і молекулярних структурах клітин при охолодженні, заморожуванні і відігріванні. Значне місце відведено низькотемпературній модифікації мембранних структур клітин, методам їх охолодження і технології криоконсервування. висвітлено також проблеми консервування тканин і органів, основи сублімаційного збереження біоматеріалів, механізми штучного та природного гіпо- і анабіозу. Медичні аспекти дії холоду охоплюють проблеми патохімії та патофізіології гіпотермії і локальну криодію на тканини та органи, створення криоапаратури та різних пристроїв для використання в криохірургії і криотерапії. Проаналізовано проблеми морозостійкості рослин, охорони ресурсів флори і фауни, консервування репродуктивних клітин.

Для науковців, аспірантів, студентів та інших дослідників у галузі криобіології і криомедицини.

Ответственный редактор Ю. В. Калугин

Утверждено к печати ученым советом

Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Редакция химической литературы

Редактор И. И. Никитина

Б 1803010000-016 221-94

ISBN 5-12-004195-7

© А. М. Белоус, В. И. Грищенко, 1994

ПРЕДИСЛОВИЕ

На протяжении последних десятилетий сравнительно молодая отрасль общей биологии — криобиология — получила значительный импульс в своем развитии в связи с созданием в 1972 г. харьковского Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины, основной задачей которого явилось развитие и углубление исследований в области теории и практики данной дисциплины. Начиная с этого периода в нашей стране был осуществлен значительный объем фундаментальных исследований, посвященных изучению механизмов криоповреждений, криозащиты и репарации биологических объектов различного уровня организации, разработаны и созданы новые методы криоконсервации клеток, тканей и других биоматериалов, внедрены в практику современные виды аппаратов и устройств медицинского и биологического назначения.

Фундаментальные и прикладные исследования, проводимые в зарубежных криобиологических центрах США, Англии, Японии, позволили уже к 1960—1961 гг. О. Смит (Англия) и Л. Рэ (Франция) суммировать результаты работ по криобиологии в монографиях «Биологическое действие замораживания и переохлаждения» и «Консервация жизни холодом», которые были переведены на русский язык в 1962—1963 гг. Эти работы способствовали развитию теоретических исследований и практических разработок в области криобиологии и криомедицины. Среди изданий по криобиологии наибольшую популярность в нашей стране приобрела монография Г. Мерингена «Криобиология» (1966), впервые затронувшая вопросы, касающиеся основных разделов этой отрасли науки. В этом издании впервые было показано существенное значение биофизических, биохимических, морфологических, инженерных и других отраслей медицины в развитии теоретических и практических основ криобиологии. В нашей стране первый фундаментальный труд по криобиологии Л. К. Лозинна-Лозинского был опубликован в 1972 г., а в 1975 г. была сделана первая попытка обобщения накопленных данных по криобиологии и криомедицине в работе А. М. Белоуса и Н. С. Пушкаря «Введение в криобиологию». В этих книгах нашли отображение теоретические и практические достижения криобиологии в период 60—70-х гг.

В последнее время накопился фактический материал по теории и практике отечественной криобиологии и криомедицины. Криобиохимические исследования, посвященные выяснению механизмов криоповреждений и криозащите биологических систем различного уровня организации, позволили установить общие закономерности разрушения клеток и внутриклеточных органелл в широкой температурной зоне, этапы развития и эволюции термального шока клеток, роль в этих процессах липидов и белков цитоскелета, а также барьерных свойств мембран. Развитию теоретической криобиологии способствовали биофизические и физико-химические исследования процессов, протекающих в биологических объектах в зоне отрицательных температур, что позволило описать характеристики фазовых

переходов биополимеров, выяснить механизмы взаимодействия криопротекторов с мембранными структурами клеток и т. д. Параллельные исследования в области криоморфологии и криоиммунологии по изучению действия охлаждения и криопротекторов на структуру клеток, тканей и органов определили направленность в разработке методов низкотемпературной консервации биообъектов. Успешная реализация технологий криоконсервации клеток и тканей во многом связана с проблемой криопротекторов и криоконсервантов. Сейчас изучены особенности взаимодействия ряда традиционных защитных веществ с клетками и тканями, созданы новые виды криопротекторов, изучена их токсико-фармакология. Существенный успех достигнут в области теории и практики криоконсервированных репродуктивных клеток животных и человека, их медицинском и биологическом использовании в различных отраслях народного хозяйства.

В области криомедицины созданы новые и совершенствуются существующие методы охлаждения и замораживания с целью повышения эффективности лечения больных. Получены новые патофизиологические данные о влиянии локальных криовоздействий на ткани, закономерности молекулярно-клеточной модификации структур мембран и рецепторов нейронов при охлаждении мозга, разработаны соответствующие низкотемпературные аппаратура и устройства.

Проводимые криобиологические и криомедицинские исследования позволили за 15—20 прошедших лет накопить значительный фактический материал по криобиологии, который на данном этапе нуждается в обобщении и анализе с целью использования для научных и педагогических целей. Это тем более целесообразно, поскольку наряду с расширением научно-практических задач криобиологии и криомедицины существует острая необходимость подготовки кадров — криобиологов, научных работников, аспирантов, студентов, которые начинают входить в проблематику этой сферы науки. В связи с этим данную монографию следует прежде всего рассматривать как научное руководство по криобиологии и криомедицине для начинающих молодых специалистов. Авторы надеются, что изложенные материалы помогут получить первые сведения об основных разделах современной криобиологии, касающиеся механизмов крионовреждений и криозащиты различных биологических объектов, физико-химических феноменов и особенностей действия криопротекторов, технологических процессов замораживания и отогрева различных клеточных суспензий и тканей, феноменологических явлений, связанных с искусственной и естественной гибернацией и лонкилотермией, и т. д.

Поскольку рассматриваемые в монографии проблемы имеют много общего, это не дает возможности избежать некоторых повторений, особенно в трактовках механизмов крионовреждений различных объектов, где действуют одни и те же закономерности, связанные с модификацией воды, липидов и белков мембран, белков цитоскелета и функции ионных насосов, ультраструктурных и иммунологических изменений рецепторов и внутриклеточных систем. Возрастающий поток информации по проблемам криобиологии и криомедицины дает основание полагать, что изложенные в данном научно-практическом руководстве результаты в недалеком будущем должны быть подвергнуты переоценке и новому анализу с целью подтверждения или критики высказанных здесь гипотез и нерешенных проблем.

Хотя авторы понимают всю сложность поставленных ими вопросов, они надеются, что данная монография явится толчком для дальнейшего прогресса научно-практических разработок в области криобиологии и медицины, и будут весьма признательны за критические замечания и пожелания.

Глава I

ИСТОРИЯ И ЗАДАЧИ КРИБИОЛОГИИ

Температура в наибольшей степени тормозит скорость и влияет на характер течения обменных процессов в живых системах. Поскольку обмен веществ, составляющий основу жизни, протекает при участии водорастворимых ферментов, то температура, модифицирующая состояние жидкой воды, влияет на интенсивность ферментативных реакций.

Математическое выражение скорости химических процессов в зависимости от изменения температуры, предложенное Я. Г. Ван-Гоффом в 1887 г., постулирует, что все химические реакции при повышении температуры на 10°C ускоряются в 2—3 раза. Эта зависимость между скоростью течения химических реакций и температурой в большей или меньшей мере обнаруживается во многих жизненных процессах.

Один из крупных исследователей анабиоза П. Беккерель, рассчитывая скорость процесса обмена веществ в спорах и семенах при различных температурах, установил, что при -100°C обмен протекает в $85 \cdot 10^3$ раз медленнее, чем при 20°C , при -200°C — в $815 \cdot 10^4$ раз, а при -271°C — в $71809 \cdot 10^9$ раз. При температуре -270°C практически прекращались потребление кислорода и обменные процессы в клетках.

Беккерель подвергал семена табака, клевера, лютика, льнянки и других растений воздействию низких температур и высушиванию при 40°C в запаянных трубках в сильно разреженной атмосфере, после чего держал их в этих условиях 4 мес, а затем охлаждал до температуры жидкого гелия (-269°C). При проращивании эти семена входили аналогично контрольным. Опыты, в которых семена различной природы подвергались высушиванию, охлаждению либо действию обоих этих факторов, показали, что в выживаемости клеток играет важную роль вода, которая определяет все особенности процессов жизнедеятельности и интенсивности обмена веществ. Низкое содержание воды в семенах, очевидно, явилось решающим условием для сохранения жизнеспособности при очень низких температурах.

Следует отметить, что эффекты низких температур по отношению к биообъектам наблюдали в глубокой древности. Еще Овидий Назон, а также Плиний во II—III вв. до н. э. описали поведе-

ные рыб, замерзших во льду, часть из которых после нагрева оказалась живой. Афинни в своей книге «Пир мудрых» также сообщает о замороженных во льду рыбах, которые затем оживали в северных морях. Об этом же сообщал Фабриций (1780) в «Фауне Гренландии», наблюдавший зимовку на дне ручьев совершенно замерзшей, но весной вернувшейся к нормальной жизнедеятельности форели.

В 1701 г. А. Левенгук установил, что если сухой перезимовавший песок увлажнить, то в нем через час в изобилии появятся движущиеся коловратки. Подобного рода эксперименты с перезимовавшими живыми существами в том же веке проводил ряд ученых, в том числе и Л. Спалланцани (1787), который провел параллель между оживленным высушенных коловраток и замерзших до полной хрупкости лягушек, саламандр, насекомых, полагая, что эти явления тесно связаны между собой. Его опыты приобрели научный интерес благодаря более совершенному техническому оснащению, в частности использованию термометров, изобретенных Фаренгейтом (1714) и Реомюром (1734), который первый применил свое изобретение при изучении влияния охлаждения на насекомых. Было выявлено, что насекомые могут погибать при температуре чуть выше, либо ниже нуля, в то время как куколки бабочек переносят замораживание до -28°C .

Л. Спалланцани изучал действие низкотемпературного высушивания на коловраток при естественном (-7°C) и искусственном ($-19...-21$ и -28°C) замораживании в смеси льда, каменной соли и азотной кислоты. Во всех случаях замораживания коловратки теряли признаки жизни, однако после подогрева песка или воды до обычной температуры они оживали. В его монографии «Исследования по живой и растительной физике» подчеркивается, что имеется тесная зависимость между действием высушивания — охлаждения и жизнеспособностью, что неоднократно акцентировалось в работах современных криобиологов, которые обращали внимание на роль дегидратации в сохранении жизнеспособности биообъектов после перевода их в анабиотическое состояние. Эти опыты показали, что предотвратить криповреждения в биообъектах без предварительного удаления части свободной воды из них практически невозможно.

Изучение действия холода на рыб, амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих привело Л. Спалланцани к выводу, что при охлаждении земноводных нарушается в основном кровообращение в мелких сосудах, которое при дальнейшем понижении температуры тела полностью прекращается и в крупных сосудах, вызывая смерть животных. Л. Спалланцани также выявил, что спермии значительно лучше переносят сильное охлаждение, чем животные, от которых они были получены.

По настоящее время не прекращаются попытки раскрыть сущность анабиоза, поскольку затрагивают общепарафизиологические и физиологические аспекты естествознания, связанные как с возможностью управления жизненными функциями, так и с попыткой ре-

шить проблемы возникновения жизни на Земле и, возможно, во Вселенной. В начале XIX в. было замечено, что некоторые виды организмов после замораживания могут погибать либо выдерживать охлаждение и после отогрева оживать.

Французский исследователь Ф. Пуизэ (1866) одним из первых начал проверку этих наблюдений в эксперименте, пытаясь выяснить причины гибели живых существ при замораживании в лабораторных условиях. Для этого он охлаждал жаб, моллюсков, инфузорий и рыб, непосредственно погружая в охлажденную до температуры ниже -10°C смесь из льда и соли, и пришел к выводу, что в данных условиях эритроциты крови быстро разрушаются в сосудах, что приводит животных к гибели.

Спустя 20 лет немецкий исследователь Ф. Редель, желая выяснить минимальную низкую температуру, которую переносят животные, установил, что беспозвоночные, имеющие кровеносную систему, не оживают после полного промораживания, т. е. появления кристаллов льда в жидкостях тела.

На рубеже XX в. немецкий физиолог Р. Кокс охлаждал живые существа и пришел к выводу, что холоднокровные животные оживают после охлаждения в том случае, если в организме содержится незакристаллизовавшаяся жидкая часть. Швейцарский физик М. Пиктэ, известный в то время своими работами по сжижению газов, начал исследования по охлаждению животных и рыб после того, как установил, что при -30°C все химические реакции тормозятся. В частности, он установил, что весьма устойчивы к глубокому холоду бактерии, которые даже после охлаждения до -200°C остаются жизнеспособными, а из икринок лягушки, медленно охлажденных до -60°C , после оттаивания могут развиться головастики. Лягушки не погибли при охлаждении лишь до -28°C , а рыбы после выдерживания их при 0°C в течение нескольких суток легко перенесли замораживание до -8 — -15°C . Опыты на теплокровных животных (собаки, морские свинки) показали, что они не выдерживают охлаждения даже в области положительных температур. М. Пиктэ пришел к выводу, что чем ниже организованы живые существа, тем ниже температуры без вреда для себя они переносят. Сохранность бактерий в зоне отрицательных температур (-80°C), при которых тормозятся в организме почти все химические реакции, привела его к убеждению, что «...жизнь — такое же проявление законов природы, как взаимное притяжение тел и сила тяжести: она всегда существует, никогда не погибает и требует своего проявления лишь предсуществующей организацией». Именно сохранение предшествовавшей замораживанию структуры, по мнению автора, способствует сохранности бактерии даже после хранения при -200°C . Однако в тот период опыты проводились с определенной долей погрешности, поскольку средства измерения температуры были весьма несовершенны. Отсюда, например, была необоснованность вывода М. Пиктэ по оживлению замороженных рыб, о полном промораживании которых он судил по наличию льда, в котором они находились.

Действительно, в подобных случаях, когда авторы наблюдали оживление замерзших рыб, речь идет о поверхностном промерзании кожи рыб, и они после оттаивания восстанавливали свою жизнедеятельность благодаря тому, что находились во льду фактически в переохлажденном состоянии. Такое переохлажденное состояние клеток, при котором кристаллы льда не образуются, возможно в результате появления в цитоплазме защитных растворенных веществ, а в плазме крови — биологических антифризов, температура кристаллизации которых ниже 0°C .

Еще Л. Спалланцани (1787) считал, что бабочки шелкопряда червя погибают в результате полного промерзания, в то время как их яйца, охлажденные до -17°C , выживают, так как содержимое яиц остается в жидком состоянии благодаря наличию в них маслянистого вещества. К. Мюллер-Тургау в 1886 г. показал, что в переохлажденном состоянии ткани без вреда выносят такую степень охлаждения, которая смертельна в случае замораживания. Позднее, в 1902 г., к аналогичному выводу пришел Ф. Кодис, отметив, что животные, их отдельные органы и ткани могут выживать при температурах ниже 0° лишь в состоянии переохлаждения. Одновременно с ним Д. Арсонваль пришел к выводу, что микроорганизмы, помещенные на целую неделю в жидкий воздух, сохраняли жизнеспособность после оттаивания, поскольку, как он считал, находились в переохлажденном состоянии.

К. П. Кржишковский и Г. Н. Павлов (1924—1927), замораживая сперму таракана до -23°C , в течение 5 и 14 мин наблюдали сохранение движений большого числа спермиев после оттаивания клеток. Спермии человека, замороженные до -23°C , после оттаивания также восстанавливали свою активность.

П. Гельхорн (1924) после смешивания икры лягушки с замороженной при температуре -13°C и оттаянной через 15 мин спермой лягушки получил 93 % оплодотворенных икринок. Можно думать, что такой высокий результат оплодотворения объясняется тем, что в данном опыте как сперма, так и икринки находились в переохлажденном состоянии, чему способствует содержание в жидкой фазе клеток растворимых и взвешенных частиц в виде солей, аминокислот, белков и других компонентов. Однако дальнейшее охлаждение переохлажденной среды до критически низкой температуры приводит к кристаллизации, при которой вода вымерзает в виде льда, что сопровождается гиперконцентрированием в его канальцах солевых растворов, время существования которых находится в обратной зависимости от скорости охлаждения. Обычно в естественных и искусственных условиях охлаждения живых систем переход жидкости клеток и тканей в лед приводит к их гибели в тех случаях, если до этого в биообъектах не произошли необходимые изменения, способствующие переходу в состояние холодого анабиоза.

Процесс вымораживания воды в живых существах изучался русским физиком и энтомологом П. И. Бахметьевым (1912), который обратил внимание на то, что в опытах по охлаждению живых

систем отсутствуют точные данные об измерении температуры тела животных. Это натолкнуло его на мысль исследовать температуру тела насекомых при изменении температурных условий их существования. Для этого он предложил способ прямого измерения температуры тела экспериментальных животных с помощью термоэлектрического термометра и систему математической обработки экспериментальных данных, что позволяло определить удельную теплоту тела и скрытую теплоту таяния замерзшей в нем жидкости. Поэтому именно исследования П. И. Бахметьева благодаря более совершенному подходу к изучаемой проблеме позволили расширить сведения об обратимой остановке жизнедеятельности организма, наступающей под воздействием низких температур, и положить начало изучению практически не известных до этого закономерностей полного, но обратимого прекращения жизнедеятельности.

При помощи калориметрических исследований П. И. Бахметьевым изучался процесс вымораживания воды из тела насекомых, который выражался в виде характерной температурной кривой. Открыто явление физического переохлаждения тканевых жидкостей и впервые указано на возможность приостановления активного состояния живой материи с помощью низких температур в нужный момент. П. И. Бахметьев отметил, что в процессе кристаллизации, развивающемся в теле насекомого, растущие кристаллы льда поглощают воду из окружающих, не охваченных процессом кристаллизации тканей, т. е. этот процесс сопровождается обезвоживанием тканей. При этом происходит интенсивное их высыхание, в результате чего коллоиды претерпевают изменения различной степени и при оттаивании насекомые погибают. Эти исследования выделили два важных процесса: кристаллизацию тканей и их дегидратацию, которые позднее стали краеугольными камнями теории криоповреждения и криозащиты.

Работы П. И. Бахметьева имели большое значение для последующего развития учения о холододовом анабиозе. В частности, труды Н. И. Калабухова (1934, 1958) показали, что большинство организмов могут оживать после их пребывания в состоянии переохлаждения. При этом степень выживаемости организма зависит от количества образовавшегося льда: чем его больше в теле, тем меньше шансов на выживаемость. Н. И. Калабухов выяснил, что на степень переохлаждения и на скорость образования льда в клетках влияет содержание свободной и связанной воды, сахаров, белков, солей и других растворимых компонентов цитоплазмы.

Как известно, увеличение степени переохлаждения клетки и окружающей среды связано с концентрацией и природой растворенных веществ с низкой эвтектической точкой.

Д. Б. Лейн (1925) показал, что содержание в растворах эвтектической концентрации глицерина (66,7 %) с очень низкой эвтектической точкой ($-46,5^{\circ}\text{C}$) значительно перемещает зоны эвтектики этих растворов в сторону отрицательных температур. Поскольку глицерин хорошо проникает в клетки, он препятствует

кристаллообразованию в них. При снижении температуры ниже указанных величин развиваются процессы кристаллизации и в конечном счете жидкая фаза переходит в твердое состояние. По мере уменьшения температуры биологического объекта падает и уровень обменных процессов, причем наиболее интенсивно при вымерзании воды, когда нарастает обезвоживание живой системы. В зависимости от условий, в которых протекало ее охлаждение, биологические объекты либо погибают, причем еще до начала развития в них процесса кристаллизации и во время его, либо переходят в анабиотическое состояние с последующим длительным пребыванием в условиях низких температур. По завершении процесса кристаллизации фракций воды, происходящего при температурах ниже -150°C , как показали И. В. Смирнов (1960), Г. Меримен, Л. Рэ (1962) и другие исследователи, существуют условия для неограниченного длительного сохранения свойств живых систем.

А. Бюфон и Д. Гамель (1737) одними из первых установили, что причиной гибели клетки при замораживании является кристаллизация льда, приводящая к разрыву клетки. Однако позже авторы пришли к выводу, что повреждение живых систем при их замораживании обусловлено химическими и физико-химическими изменениями, сопровождающими процесс кристаллизации.

К. Мюллер-Тургау (1886) установил, что лед в растениях вначале образуется в межклетниках, что приводит к обезвоживанию клетки, завершающимся в первый период замораживания. Причиной гибели клеток при первичном образовании льда, по его мнению, являлись физические процессы, когда происходило «как бы внезапное разрушение протоплазмы» под влиянием массового формирования кристаллов льда. Если ткани при первичном кристаллообразовании не повреждались, то при дальнейшем их охлаждении развивались химические процессы, связанные с повышением концентрации клеточного сока. Автор, наблюдая замораживание растений под микроскопом, обнаружил, что в больших растительных тканях лед образуется почти исключительно в межклетниках, а в микроскопических срезах — внутри клеток, если скорость замораживания была более быстрой, чем в первом случае.

Практически в то же время Х. Молиш (1897) в опытах по замораживанию получил результаты, аналогичные данным К. Мюллер-Тургау, т. е. подтвердил эксперименты, положившие начало теории обезвоживания. Х. Горк (1907) считал, что в процессе замораживания растений происходит частичная дегидратация; это ведет к повышению концентрации клеточного сока, при котором соли могут денатурировать белки. В подтверждение этой возможности он привел результаты сравнительных исследований *in vitro* по высаливанию сока вымерзших и живых растений. Оказалось, что в вымерзших растениях содержание белка было ниже, чем в непромороженных, что объясняли денатурированием белка в процессе вымерзания.

Н. И. Максимов (1908, 1913) развил теорию замораживания. Согласно его данным, протоплазма клеток замораживаемого растения испытывает давление со стороны растущих в межклеточных или между протоплазмой и оболочкой клеток ледяных кристаллов. Наряду с механическим воздействием происходит криповреждение клеток в силу обезвоживающего влияния низких температур. В результате роста кристаллов льда в межклеточных пространствах происходит сближение и соединение коллоидальных частиц протоплазмы. Очевидно, образующийся при замораживании растительный лед оказывает водоотнимающее и механически коагулирующее действие на коллоидальные вещества протоплазмы. Н. И. Максимов пришел к выводу, что наиболее чувствительным к понижению температуры является поверхностный слой протоплазмы, при повреждении которого нарушаются осмотические свойства клетки. Температура замерзания живых систем растительного и животного происхождения является величиной постоянной и зависит главным образом от условий замораживания и температуры окружающей среды. Непостоянство точки замерзания клеток объясняется тем, что она представляет собой результат подвижного равновесия между скоростью охлаждения объекта, регулируемой внешней температурой, и скоростью образования льда, определяемой скоростью прохождения воды через протоплазматическую мембрану.

По мнению Н. И. Максимова, степень отмирания подвергнутых замораживанию клеток определяется не столько достиганием минимальной температуры, сколько количеством образовавшегося в их тканях льда, который способствует обезвоживанию клеток и оказывает механически коагулирующее действие на их протоплазму.

Положения, выдвинутые этим ученым в отношении значения обезвоживания живых систем из-за превращения воды в лед, способствующего увеличению концентрации электролитов, осмотического давления, сдвигу рН, явились основой современных представлений о механизме повреждения клеток при замораживании — оттаивании.

Большой вклад в изучение процессов кристаллизации при глубоком охлаждении биообъектов внес Б. Люйе (1940—1960), который детально исследовал микроструктуру кристаллов льда, образующихся при различных условиях замораживания чистой воды и растворов NaCl, глюкозы, глицерина, яичного альбумина и желатины. В зависимости от концентрации растворов, способа приготовления, скорости охлаждения форма кристаллов сильно варьировала. Автор выявил, что характер и степень повреждения биологического материала зависит от формы кристаллов льда, в частности, от наличия в них острых и напряженных граней.

Б. Люйе и П. Гехенно высказали мнение, что расширение, создающееся при кристаллизации льда, приводит к разрушению тонкой структуры протоплазмы клеток, а летальные повреждения биообъектов при замораживании связаны с денатурационными из-

менениями макромолекул каталитических белков. На основании исследований Б. Люйе была создана теория о летальном воздействии кристаллов льда, возникающем в процессе замораживания клеток, и отмечена возможность предотвращения летальных повреждений путем ультрабыстрого замораживания и отогрева клеток, в ходе которых происходят стеклование жидкой воды и ее девитрификация, способствующие сохранению свойств клеток после криовоздействия.

В этот период Б. Люйе и его сотрудниками было показано, что в процессах кристаллизации чрезвычайно большую роль играют физико-химическая природа и уровень концентрации веществ, находящихся в замороженном растворе. Растворенные вещества оказывают тормозящее влияние на образование и рост кристаллов льда, что обусловлено связыванием воды вследствие гидратации молекул растворенного вещества, адсорбцией осажденного вещества на поверхности растущих кристаллов, затруднением диффузии воды из жидкой фазы к центрам растущих кристаллов из-за присутствия в среде молекул растворенного вещества. При этом выяснилось, что степень замедления кристаллизации в клетке зависит от концентрации растворенных веществ в цитоплазме. Еще Н. Калло в 1925 г. показал, что в 1%-м растворе желатина рост кристаллов льда по сравнению с чистой водой снижается в 2 раза, а в 3%-м растворе — в 350 раз. Т. Моран (1926) нашел, что в концентрированных 65,5%-х желатиновых гелях лед, по-видимому, вообще не образуется, поскольку они остаются прозрачными даже при погружении в жидкий азот. Указанные выше добавки влияют на количество, величину и форму кристаллов.

Решающим фактором, определяющим повреждение живых систем в условиях глубокого холода, являются химические и физико-химические изменения, происходящие внутри и вне клетки. Степень их проявления зависит от скорости и интенсивности вымораживания воды в процессе кристаллизации. В начале 50-х г. Дж. Лавлоком была создана одна из первых научно обоснованных теорий криоповреждений. На основании опытов по замораживанию эритроцитов он пришел к выводу, что ведущей причиной их гемолиза является повреждение мембраны, образованной из липопротеидных комплексов. Криоразрушение мембраны и гемолиз клеток происходят в результате увеличения концентрации солей, что приводит к повышению в среде ионной силы, дестабилизирующей компоненты клеточной мембраны, вследствие чего происходит выход из ее состава фосфолипидов и холестерина. Потеря фосфолипидов делает мембрану проницаемой для катионов, что обуславливает ее коллоидно-осмотическое набухание и в конечном счете разрыв. Дж. Лавлок показал, что лед образуется не в виде монолита, а состоит из отдельных кристаллов, образующих каналы, в промежутках которых находится концентрированный солевой раствор. При понижении температуры с усилением роста кристаллов уменьшается просвет между ними и повышается концентрация раствора. На существование бесконечной сети таких каналов

между кристаллами льда указал Словитер (1951—1952), наблюдавший при замораживании до -26°C эритроцитов в 0,25%-м растворе NaCl и 15%-й концентрации глицерина образование равномерно окрашенной в красный цвет жидкости, в которой через неделю формировался темно-красный осадок клеток, что являлось результатом их перемещения и сдавливания в каналах.

Закономерности, установленные позже Дж. Лавлоком (1953—1955) при замораживании эритроцитов, в основных чертах справедливы и в случае замораживания других клеток, поскольку свойство мембран этих клеток в основном определяется входящими в их состав липопротендными комплексами. В то же время имеются и исключения из этого правила, поскольку мембраны клеток по-разному чувствительны к замораживанию.

В период времени, охватывающий 1900—1940 гг., появились наблюдения, свидетельствующие, что наряду с гибелью клеток в результате развития в них процесса кристаллизации они могут повреждаться в зоне температур до фазового перехода воды в лед, т. е. вблизи 0°C .

Летальность быстрого снижения температуры до 0°C отмечалась при охлаждении спермий, клеток низших и особенно высших растений (А. Грилли, 1901, 1917; Ф. Кидд, 1929; И. Модлевская, 1951). В то же время медленное снижение температуры до 0°C оказалось безвредным для указанных выше клеток. В. К. Милованов (1932), впервые обнаруживший гибель спермиев при резком их охлаждении до температуры $3-5^{\circ}\text{C}$, назвал это явление температурным шоком, под которым он подразумевал разрушение клетки вследствие ее резкого и быстрого охлаждения до 0°C . При этом В. К. Милованов и С. А. Соколовская установили, что лецитин куриного яичного желтка, добавленный к спермиям, предупреждает развитие температурного шока при условии их медленного охлаждения. Это явилось основанием для включения в состав криоконсерванта липидных компонентов, желтка куриного яйца, вытяжек из семяшников, желтых тел яичников, мозга или соевых бобов, под защитой которого осуществляли медленное охлаждение клеток до 0°C .

Аналогичные данные получены И. А. Кузнецовой (1932) во время искусственного осеменения овец в Узбекистане, когда она обнаружила гибель спермиев при их быстром охлаждении до 0°C . В дальнейшем оказалось, что механизм температурного шока клеток достаточно сложный и затрагивает модификацию как липидных компонентов, так и белков цитоскелета (А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, 1991 г.).

Б. Люйе и П. Гехенно в 1940 г. пришли к выводу, что внезапное охлаждение клеток приводит к желатинизации белков протоплазмы, после чего следует медленное сжатие геля и спонтанное выделение жидкости, сопровождающееся гибелью клетки. М. Московитц, М. Кельвин (1952), а также Дж. Лавлок (1955), изучая температурный шок эритроцитов, обнаружили, что резкое снижение температуры изменяет расположение липидных компонентов,

соединяющих волокна липопротенда эленина в мембране, что приводит к изменению клеточной проницаемости и других свойств эритроцитов.

По мнению В. К. Милованова и И. И. Соколовой (1959), механизм температурного шока связан с неблагоприятными физическими свойствами плазмолгена спермиев, состоящего из тугоплавких альдегидов высокомолекулярных жирных кислот, которые быстро переходят в состояние геля при 0°C и не могут служить субстратом эндогенного дыхания спермиев. В результате этого блокируется не только аэробное дыхание спермиев, но и в значительной мере процесс гликолиза. Ф. И. Осташко (1961) пришел к выводу, что температурный шок относится к явлению общепологического порядка, так как ему подвержено большинство клеток животного и растительного происхождения. Причиной температурного шока автор считал внезапное возникновение концентрированного осмотического градиента на границе поверхности клетки с окружающей средой, для уравнивания которого необходима затрата осмотической работы. Возникновение такого градиента вызывает внезапное перемещение воды из окружающей среды внутрь клетки, клеточная мембрана теряет свойства избирательной проницаемости и разрушается. В результате этого в клетку проникают Ca^{2+} и Na^{+} , а из клетки выходят K^{+} , H^{+} . С позиций этих взглядов автор объясняет то, что температурный шок клеток при их витрификации не возникает, так как за очень малый промежуток времени от начала охлаждения до наступления витрификации при сверхбыстром охлаждении спермы (5000°C) молекулы воды не успевают пройти расстояние, равное толщине мембраны, и, следовательно, не способны разрушить ее.

Дальнейшее углубление представлений о температурном шоке клеток нашло отражение в работах А. М. Белоуса и В. А. Бондаренко (1980—1990), показавших роль фазовых переходов липидов и белков цитоскелета в механизме его развития и предупреждения. Установлено, что первичным температурно-зависимым процессом, развивающимся в мембране клеток при быстром их охлаждении до 0°C , являются фазовые переходы аннулярных липидов, утечка K^{+} и нарушение функции белков цитоскелета, что следует рассматривать как начальные этапы механизма температурного шока. В связи с этим клетки и субклеточные структуры авторы условно разделяют на следующие группы: во-первых, некоторые микроорганизмы (*E. Coli*) и синаптосомы мозга, в мембранах которых отсутствует холестерин и температурные фазовые переходы липидов в мембранах начинаются значительно выше 0°C ; во-вторых, мембраны митохондрий и лизосом, а также клетки, мембраны которых содержат мало холестерина (5—15%). Для них характерно развитие фазовых переходов липидов в диапазоне $4-0^{\circ}\text{C}$; в-третьих, лимфоидные клетки и эритроциты, мембраны которых обогащены холестерином и для которых характерны фазовые переходы в липидах в зоне отрицательных температур. Отсутствие холестерина и наличие фазовых переходов ли-

пидов при пониженных температурах обуславливает высокую чувствительность клеток и внутриклеточных органелл к охлаждению в зоне низких положительных температур. Исследования динамики температурного шока показали, что в основе этого процесса лежит возникновение и формирование трансмембранных дефектов, которые обеспечивают утечку ионов и метаболитов клетки наружу.

Дальнейшее развитие фундаментальных исследований в области механизмов криповреждений клеток было инициировано работами П. Мейзура (1963—1969), который показал, что для проявления липотронного эффекта гиперконцентрированного солевого раствора необходимо слишком долгое экспонирование в нем клеток. В этой связи в период 1963—1972 гг. П. Мейзуром была сформулирована и экспериментально обоснована так называемая 2-факторная гипотеза криповреждения, согласно которой на выживаемость клеток в суспензии в процессе ее кристаллизации оказывают влияние два типа процессов и связанных с ними повреждающих факторов. К первому из них относится чрезмерное обезвоживание клеток, следствием которого является повышение концентрации в клетке осмотически активных веществ, приводящее к высаливанию и необратимой денатурации растворенных белков, разрушение гиперсолевыми растворами структур цитоплазматической мембраны, а также ее повреждение вследствие достижения клеткой минимального объема. Ко второму типу процессов П. Мейзур относит повреждение внутриклеточного содержимого вследствие развития внутриклеточной кристаллизации.

Параллельно с этими исследованиями в цикле работ Г. Меримен (1969—1974) обнаружил, что клетки повреждаются не только солевыми, но и несолевыми растворами при повышении осмолярности до определенной критической величины, и пришел к выводу о том, что концентрирование внутриклеточной соли в процессе обезвоживания клеток не может иметь решающего значения при повреждении клеток, которое является прежде всего следствием уменьшения их объема в процессе вымораживания воды до критического значения. В связи с этим Г. Меримен выдвинул так называемую гипотезу минимального объема клетки при замораживании, которая позволила уточнить некоторые из возможных механизмов устойчивости клеток к замораживанию.

История криобиологии выявляет существование определенной периодизации развития этой области естествознания. Если для начального периода и до начала 50-х годов нашего столетия характерно эмпирическое трактование роли низкотемпературных факторов в повреждении клеток и их защите, то последующее десятилетие характеризуется попытками разработать способы криоконсервации большинства видов клеток и тканей животных и человека на основе научно обоснованных данных.

В последнее время значительно изменился взгляд на повреждающее действие процесса внутриклеточной кристаллизации. В частности, О. Смит и Дж. Смайлс (1953) выявили, что защитные свойства глицерина объясняются способностью его витрифи-

цировать жидкое содержимое клеток и переохлаждать протоплазму, а также влиять на процесс кристаллизации до такой степени, при которой невозможно образование больших кристаллов льда. Было выявлено, что внутриклеточная кристаллизация не происходит при охлаждении клеток даже до -60°C в средах, содержащих глицерин.

Согласно современным представлениям, повреждение клеток сильно зависит от количества и формы образующихся в них кристаллов льда. Вероятность же кристаллизации тесно связана с интенсивностью и степенью обезвоживания клетки. Учитывая это, П. Мейзур пришел к заключению, что для каждого типа клеток существует оптимальная, обеспечивающая максимальную сохранность биоструктур скорость охлаждения, которая настолько мала, что внутриклеточная кристаллизация не успевает развиться, однако она достаточна, чтобы свести к минимуму период экспозиции клеток в гиперконцентрированном солевом растворе, образующемся при вымораживании воды в виде чистого льда. Автор осуществил количественное описание процессов обезвоживания клетки, а также определил условия, при которых понижается интенсивность процесса внутриклеточного кристаллообразования. Работы П. Мейзура имели большое теоретическое и практическое значение для разработки эффективных способов криоконсервации клеточных суспензий.

Как известно, оптимальное обезвоживание клеток регулируется скоростью охлаждения и криопротекторами. В случае быстрого охлаждения клеток со скоростью $10\,000\text{--}100\,000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ возникает явление витрификации, при котором лед в цитоплазме и вне ее переходит в стекловидное, витрифицированное состояние, т. е. в этом случае осуществить дегидратацию клетки невозможно. Поскольку большие скорости замораживания в реальной криобиологической практике недостижимы, то замороженные растворы всегда имеют ту или иную незавершенную кристаллическую структуру, которая не способна вырасти до размеров крупных кристаллов. Однако при отогреве такие незавершенные кристаллы, находящиеся в более неустойчивом состоянии с высокой поверхностной энергией, стремятся к приобретению более устойчивой формы. В связи с этим при температурах порядка $-165\text{--}-150^{\circ}\text{C}$ происходит слияние маленьких кристаллов в единый блок кубической формы, который при последующем повышении температуры до -130°C превращается в обычный гексагональный лед. Этот процесс наращивания кристалла был назван процессом рекристаллизации, который на этапах отогрева замороженного образца может оказывать повреждающее действие на биологические структуры. Л. Рэ (1962) называет это явление миграционной рекристаллизацией.

В настоящее время развитие новых технических подходов, разработанных В. И. Грищенко, В. Ф. Тарасовым, позволяет проводить замораживание репродуктивных клеток животных с очень высокими скоростями и получить витрифицированное состояние системы с высоким выходом жизнеспособных клеток на фоне низ-

кого содержания криопротектора в среде замораживания. Результаты, полученные сотрудниками Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины при замораживании биообъектов с использованием принципа витрификации, хорошо согласуются с положениями, изложенными в ранних работах Б. Люйе (1940) и И. В. Смирнова (1948). Как известно, Б. Люйе изучал процессы кристаллизации при замораживании биологических объектов с целью найти зависимость между структурой льда и их выживаемостью, а И. В. Смирнов впервые получил потомство от крольчих, осемененных спермой, охлажденной до -196°C в очень малых объемах (0,02—0,05 мл) после хранения в этих условиях 6 мес. Вследствие высокой скорости охлаждения таких малых объемов спермы, достигавшей $5000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, процесс кристаллизации не успевал развиваться, а криоконсервация протекала в условиях витрификации жидкой части замораживаемых образцов. Именно этим, ссылаясь на работы Б. Люйе и Э. Я. Граевского, И. В. Смирнов объяснил причину своих успехов. Открытая И. В. Смирновым возможность сохранять клетки при температуре -196°C способствовала развитию криобиологии, хотя вначале не нашла широкого практического применения. Лишь в последнее время удалось на основе разработки специального криоконсерванта и способа охлаждения реализовать эффект витрификации для целей практической медицины и сельского хозяйства.

Согласно Н. Доблеру (1966), учение о криозащитных веществах является краеугольным камнем современной криобиологии. Основоположителем учения о криозащитных веществах, способных предохранять живые системы от губительного действия низких температур, является Н. А. Максимов (1912), работы которого по изучению защитных свойств растворов неэлектролитов, неорганических солей и солей органических кислот и выяснению значения зоны эвтектики защитных растворов для выживаемости клеток внесли большой вклад в науку о защитных веществах. Опыты по замораживанию различных растений выявили защитное действие сахаров, в частности глюкозы и сахарозы, одноатомных и многоатомных спиртов, из числа которых с успехом был применен глицерин, хотя его защитное действие на растительные клетки оказалось слабее сахаров. В дальнейшем эти идеи были развиты И. В. Тумановым (1940), который также указывая на роль сахаров и других компонентов в развитии синдрома морозоустойчивости растений.

В результате опытов Н. А. Максимов пришел к выводу, что защитные свойства растворов тем выше, чем ниже температура их замерзания. Например, такие вещества, как маннит и щавелевая кислота, точка замерзания которых лежит в области низких положительных температур, совершенно не оказывают защитного действия. Естественная холодоустойчивость растений объясняется повышенным содержанием в их тканях сахаров и подобных соединений, обладающих защитными свойствами. Работы Н. А. Максимова по применению защитных веществ, особенно сахаров и спиртов,

в том числе глицерина, имели большое значение для развития криобиологической науки. Глицерин в качестве защитного вещества (9,6 %) испытывали А. Д. Берштейн и В. В. Петропавловский (1937) при замораживании спермы некоторых животных и установили, что клетки в его присутствии успешно переносят охлаждение до -21°C .

Позднее Ж. Ростан (1946) успешно сохранял сперму лягушки в течение 20 сут при температуре -4 и -6°C в среде, содержащей 10—20 % глицерина, хотя способность глицерина защищать спермии млекопитающих при замораживании до более низких температур не была обнаружена. К сожалению, исследования цитруемых выше авторов были забыты, и лишь в 1948 г. английские исследователи С. Полдж, О. Смит и А. Паркс, сохраняя сперму петуха при низких температурах, случайно обнаружили, что раствор глицерина оказывает защитное действие. В связи с этим О. Смит пишет: «Мы были поражены полученными результатами... раствор, содержащий 10 % глицерина и 1 % альбумина, поставили в холодильник вместе с раствором левулозы. Со временем об этом забыли, а во время хранения этикетки с колб, очевидно, упали и их случайно поменяли местами». Таким образом, вторично произошло открытие защитных свойств глицерина. В предисловии к монографии «Биологическое действие замораживания и оттаивания» О. Смит отмечает неоспоримую заслугу Н. А. Максимова как основоположника учения о защитных веществах, в том числе и глицерина, изложенного в его трудах первого десятилетия XX в. Работы И. В. Смирнова и повторное открытие защитных свойств глицерина показали, что ранее казавшаяся несбыточной идея длительного сохранения живых систем при низких температурах стала реальностью и нашла свое практическое применение. Были созданы эффективные методы консервирования биологических объектов, которые обеспечивают обратимую остановку жизни после длительного пребывания в состоянии анабиоза. Удалось заморозить не только простейших, микроорганизмы, но и клетки, ткани теплокровных животных и человека. Эти методы применяются в медицине, животноводстве и других областях народного хозяйства.

Дж. Лавлок еще в 1953 г. высказал идею о том, что в основе механизма защитного действия глицерина при замораживании лежит его способность легко проникать в клетки, являться хорошим растворителем и действовать как противосолевой буфер. Это свойство глицерина позволяет защищать внутриклеточные структуры и мембраны от повреждающего действия гиперконцентраций солей и электролитов, возникающих вследствие вымораживания воды в лед, особенно в зоне эвтектических температур. Поэтому при добавлении криопротектора к замораживаемым клеткам повышенные концентрации солей никогда не достигает критического уровня и, следовательно, соли не могут оказывать повреждающего действия на биоструктуры клетки. Позднее такая трактовка защитного действия глицерина и подобных ему проникающих в клетки соеди-

нений была уточнена и дополнена данными других исследователей. В частности, было показано, что проникающие в клетку криопротекторы способствуют переохлаждению внутриклеточной среды и ее частичному переходу в витрифицированное состояние, а также предупреждают возникновение на мембране высоких градиентов осмотических концентраций вне- и внутриклеточного раствора.

В 1985 г. Брик и Бесне открыли криозащитные свойства поливинилпирролидона (ПВП), что положило начало применению в криобиологии экзоцеллюлярных криопротекторов, а в 1959 г. Дж. Лавлок указал на криопротекторные свойства диметилсульфоксида (ДМСО) — одного из наиболее широко применяемых при криоконсервации плотных тканей и органов криопротекторов.

Сотрудники Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины решают задачи направленного синтеза криопротекторов. Путем соответствующей модификации структуры химических соединений криопротекторы придают новые физико-химические свойства и способность изменять характер взаимодействия с компонентами среды и мембранами клеток. С началом применения криопротекторов возникло учение о криоконсервантах, т. е. средах, включающих криопротекторы и другие компоненты, поддерживающие изотонно, рН среды и обладающих антишоковыми свойствами. Например, наиболее простейшим из них является глюкозо-желточно-цитратная криозащитная среда, применяемая для криоконсервации спермы. Составы криоконсервантов очень часто видоизменяются в зависимости от вида клеток, их количества и качества.

Успешное охлаждение биологического материала зависит от оптимальной программы скорости охлаждения с учетом вида биообъекта и криопротектора, его концентрации и природы, состава среды и методов отогрева. О. Смит (1964) подвел итоги глубокого охлаждения клеток разнообразной природы — эритроцитов, спермиев, бактерий, а также некоторых тканей, таких, как кожа. Впервые был употреблен термин «криобиология» при описании повреждающего и защитного действия низких температур на биообъекты. Приведены результаты исследований по разработке способов криоконсервирования (1948 г.) с помощью глицерина сперми животных и птиц, а также других биообъектов, нашедших практическое применение в сельском хозяйстве и других отраслях, можно считать официальной датой рождения криобиологии как науки.

В последние 20 лет интенсифицированы исследования механизмов естественной морозостойкости животных и растений, что значительно пополнило багаж знаний современной криобиологии. Стало очевидным, что с понижением температуры тела ниже оптимума в организме развиваются достаточно сложные процессы. Согласно В. Я. Александрову (1975), изучавшему действие температуры на макромолекулы и клетки, ни в одной сфере их деятельности нельзя пока что наблюдать быстрые и совершенные реак-

ции на изменение температуры, какие происходят в «липидном и белковом хозяйстве клетки». При этом адаптивный процесс охватывает и наиболее интимные свойства, связанные с изменением термоустойчивости белков. В частности, у рыб, живущих в водах Антарктики при температуре $-1,8^{\circ}\text{C}$, обнаружены такие термолabile ферменты, как альдолаза, глицириальдегид-3-фосфатдегидрогеназа и фруктозо-2-фосфатальдолаза, молекулярная структура этих ферментов изменяется таким образом, что они приобретают холодоустойчивость и способность функционировать при низкой или высокой температуре окружающей среды. Накопленные факты на основе цито- и молекулярно-экологических исследований показали, что в подавляющем большинстве холодоустойчивые организмы содержат термолabile белки, которые способны быстро перестраиваться в условиях различных температур. Понижение точки замерзания некоторых рыб, обитающих в водах Антарктики, связано не с повышением в их организме концентрации хлористого натрия, как у морских рыб умеренного пояса, а с изменением химического состава белков сыворотки крови, содержащей в 4—5 раз больше небелкового азота, белков и углеводов, а также с наличием в их жидких тканях двух аминокислот — аланина и треонина. Эти белки, понижающие криобиологическую точку крови, названы биологическими антифризами. Выявлены различия в содержании воды и химической структуре отдельных элементов у представителей одного и того же вида, но живущих в различных температурных условиях. Повышение естественной холодоустойчивости вследствие увеличения количества в организме некоторых видов морских моллюсков фракции связанной воды выявил Г. Меримен, установивший, что эти виды животных способны выдерживать охлаждение до -10°C благодаря способности терять при этом 65 % свободной воды, сохраняя оставшуюся воду в связанном состоянии с белками, обладающими высокой вододерживающей способностью.

Один из видных отечественных криобиологов Л. К. Лозина-Лозинский (1950—1982), выясняя механизмы высокой криорезистентности насекомых к действию сверхнизкой температуры, установил, что их холодоустойчивость повышается при переходе от активной жизнедеятельности к диапаузе при последующем закаливании, которое происходит на фоне изменения в организме насекомых характера и уровня обменных процессов, а также целого комплекса структурных физико-химических перестроек. Дж. Бауст (1969—1991) установил, что понижение уровня энергетического обмена с преобладанием гликолитических процессов происходит на фоне накопления гликогена и жира, которые служат как источником энергетического материала, так и сырьем для образования защитных веществ, в частности сахаров и глицерина, наличие которых в гемолимфе и тканях наряду с повышением в них концентрации солей способствует повышению осмотического давления жидкостей организма и снижению температуры замерзания. Одновременно происходит модификация свободной воды глицерином,

сахарами и белками, липопротеинами и другими веществами, появляющимися вследствие изменения характера обмена веществ. Указанные выше процессы снижают вероятность развития в организме кристаллизации клеток и тканей.

На современном этапе развития криобиологии вопросы морозостойкости объектов растительного происхождения успешно разрабатываются отечественными учеными И. И. Тумановым, О. И. Красавцевым, М. А. Соловьевой, изучавшими механизмы холодового повреждения растений, естественной и искусственной их криозащиты. Холодоустойчивость растений является довольно сложной формой адаптации, так как ее проявление связано не только с деятельностью низких температур, но и с влиянием на растения целого ряда других факторов внешней среды, таких, как длина светового дня, влажность и т. д. Существенную роль в подготовке к зимовке играет вегетация, в конце которой в растениях начинают накапливаться сахара и крахмал. Состояние глубокого покоя у деревьев и кустарников при температуре 0°C сопровождается накоплением у них большого количества сахаров и изменением, как это показала М. А. Соловьева, соотношения свободной и связанной воды в пользу последней. Процесс кристаллизации у зимующих северных деревьев, начинаясь в межклеточном пространстве, приводит к осмотическому удалению воды из клеток, мембраны которых приобретают высокую водопроницаемость. Дегидратация клеток в сочетании с защитной ролью сахаров предотвращает развитие внутриклеточной кристаллизации. Удалось установить, что для древесных и травянистых растений удаление воды в процессе подготовки их к зимним холодам является более эффективным механизмом защиты от действия любых низких температур, а повышение водоудерживающей способности — при действии умеренных температур. По мнению И. И. Туманова (1950), в результате значительного накопления защитных веществ и сильного обезвоживания клеток, повышающих возможность витрификации, в зимующих растениях происходят субмикроскопические изменения структуры протопластов при переходе белкового золя в гель, что также повышает вязкость внутриклеточной воды при сильном охлаждении. При вступлении растений в стадию покоя из листьев в зимующие клетки поступают аминокислоты и фракции водорастворимых белков, которые заметно понижают точку замерзания протопласта. По мере усиления морозов увеличивающийся отток воды из клеток в межклеточное пространство вызывает дальнейшее понижение точки их замерзания, чем исключается развитие в них процесса кристаллизации.

Анализ литературы, касающейся использования холода как лечебного фактора, показывает, что низкие температуры использовались более 2500 лет тому назад, когда Гиппократ указал на эффективность холода при лечении травм и травматических отеков. Авиценна (1100), очевидно, одним из первых исследовал действие холода как анестетика. В монографии Томаса Вермолини (1661) имеются наставления о лечебном действии холода при ге-

моррагиях и гематомах. В военной кампании 1812—1817 гг. французский врач Доминик Жан Лари использовал холодное воздействие при ампутации конечностей, что позволяло проводить операции почти безболезненно и без кровопотери.

В 1838 г. в Канаде описан случай побега арестанта с переломом костей нижней конечности, который, охладив погу в ледяном ручье, сумел уйти от погони. В период 1819—1879 г. были опубликованы работы английских врачей, принимавших участие в лечении Наполеона холодными методами. Начиная с этого периода число публикаций, посвященных лечебному применению холода, стремительно увеличивалось. В 1850 г. было указано на возможность лечения рака с помощью применения холода в качестве анестетика, который оказывал более эффективное действие, чем хлороформ. В эти же годы стало известно о случае введения ларенгоскопа после 10-минутной анестезии, вызванной льдом.

На протяжении XIX в. предпринимались попытки использовать общее охлаждение тела с лечебной целью, в частности при травматическом шоке. В 1883 г. К. Оперховским была предпринята попытка лечения цервикала путем орошения шейки матки ледяной водой. Этот же врач применил пары эфира для охлаждения головного мозга экспериментальных животных. Если в 1885 г. для лечения заболеваний и травм поверхностных покровов тела применяли лед, то через 4 года для этой же цели уже использовали сжиженный воздух, затем твердую углекислоту, а в 1905 г. — жидкий азот. С этого времени метод лечения с использованием местного замораживания ткани стали называть криотерапией. В это время начинают все шире проводить деструкцию папиллом и карцином с помощью твердой углекислоты. С 1922 г. Н. Сладковский с успехом применил этот хладагент при лечении дерматологических заболеваний, особенно при раковых поражениях кожи. В 1938 г. А. Темплфей использовал метод замораживания для лечения неоперабельных форм рака яичников, отметив при этом исчезновение болей, кровотечений и уменьшение размеров опухоли. В дальнейшем на протяжении текущего столетия в научной литературе накопилось большое количество наблюдений о применении общей и локальной гипотермии, которую все шире начали применять в клинической практике.

Обоснование применения местной гипотермии для лечения поврежденной опорно-двигательного аппарата приведено в работах Ф. Аллена, Л. Гроссмана (1943—1946) и Н. И. Гержименко (1969), которые на основании опытов установили, что потеря болевой чувствительности конечностей находится в прямой зависимости от скорости снижения температуры внутри ткани и первые признаки анестезии проявляются уже при температуре 10 °С. При этих условиях целесообразно выполнять отсроченное оперативное вмешательство, в том числе и в случае обширных повреждений тканей конечности. Гипотермия, согласно данным С. С. Юдина (1943), снижая воспалительные явления в ране, способствует образованию более тонких коллагеновых волокон, что является след-

ственным противовоспалительного и бактериостатического действия холода.

Теоретической и экспериментальной основой для применения методов криотерапии в клинической практике послужило изучение дозированных холодовых локальных воздействий на ткани, при которых достигалась деструкция тканей патологического очага с последующей стимуляцией репаративных процессов. Важным этапом в развитии метода криотерапии стал 1961 г., когда американский нейрохирург А. С. Ли сумел с помощью криохирургической аппаратуры произвести деструкцию злокачественной и доброкачественной опухоли головного мозга. Для этой цели использовали жидкий азот и зонд, с помощью которого удалось провести деструкцию на глубину нескольких сантиметров. С этого момента криометод в лечении нейрохирургических заболеваний стал методом выбора и оказался особенно эффективным в тех случаях, когда патологический очаг локализовался в легкодоступных областях, таких, как кожа и слизистые оболочки. Сейчас, например, криохирургические методы лечения рака кожи являются радикальными мерами борьбы с данной патологией. Криохирургические операции при лечении паркинсонизма и гипертрофии предстательной железы играют роль вспомогательных мероприятий, хотя при распространенных опухолях желудка, толстого отдела кишечника и мочевого пузыря пока не вышли за пределы экспериментальных исследований.

Разрабатываются эндоскопические методы криохирургии для криодеструкции опухолевых образований пищевода, шейки матки, бронхов. Выявлено, что при строго дозированном замораживании тканей можно вызвать стимулирующее действие холода на процесс регенерации в очаге хронического или острого воспаления, что положено в основу лечения ожоговых и гнойных ран, а также пептических язв 12-перстной кишки и желудка, трофических язв и артритов. Успешно применяются методы сочетанного влияния низких температур и ультразвука на ткани, что ускоряет процесс некротизации ткани. Перспективным является лечение низкими температурами в комбинации с облучением, что позволяет снизить дозу радиации, не снижая общей эффективности лечения. Развитие регионарной и краниocereбральной гипотермии позволяет сейчас эффективно устранять различного рода стрессовые синдромы, связанные с острыми отравлениями и травмами головного мозга.

Криобиология и криомедицина, являясь сравнительно молодыми областями науки, в настоящее время находят все большее применение для успешного решения проблем практической медицины и других отраслей народного хозяйства.

Криобиология — область медико-биологической науки, занимающаяся исследованием действия холода на живые системы. В ее задачи входит изучение механизмов повреждений и криозащиты биологических систем различного уровня организации при действии охлаждения и низких температур, включающее разработку

способов и технологических процессов низкотемпературного консервирования и лиофилизации биологических материалов, используемых в медицине, биологии, животноводстве и других отраслях народного хозяйства. Актуальной проблемой криобиологии является применение гипотермии и низких температур как лечебного фактора в медицинской практике.

В целом область знания — криобиология — охватывает фундаментальные и прикладные проблемы. К числу фундаментальных следует отнести исследование механизмов и закономерностей физико-химических и функциональных процессов, происходящих в биологических системах при охлаждении до 0°C и замораживании от 0 до -196°C . На основании этих данных ведется разработка теории и практики естественной и искусственной криозащиты биологических объектов; создание и скрининг криозащитных и консервирующих сред, включая естественные биологические антифризы.

Для этого фундаментальная криобиология занимается выяснением механизмов естественного и искусственного гибернации, а также анабиоза объектов растительного и животного происхождения.

К числу прикладных проблем можно отнести такие, как обоснование и изучение клинической эффективности применения гипотермического и низкотемпературного воздействия на организм как лечебного фактора; экспериментальное обоснование и клиническое применение криоконсервированных медицинских материалов и препаратов; изучение иммунологических свойств криоконсервированных органов и тканей и особенностей иммунных реакций организма на их трансплантацию в экспериментальных и клинических условиях; создание методов и технологических процессов низкотемпературного консервирования и лиофилизации биологического материала в медицине и народном хозяйстве.

В сферу научных интересов криобиологии входят проблемы жизни в условиях космического холода, а также существования живых систем при комбинированном воздействии низких температур и таких экстремальных факторов, как радиация, ультрафиолетовые и другие виды излучений, высокое давление и т. д.

Таким образом, в общем виде криобиология изучает состояние биологических объектов в диапазоне температур ниже тех, к которым они адаптированы. Сюда относятся температуры, при которых биологические процессы могут протекать в кристаллической или квазикристаллической (льдоподобной) фазе.

Криобиология как наука возникла на стыке различных наук: биологии, физики и биофизики, химии и биохимии, математики и инженерии. В г. Харькове традиционно существовали базовые научные институты, проводившие исследования в области физики низких температур, которые послужили основой для исследований низкотемпературных процессов в живых биосистемах. К числу таких институтов относится прежде всего Физико-технический институт низких температур, в котором были начаты первые криобиологические и криомедицинские эксперименты и была создана соответствующая криогенная техника. До этого периода научно-

практические разработки по использованию низких температур были сосредоточены главным образом в институтах гематологии и трансфузиологии крови. В отдельных биологических институтах также занимались вопросами криоконсервации растительных и репродуктивных клеток, а в области медицины холод использовали в клинической практике.

Однако прогресс в области криобиологии и криомедицины мог получить существенный импульс только на основе развития фундаментальных исследований, которые включают биофизические, биохимические, морфологические и иммунологические аспекты и методы этих отраслей науки.

Важной задачей криобиофизики в области фундаментальных исследований является изучение механизмов криоповреждений и криозащиты, которое предусматривало детальное выяснение физико-химических процессов в биологических системах, протекающих в зоне околоточевых ($0-4^{\circ}\text{C}$) и отрицательных температур (от 0 до -196°C и ниже), т. е. в льдообразном состоянии. Поскольку кристаллизация жидкой фазы клеток очень сильно влияет на их свойства, очень важным является выяснение таких эффективных констант, как теплопроводность, теплоемкость, диэлектрическая постоянная для твердофазных систем, изучение процессов кристаллизации, плавления и рекристаллизации на различных этапах низкотемпературного консервирования клеток и тканей, включая исследование свойств криозащитных сред, а также модификацию структуры клеток и их фазовых превращений при температурах до и ниже 0°C .

Криобиофизика придает большое значение исследованиям, направленным на выяснение состояния и роли воды в гидратации биополимеров и других компонентов биологических систем в присутствии криопротекторов в условиях охлаждения и замораживания. В последнее время благодаря успешному внедрению методов ^{31}P - и ^{23}Na -ЯМР криобиофизики получили возможность изучать особенности клеточного метаболизма и ионного транспорта при низкотемпературном консервировании в твердофазном состоянии без разрушения клеток.

Задачи фундаментальной криобиофизики липидов и белков решаются также с привлечением методов оптической и радиоспектроскопии, ДСК и рентгенографии, ЭПР-спиин-меток и зондов, раман-спектроскопии. Например, методами ЭПР-спиинных меток и зондов, а также ПМР можно исследовать состояние липидов и белков при охлаждении и замораживании, подвижность водной фазы клеток и системы в целом, характер их взаимодействия с криопротекторами и т. д. Например, криопротекторы типа полиэтиленгликолей способны образовывать комплексы с такими биокатионами, как Ca^{2+} , Mg^{2+} . Эти методы позволили установить, что такой криопротектор, как 1,2-пропандиол, при определенных концентрациях в водных растворах затвердевает исключительно в аморфном состоянии, что важно для выбора защитных сред при криоконсервации клеток. Методами ^{31}P -ЯМР можно исследовать

влияние различных экзоцеллюлярных криопротекторов на сдвиги рН и метаболизм фосфорорганических соединений в клетках, не подвергая их разрушению.

Создание прецизионной радиоспектроскопической и оптической аппаратуры и устройств позволяет с помощью криобиофизических методов не только выяснить структурные перестройки биообъектов на молекулярном уровне, но и получить информацию о характере электромагнитных и других явлений и процессов в закристаллизованной матрице, т. е. непосредственно в зоне низких и очень низких (-196°C) температур.

Для выяснения механизмов криоповреждений и криозащиты биообъектов широко используются принципы и методы криобиохимии. В сферу фундаментальных криобиохимических исследований входит изучение молекулярных и физико-химических основ температурно-осмотического шока клеток, выяснение характера биохимической модификации мембранных структур, биополимеров и клетки в целом при охлаждении и замораживании, т. е. «следовые» и латентные повреждения, развивающиеся в указанных выше биообъектах. На молекулярном уровне криобиохимия исследует структурно-функциональное состояние каталитических и структурных белков, макромолекулярных комплексов нонтранспортирующих систем, характер биохимической модификации мембран и биомолекул под влиянием гидролитических, протеолитических и переоксидительных процессов после замораживания — отогрева и влияние на эти процессы криопротекторов и криоконсервантов. Особое значение в последнее время придается белкам цитоскелета клеток и вторичным «мессенджерам» (цАМФ, Ca^{2+} , 1,2-дипальмитилглицерин) в развитии и предупреждении температурно-осмотического шока и низкотемпературной криодеструкции клетки. На основании изучения криобиохимических «следовых» реакций и латентного действия низких температур, а также процессов репарации разрабатываются рекомендации по созданию эффективных криоконсервантов, включающих сбалансированные буферно-солевые системы, ингибиторы и активаторы метаболических процессов, которые способны повысить устойчивость биоструктур к воздействию повреждающих факторов, возникающих при действии низких температур. Перспективной областью криобиохимии является изучение молекулярных механизмов катализа и метаболических реакций в сильно переохлажденных концентрированных водно-органических системах, позволяющих вести наблюдения за ходом реакций при температурах порядка $-60\text{...}-70^{\circ}\text{C}$, т. е. в условиях, когда кристаллизация этой системы не происходит.

Существенное значение для развития теории и практики криоконсервирования органов и тканей имеют фундаментальные криобиохимические исследования по изучению транспорта адренергических гормонов-медиаторов, функции мембранных рецепторов в механизме передачи гормонального сигнала с рецепторов плазматической мембраны на метаболические процессы. Уже сейчас выяснено, что процессы гормонопоза в тироцитах и фрагментах

щитовидной железы в условиях их криоконсервирования хорошо сохраняются после отогрева, т. е. фрагменты тканей способны к образованию тиреоидных гормонов. Это позволяет проводить лечение тиреоидной недостаточности путем трансплантации фрагментов криоконсервированной щитовидной железы, хранившейся в условиях низкотемпературного банка при -196°C .

Для выяснения механизмов криоповреждений в области фундаментальной криобиологии широко используются криомикроскопические, электронно-микроскопические и криофрактоскопические исследования, позволяющие исследовать кинетику, характер кристаллизации и фазовые переходы в компонентах клеток под влиянием низких температур и криопротекторов. Особенно важное значение имеет изучение морфологических закономерностей при репарации биоструктур клеток и тканей на субмикроскопическом уровне в зависимости от характера охлаждения и используемых криопротекторов. Закономерности репарации биоструктур клеток и тканей после низкотемпературного воздействия до настоящего времени окончательно не выяснены и требуют дальнейших исследований. В этой связи необходимо проведение детальных морфологических исследований, направленных на выяснение особенностей перестройки хроматина и его компонентов, плазматической мембраны и мембран внутриклеточных органелл.

Одной из перспективных областей фундаментальной криобиологии является исследование биохимических и молекулярных механизмов естественной адаптации к низким температурам у различных представителей флоры и фауны. Существует ряд микроорганизмов, низших растений, грибов, а также насекомых, рыб, земноводных и других животных литорических зон морей и океанов, которые в процессе эволюции выработали специальные механизмы, позволяющие им выживать в достаточно суровых низкотемпературных условиях окружающей среды. Эти механизмы отличаются у различных животных и растений. Если представители низкоорганизованных организмов способны выживать при довольно низких температурах (-18 и даже -50°C), то представители высших животных могут выживать при температурах $0-1,8^{\circ}\text{C}$, поскольку они в процессе адаптации к холоду выработали способность накапливать в организме биоантифризы (сахара, гликопротеины), а также активно дегидратироваться в период резкого похолодания. Например, рыбы, обитающие в северных морях, сохраняют свою активность только в переохлажденной до $-1,0...-1,8^{\circ}\text{C}$ соленой воде, а более глубокое охлаждение эти животные не переносят, поскольку происходит кристаллизация жидкой фазы тканей. Другие представители пойкилотермных животных (рыбы теплолюбивых водоемов, ящерицы, летучие мыши, змеи, лягушки) также располагают сложными биохимическими и физиолого-морфологическими механизмами, способствующими их выживанию в условиях низкой температуры, хотя сравнительно мало известно о «запуске» и реализации этих механизмов в условиях зимнего охлаждения. В задачи этого направления криобиологии входит также

изучение процессов гибернации у животных (хомяки, сурки, медведи) по мере похолодания.

Хотя сейчас имеется определенная информация о механизмах гибернации, однако молекулярная регуляция этих процессов во многом остается невыясненной. В частности, не выяснено, как регулируется экспрессия генома в условиях похолодания, какие механизмы лежат в основе очень быстрого запуска факторов зимнего покоя (спячки) и каким образом эти системы очень быстро выходят из этого состояния при отогреве тела в весенний период.

Важной задачей криоиммунологии является исследование влияния охлаждения и замораживания на морфофункциональные и иммунологические свойства тканей и органов, поскольку это позволяет выяснить клиническую эффективность и характер иммунологического ответа организма после трансплантации криоконсервированных тканей.

Изучение иммунологических свойств клеток после замораживания — отогрева имеет также большое значение для выяснения характера перестройки и повреждения клеток костного мозга, лимфоцитов, тимоцитов и других иммунокомпетентных биоматериалов с целью разработки эффективных технологических способов их криоконсервации. Решение этих вопросов существенно влияет на создание криобанков длительного хранения этих ценных для медицинской практики клеток.

Существенное значение для решения вопросов, связанных с консервацией и пересадкой консервированных клеток, тканей и органов, имеет проблема криопротекторов. С этой целью в настоящее время продолжается поиск, создание и скрининг искусственных и естественных криопротекторов, а также криоконсервантов, используемых для замораживания и длительного хранения биобъектов. Поэтому в настоящее время продолжаются исследования, основной целью которых является изучение взаимосвязи физико-химических свойств, криозащитного действия и токсичности криозащитных веществ. Решение этих вопросов позволит разработать научно обоснованные подходы к направленному синтезу криопротекторов и созданию на их основе многокомпонентных криоконсервантов, не требующих отмывания.

При направленном синтезе криопротекторов важными оказываются такие параметры, как гидрофильно-липофильный баланс молекулы, т. е. характер и длина вводимого радикала, активность функциональной группы, а также фактор изомерии (место присоединения новой группировки). Для проведения подобного рода исследований широко используют методы биофизического, биохимического, морфологического и математического анализов на базе ЭВМ, позволяющие прогнозировать свойства и эффективность криозащитных веществ. Теплофизические и другие свойства криоконсервантов изучают с помощью ЯМР, ДСК и других методов оптической и радиоспектроскопии, которые позволяют выяснять особенности фазовых переходов вода — лед при замораживании — отогреве. Это дает возможность проводить разработки, направленные

ные на создание многокомпонентных криозащитных сред, в состав которых входят эффективные криопротекторы, модификаторы фазового перехода вода — лед, различные соли, биологически активные вещества и буферные добавки. Перспективной является разработка методов, направленная на регуляцию начала фазового перехода вода — лед при криоконсервировании клеточных суспензий, включая получение в чистом виде факторов ингибирования льдообразования и условий их применения.

В медико-биологическом аспекте являются важными также исследование токсико-фармакологических свойств криопротекторов и криоконсервантов, поскольку это позволяет осуществлять их внедрение в практику медицины и биологии для криоконсервирования биоматериалов. Перспективными являются исследования, направленные на изучение свойств естественных антифризов и биорегуляторов, обладающих криозащитным действием в организме пойкилотермных и гибернирующих животных.

Одной из фундаментальных задач криобиологии является физико-математическое моделирование процессов замораживания — отогрева и факторов, действующих на различных этапах криоконсервации. Используя вариационные методы и принципы термодинамики, получают и анализируют дифференциальные уравнения, описывающие преобразование формы моделей, латеральное и межслойное перераспределение компонентов в тонких двухслойных или многокомпонентных мембранах, особенности массопереноса в липидах и белках в процессе деформации плазматических мембран в условиях температурно-осмотического воздействия на клетки.

Одной из важных прикладных проблем криобиологии является разработка методов низкотемпературного консервирования различных клеток, микроорганизмов и простейших, тканей и органов. Решение этих проблем тесно связано с фундаментальными исследованиями процессов, протекающих в средах при кристаллизации воды, в структурных компонентах клеток при охлаждении, замораживании и отогреве, с выбором оптимальных скоростей замораживания, состава среды, ингибирования кристаллообразования и температурных остановок. Развитие идеи, касающейся эффекта температурных остановок на сохранность биообъектов при быстрых либо двухступенчатых режимах замораживания, является перспективной областью практической криобиологии.

Если продолжить эксперименты и использовать физико-математические модели процессов дегидратации клеток на этапе температурной остановки при быстром замораживании, то можно получить важные сведения о характере процессов пластической релаксации давления, развивающегося в замкнутых полостях льда, изучить кинетику этого процесса в зависимости от количества клеток в единице объема и, наконец, объяснить увеличение или уменьшение сохранности клеток после замораживания в зависимости от их концентрации.

Одним из крупных разделов практической криобиологии явля-

ются теория и практика применения холода как лечебного фактора. Актуальным направлением экспериментальной и клинической криомедицины являются исследования патофизиологических механизмов низкотемпературного воздействия на нормальные и патологически измененные органы и ткани. Установлено, что холодовое воздействие оказывает не только деструктивное, но и стимулирующее действие на ткани, стимулируя процессы репарации в очаге острого и хронического воспаления. Изучение качественных и количественных показателей течения процессов деструкции и репарации при криовоздействиях является материальной основой создания специальной аппаратуры и инструментария для дозированного холодового лечения, например, ожоговых и гнойных ран, трофических язв мягких тканей и пептических язв 12-перстной кишки, хронического тонзиллита и других видов патологии. Важной задачей криомедицины является изучение действия холода на деструктивно-восстановительные процессы в органах, например печени, пораженной хроническим гепатитом или циррозом. В этих случаях криодеструкция малых объемов ткани печени приводит к стимуляции регенераторных процессов в гепатоцитах, способствует резорбции избыточной соединительной ткани и нормализует функцию органа. В практические задачи этой отрасли криобиологии входит также создание новой эндоскопической криоаппаратуры для холодового лечения патологии полостных органов, например язв 12-перстной кишки, заболеваний матки, прямой кишки и т. д.

Криомедицина решает также научные и практические задачи искусственного гипотермического охлаждения (до 0°C) центральной нервной и сердечно-сосудистой систем, а также органов брюшной полости, при котором возникают сложные нейрогуморальные реакции, оказывающие общее стимулирующее действие на функциональное состояние организма. В частности, в условиях общего охлаждения тела с помощью краниocereбральной гипотермии изменяются многие биохимические и нейрохимические процессы, которые изучены не в полной мере. Выяснение этих вопросов может иметь существенное значение при разработке практических рекомендаций по использованию холода как лечебного фактора.

В медицинской практике гипотермические методы широко используются для кратковременного консервирования клеток, тканей и особенно органов (почка, печень). В последнее время благодаря созданию специального инструментария и оборудования медицинская практика получила возможность использовать для лечения больных криогенные методы, которые позволяют воздействовать на ткани и органы температурами порядка $-196\text{...}-120^{\circ}\text{C}$. При таких дозированных воздействиях происходит деструкция тканей, необходимая, например, при удалении опухолей, либо, наоборот, стимуляция регенерации, которая заторможена при гнойно-язвенных процессах. Поэтому перспективными задачами современной криомедицины является дальнейшее изучение механизмов деструктивного и стимулирующего действия холода на ткани и органы, а также разработка медико-технических требований для создания

нового типа инструментов, приборов и аппаратуры для диагностики и лечения различных заболеваний.

Практическая криобиология традиционно занимается разработкой методов и технологических процессов низкотемпературного консервирования и лиофилизации биологического материала для медицинских и сельскохозяйственных целей, микробиологической и пищевой промышленности. Эти задачи современной криобиологии успешно решаются, при этом используются результаты фундаментальных исследований, посвященных изучению механизмов криоповреждений и криозащиты биологических объектов.

Для целей медицинской практики разработаны методы криоконсервации клеток крови и костного мозга, роговицы, репродуктивных клеток человека, эндокринных тканей, хрящей и сегментов костной ткани, кожи и других тканей. Создание запасов криоконсервированных клеток крови, костного мозга и репродуктивных продуктов человека имеет важное значение для лечения больных, получивших опасную дозу радиации в различных условиях, а также при других видах патологии.

Благодаря успехам в криоконсервировании эндокринных тканей появляются возможности лечения тяжелой патологии щитовидной железы, надпочечников, поджелудочной и овариальной желез. Пересадка консервированных трансплантатов эндокринных желез, полностью сохраняющих свою функцию после замораживания, позволяет не только лечить различные эндокринопатии, но и избавить пациента от многократных инъекций эндокринных препаратов. Создание запасов криоконсервированной кожи, роговицы и других тканей позволяет располагать этим биоматериалом в любое время и в любой экстремальной обстановке для лечения больных. Криоконсервированные клетки широко применяются в сфере не только медицины, но и биологии, сельском хозяйстве, микробиологической промышленности.

Криоконсервирование различных репродуктивных клеток животных и растений имеет большое экологическое значение, особенно в аспекте сохранения генетического фонда редких и исчезающих представителей флоры и фауны. Низкотемпературная консервация и последующая пересадка половых клеток элитных животных позволяют в существенной мере решать общегосударственные проблемы продуктивности, осуществлять отбор сильных пород и их генетическую селекцию.

Решение вопросов морозостойкости растений также имеет большое народнохозяйственное значение, поскольку ежегодно от морозов погибает значительная часть урожая.

Большое значение для сохранения генофонда флоры имеют вопросы криоконсервирования семян, пыльцы, эмбрионов и меристемных тканей растений. Замораживание и длительное сохранение различных штаммов микроорганизмов широко применяются для получения ценных продуктов в микробиологической промышленности, используемых в медицинской, пищевой и других отраслях народного хозяйства.

Глава 2

КОНЦЕПЦИИ, ТЕОРИИ И ФАКТОРЫ КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ БИООБЪЕКТОВ

Развитие методов криоконсервации клеточных суспензий тканей и органов основано на изучении механизмов их криоповреждений и криозащиты в процессе замораживания и отогрева. Когда вода в жидкой системе превращается в лед, кристаллы и другие сопутствующие этому факторы оказывают повреждающее действие на клетки и ткани. Под криоповреждением следует понимать структурно-функциональные изменения, наступающие при понижении температуры ниже уровня, к которому адаптирован биологический объект, т. е. процессы, происходящие в клетках или тканях в цикле их низкотемпературного консервирования. На биообъекты в процессе замораживания отрицательное действие оказывают кристаллы льда, избыточная дегидратация, гиперконцентрация солей, изменение тоничности среды и рН. Изучение роли указанных выше факторов в криоповреждении клеток и тканей привело к возникновению ряда концепций и гипотез криоповреждений, которые по-разному трактуют механизм действия того или иного повреждающего фактора и его роль в разрушении структур биообъекта при замораживании — отогреве.

Концепции и теории криоповреждений. Одним из наиболее выдающихся исследователей, заложивших научные основы криобиологии, был Б. Люйе, который, используя главным образом криомикроскопическую технику, выявил ряд тонкостей в механизмах кристаллообразования и в реакции клеток на холодовое воздействие, предсказал характер клеточных повреждений и принципы их защиты. Поэтому наиболее ранней концепцией криоповреждений клеток считается концепция Б. Люйе (30—40-е гг.), который на основе динамических наблюдений за характером кристаллизации биообъектов и действия на них различных защитных растворов постулировал, что в основе разрушения биообъектов лежит один фундаментальный факт — образование вне- или внутриклеточных кристаллов льда, которые инициируют всю гамму криоповреждений биообъектов. Было выявлено, что разрушение клеток тесно связано как со скоростями замораживания, так и с формированием различных по своей молекулярной структуре и физико-химическим свойствам кристаллов льда, которые вызывают необратимые повреждения в клетках. Наиболее выраженное повреждающее действие на структуры клеток оказывают гексаго-

нальные кристаллы льда, а при формировании мелкозернистых форм (аморфные, исчезающие сферуллиты, кубические) повреждения клеточных структур значительно менее выражены. Б. Люйе выявил существование прямой зависимости характера кристаллизации от присутствия в среде различных криопротекторных добавок и скорости снижения температуры. Он установил, что при быстром снижении температуры происходит коагуляция белков цитоплазмы клетки и нарушение хода нормальных процессов их перехода золь=гель, что приводит к гибели клеток в процессе замораживания — отогрева. В дальнейшем, развивая кристаллизационную теорию повреждения клеток, Б. Люйе (1950—1955) обратил внимание на существенную роль дегидратации в выживаемости клеток после замораживания — отогрева. Поэтому его теоретические и экспериментальные изыскания можно в целом охарактеризовать как кристаллизационно-дегидратационную концепцию криоповреждений. Практически Б. Люйе заложил основы современной криобиологии, так как осветил роль большинства известных в настоящее время факторов в криоповреждении клетки.

Дальнейшее развитие методов криомикроскопии и особенно электронной микроскопии позволило установить детали повреждений клеток в микроканальцах льда при замораживании (Т. Ней, Е. Лузена, 60-е гг.). На основе сделанных наблюдений было сформулировано положение о том, что клетки, локализованные в жидких микрофазах канальцев, могут повреждаться в результате действия «эффектов раствора» и растущих кристаллов льда. Было замечено, что плазматические мембраны клеток проявляют устойчивость только к медленно растущим кристаллам льда и сильно повреждаются в случае взрывного роста кристаллов внутри клетки, что приводит к механическому разрыву плазматической мембраны. Эти явления также проявляются, когда клетка подвергается действию процессов рекристаллизации, которые сопровождаются укрупнением кристаллов льда при отогреве. В связи с этим Е. Асахина с сотр. в 50-е годы выдвинул так называемую рекристаллизационную гипотезу криоповреждений клеток. Изучая механизмы морозоустойчивости растительных и животных клеток, авторы этих работ выяснили, что некоторые клетки могут выживать даже при возникновении внутриклеточного льда, однако при условии формирования мелкозернистых кристаллов, не способных к росту. Если при этом отогрев клеток проводить очень быстро, то они полностью сохраняют свои биологические свойства. Если замораживание проводить медленно, то при температуре немного выше -30°C мелкие внутриклеточные кристаллы могут подвергаться процессу рекристаллизации, увеличивая при этом свой объем. Такие клетки, в цитоплазме которых произошло слияние кристаллов в крупные, подвергаются лизису. Следовательно, согласно этой гипотезе, летальным фактором для клеток является не просто возникновение внутриклеточных кристаллов льда, а их способность к росту, когда увеличивается их размер до критических величин.

Роль рекристаллизационных процессов в криповреждении клеток отмечалась в работах других авторов (Ф. Р. Виноград-Финкель, Дж. Шерман, Т. Ней, А. Смит, Л. Рэ и соавт., 1962—1966), где отмечено, что основная часть повреждений биологических объектов происходит именно в период отогрева, когда начинают развиваться процессы рекристаллизации. В связи с этим положительное действие быстрого отогрева на замороженные клетки или ткани объясняли именно тем, что они экспонируются в зоне рекристаллизационных процессов более короткий период времени, чем при медленном отогреве.

Таким образом, основу ранних концепций повреждения биообъектов при замораживании составляли представления о значении дегидратации и механического повреждения биообъектов вне- и внутриклеточными кристаллами льда. Под механическим повреждением понимали прямой эффект действия кристаллов льда, вызывающий повреждение плазматической мембраны клеток и структурной организации внутриклеточных структур в результате их роста.

И. И. Туманов в своем классическом труде «Физиологические основы зимостойкости культур как растений» (1940), обосновывая теорию закалывания растений, впервые установил значение переохлаждения и процессов витрификации в повышении морозостойкости растений как одного из механизмов ингибирования внутриклеточной кристаллизации. Автор указывал, что частичное обезвоживание не является единственным защитным фактором клеток в процессе их замораживания, а при этом большую роль играют структурные перестройки содержимого клетки и накопление биологических антифризов при переходе их в состояние холодового анабиоза. На основании этих исследований был сделан вывод о необходимости предварительной холодовой адаптации живых систем к действию отрицательных температур.

В 50-е годы Дж. Лавлок выдвинул концепцию солевого повреждения клеток, согласно которой ведущим механизмом разрушения замораживаемого биообъекта признавалось воздействие гиперконцентрированных растворов электролитов на структуру плазматической мембраны клеток. Оказалось, что при замораживании клеток в физиологическом растворе NaCl его концентрация в эвтектической точке (-21°C) достигает 5 М и такая насыщенная солевая среда разрушает структуру мембран. В результате нарушения водородных, ионных и гидрофобных связей между компонентами мембран под влиянием высокой концентрации солей мембраны теряют часть фосфолипидов и холестерина. Отличается нарушение барьерных свойств мембран для ионов и метаболитов с целью поддержания градиента этих веществ внутри клетки. В силу этого осмотическая устойчивость мембран клеток резко снижается, и они могут лизировать. Замораживая эритроциты в растворах, содержащих различные концентрации NaCl и глицерина, автор установил, что гемолиз эритроцитов начинал развиваться, когда клетки замораживали до температуры, при кото-

рой концентрация NaCl в суспензии достигала $\sim 0,8$ М независимо от исходной концентрации криопротектора. Поэтому Дж. Лавлок полагал, что причиной повреждения клеток при медленном замораживании, когда вымораживается экстра- и интрацеллюлярная вода, является повышение концентрации солей в микроканальцах льда, что приводит к денатурации биополимеров и мембран клетки. Повреждающее действие солевых растворов автор объяснял их литотропным эффектом на фосфолипидные компоненты мембран, криозащитное действие проникающих в клетку криопротекторов тем, что разрушающая концентрация солей в присутствии этих соединений достигается в клетке при более низкой температуре. В связи с этим Дж. Лавлок предложил так называемую коллигативную концепцию действия проникающих криопротекторов при замораживании клеток и их криозащиты от повреждающего действия солей, подразумевая под этим их способность снижать эффективную концентрацию NaCl в растворе при замораживании.

Существенное значение как фактору криоповреждений клетки придается процессам обезвоживания, которые развиваются в результате роста внеклеточного кристалла льда или действия осмотически активного вещества. Согласно положениям Г. Меримена и сотр. (50—60-е гг.), обезвоживание клеток сопровождается уменьшением их объема и развитием механического напряжения на мембране. По мере роста внеклеточного кристалла льда и снижения температуры дегидратация клетки увеличивается и при достижении определенного критического уровня вызывает напряжение мембраны, которая вначале теряет свои барьерные свойства для ионов и малых биомолекул, а на завершающем этапе могут произойти разрыв и лизис клетки. В результате дегидратации клетки внутриклеточные биополимеры пространственно сближаются с изменением структурно-функциональных свойств. Замораживая эритроциты в средах с различной осмотичностью растворов солей и сахарозы, авторы этой гипотезы выяснили, что разрушение клеток в таких условиях происходило почти при одинаковой осмотичности растворов, независимо от их ионной силы или молярной концентрации. Такая коррелятивная связь между величиной осмотического давления гипертонической среды и степенью повреждения клеток свидетельствовала о существенной роли процесса дегидратации в механизме криоповреждения клеток. В связи с этим Г. Меримен в дальнейшем выдвинул концепцию так называемого «минимального объема клетки», при достижении которого процесс дегидратации приостанавливается и дальнейшее увеличение осмотичности среды способствует потере барьерных свойств плазматической мембраны, а затем разрушению клетки. В основе механизма, приводящего к разрушению клетки при обезвоживании, лежит способность плазматической мембраны клеток сжиматься только до определенного уровня, после которого она начинает испытывать сопротивление внутриклеточного содержимого.

В результате максимального сжатия на мембране возникает градиент гидростатического давления, который приводит к ее разрыву. Как известно, повреждение плазматической мембраны при охлаждении и замораживании носит более сложный характер, связанный, например, с развитием перекисного окисления липидов, их фазового разделения в плоскости мембраны, нарушении структурно-функционального состояния белков цитоскелета. Из этого следует, что феномен «минимального объема» скорее всего определяет момент (по величине достигаемого осмотического давления), когда может произойти повреждение клетки, но не объясняет полностью его механизм. Проникающие в клетку криопротекторы, способные повысить объем жидкой части клеток и тем самым предотвратить их критическое сжатие в процессе замораживания, являются более эффективными при криоконсервации клеточных суспензий, чем другие типы защитных соединений.

Некоторые положения данной концепции были существенно дополнены Дж. Левиттом (1961—1967), который установил, что в результате пространственного сближения микромолекул и взаимодействия реакционно способных группировок формируются ковалентные дисульфидные связи в белках типа S-S-сшивок, которые устраняют функцию активных SH-групп ферментов и тем самым нарушают биологические свойства белков мембран и цитозоля.

На этом основании автор сформировал так называемую сульфгидрильную теорию криповреждений биообъектов. Дж. Левитт указал на два основных механизма при повреждении белков после обезвоживания клеток во время заморозания. Это, во-первых, механический стресс, который возрастает при сжатии клетки, и, во-вторых, устойчивость белков протоплазмы к этому воздействию, которая изменяется в зависимости от степени дегидратации и степени понижения температуры.

В серии работ П. Мейзура (1966—1979) была выдвинута и математически смоделирована так называемая двухфакторная концепция криповреждений клеток, которая постулирует тезис о важной роли в повреждении клеток двух факторов. Первый фактор возникает тогда, когда при медленном замораживании гибель клеток происходит в результате роста внеклеточного льда и действия «эффектов раствора». Второй фактор возникает при быстрой скорости замораживания, когда переохлажденные клетки не успевают дегидратировать и повреждаются в основном внутриклеточными кристаллами льда. Клетки при быстром замораживании не успевают обезводиться, вследствие чего возрастает частота зарождения внутриклеточных кристаллов льда. Присутствие в эквilibрационном растворе проникающих криопротекторов способствует связыванию части вне- и внутриклеточной фракций свободной воды, что приводит к замедлению ее кристаллизации, снижению концентрации электролитов вне и внутри клетки. При использовании непроникающих криопротекторов защиту клеток объясняли адсорбцией и встраиванием молекул полимеров в плазматические мембраны, которые оказывали «фортификационный эф-

фект». При замораживании таких «укрепленных» клеток молекулами криопротекторов снижается возможность нормальных потоков воды из них. Согласно П. Мейзуру, при увеличении гипертоничности внеклеточной среды в процессе замораживания возникает градиент осмотического давления на клеточной мембране, который является движущей силой выхода воды и солей из клетки. Если скорость охлаждения медленная и вода успевает покинуть клетку, то она будет частично дегидратирована и при ее переохлаждении или замораживании рост внутриклеточных кристаллов не происходит. И наоборот, при больших скоростях замораживания, когда вода не успевает покинуть клетку, содержимое цитоплазмы резко переохлаждается и по мере снижения температуры кристаллизуется внутри клетки.

Автором данной теории было выяснено, что величина критической скорости замораживания является различной для разных видов клеток и определяется параметрами, которые были смоделированы для оптимального уровня обезвоживания клеток при замораживании. Так, при замораживании эритроцитов оптимальными являются скорости охлаждения, исчисляемые десятками, сотнями или тысячами градусов в минуту, для клеток хомячка — около $100^{\circ}/\text{мин}$, для *E. Coli* — $10^{\circ}/\text{мин}$, клеток костного мозга и других ядродержащих клеток — около $1-2^{\circ}/\text{мин}$. Учитывая существование зависимости выживаемости клеток от скорости замораживания, вида клеток, концентрации и природы криопротектора, П. Мейзур пришел к выводу, что существует определенная оптимальная, специфическая для разных клеток скорость охлаждения, обеспечивающая максимальную сохранность клеток в цикле замораживания — отогрева. Эта скорость, с одной стороны, может быть настолько низкой, что полностью устраняет процесс внутриклеточной кристаллизации, а с другой — настолько быстрой, что существенно сокращает время экспонирования клеток с гиперконцентрированными растворами солей в микроканальцах льда. С целью аналитического описания процесса обезвоживания П. Мейзур широко использовал физико-математический аппарат, который позволил ему в совокупности с экспериментальными фактами, полученными на эритроцитах и дрожжевых клетках, установить, что в основе дегидратации клеток и внутриклеточного кристаллообразования лежит один и тот же термодинамический процесс — переохлаждение жидкой части цитоплазмы клеток. При этом критическое обезвоживание клеток или внутриклеточная кристаллизация являются наиболее существенными факторами криоповреждений. Согласно представлениям, выдвигаемым в двухфакторной гипотезе, для предотвращения внутриклеточной кристаллизации необходимо снизить скорость охлаждения до такого значения, при котором переохлаждение остается недостаточным для инициации внутриклеточных кристаллов. Вместе с тем скорость замораживания не должна быть слишком медленной, так как необходимо по возможности сократить интервал времени неблагоприятного воздействия на клетки «эффектов раствора».

Л. К. Лозина-Лозинский и Д. Прайбор (70-е гг.) выдвинули мультифакторную теорию криповреждений, согласно которой повреждения клеток холодом возникают под влиянием защитных сред, охлаждения, замораживания и отогрева. Каждый в отдельности взятый фактор (или система факторов) действует разрушающе на структурно-функциональные параметры замораживаемых клеток или тканей, которые в цикле криоконсервации накладываются друг на друга, воссоздавая картину криповреждений составляющих клетку компонентов. При этом было замечено, что повреждаемость клеток усиливалась при увеличении времени их экспонирования при температурах ниже 0°C , а также в результате их критического переохлаждения. Важное значение при этом придавалось присутствию или отсутствию в среде криопротектора, его мольной концентрации, способности проникать (или не проникать) через плазматическую мембрану. При этом подчеркивалось, что одни и те же виды холодových воздействий могут вызывать в одних клетках обратимые повреждения мембран, а в других — необратимые разрушения. Это во многом зависело от типа строения клеточной мембраны и силы повреждающих факторов.

Существуют некоторые виды микроорганизмов, например *Halobacterium*, у которых внешняя мембрана содержит фитанльные липиды, что позволяет им легко переносить многократные замораживания до -196°C , в то время как в аналогичных условиях замораживания мембраны *E. Coli* быстро разрушаются. Повреждения клеток после переохлаждения всегда сильнее, чем после их прямого замерзания без предварительного переохлаждения (рис. 1). Выявлено, что число поврежденных и не способных к росту клеток гораздо выше после их переохлаждения. Авторы данной концепции считают, что фактор времени, который не учитывается двухфакторной теорией криповреждения, а также сильное переохлаждение клеток являются причинами повреждения плазматической мембраны, потери ее барьерных свойств для ионов и воды.

Опыты на некоторых видах клеток показали, что главной причиной их разрушения является не столько глубина охлаждения в пределах до -60°C и скорость охлаждения, сколько время (продолжительность) пребывания при температурах ниже 0°C . Клетки теплокровных животных, не адаптированные к холодovому воздействию, в этих условиях подвергаются быстрому лизису, а клетки животных, эволюционно приспособленные к жизни при низких температурах, гораздо лучше переносят охлаждение. Это происходит потому, что клетки адаптированных к холоду животных в природных условиях лучше обезвоживаются не только в подготовительный период охлаждения (при 0°C), но и при замораживании, когда происходит дополнительное устранение части связанной фракции воды. Таким свойством быстрой элиминации воды из клетки теплокровные животные обладают в меньшей степени.

Известно, что при температурном шоке, когда при охлаждении до 0°C в системе отсутствуют кристаллы льда, определенные ти-

пы клеток быстро разрушаются. Это происходит по той причине, что при быстром охлаждении, особенно в гипертонических средах, клетки подвергаются комплексу воздействий, которые нарушают структурно-функциональное состояние мембран и внутриклеточных органелл.

Дж. Фаррант и Дж. Моррис (70—80-е гг.), исследуя механизмы термально-осмотического шока эритроцитов, обнаружили, что если эритроциты экспонировать в гипертонических растворах NaCl при комнатной температуре короткий промежуток времени, то они становятся сенсibilizированными к быстрому охлаждению до 0°C и гемолизируются.

Однако если время экспонирования клеток в растворах NaCl при 0°C увеличить, то они становятся десенсibilizированными и при быстром или медленном охлаждении до 0°C не разрушаются. Это происходило в силу того, что выдерживание клеток в гипертонических растворах электролитов и неэлектролитов приводит к их сжатию и обезвоживанию, что придает им в дальнейшем устойчивость к действию отрицательных температур. Аналогичную функцию дегидратирующего фактора может выполнять и растущий внешний кристалл льда, когда клетки замораживают с медленной скоростью (1—2°/мин). Поэтому авторы цитируемых выше исследований сформулировали так называемую адаптационную теорию, согласно которой выживаемость клеток зависит не только от скорости охлаждения, но и от времени экспонирования клеток при различных температурах. В этом случае влияние скорости охлаждения на выживаемость клеток рассматривается как фактор переменного значения, связанный с временем пребывания объекта при определенной температуре. Адаптационная гипотеза хорошо подтверждалась при замораживании некоторых клеток с температурными остановками при —15 или —18°C, которые позволяли клеткам адаптироваться к тем или иным температурам. Механизм повышения устойчивости клеток после температурных остановок объясняли тем, что при медленном замораживании клетка успевает достаточно дегидратировать и тем самым предотвратить формирование крупных кристаллов внутриклеточного льда. Аналогичные наблюдения были сделаны также еще в 50-х годах Е. Асахиной, Б. Люйе и К. Полд-

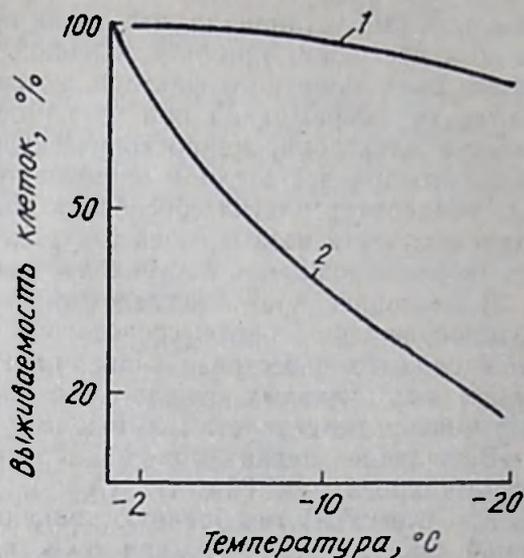


Рис. 1. Выживаемость клеток культуры ткани почки китайского хомячка, охлажденных (1) со скоростью 1,6°C/мин до различных температур и быстро отогретых (2)

жем, которые установили, что время пребывания клеток в замороженном состоянии при определенной отрицательной температуре играет роль защитного фактора, который позволяет предохранять клетки от повреждений при их замораживании до -196°C . Используя электронно-микроскопическую технику, авторы подтвердили, что при достаточном времени выдержки в зоне отрицательных температур клетки способны к дополнительному сжатию, т. е. удалению части незамерзшей внутриклеточной воды, что уменьшает степень зарождения внутриклеточных кристаллов.

В последнее время исследования по выяснению механизмов криповреждений клеток сосредоточены на изучении особенностей молекулярных перестроек биополимеров и надмолекулярных структур, к числу которых прежде всего относятся биологические мембраны, белки цитоскелета и цитозоля.

Выявление механизмов криповреждений клеток позволило сформулировать в 80-е гг. (А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, А. К. Гулевский) мембранную концепцию криповреждений, в которой постулируется важная роль плазматической мембраны и белков цитоскелета в сохранении структурно-функциональной целостности клетки при замораживании — отогреве. Показано, что основным механизмом повреждения мембраны в условиях охлаждения, замораживания и отогрева являются фазовые превращения липидов и белков, приводящие к нарушению барьерных свойств мембраны и утечке из цитоплазмы ионов и биомолекул через трансмембранные дефекты (ТМД). Формирование и судьба ТМД зависят от условий и способов замораживания, а также структурного состояния белков цитоскелета, которые контролируют прочность ассоциативных связей в мембране, поддерживая тем самым нативную форму и объем клеток. Существует температурная зависимость криповреждения мембран, которая характеризуется различной степенью нарушения гидрофобных свойств плазматических мембран, что приводит к нарушению барьерных параметров мембраны при неадекватных режимах криоконсервации, аномальному перераспределению ионов по обе стороны мембраны и потере свойств белкового цитоскелета, поддерживающего структуру мембраны. При этом теряются упругоэластические свойства мембраны, возникают ТМД и клетка может разрушиться.

Таким образом, в данной концепции обращается внимание на тот факт, что ведущим фактором, предопределяющим исход охлаждения, замораживания и отогрева, является формирование ТМД в плазматической мембране, эволюция которых зависит от степени модификации белкового цитоскелета и липидного бислоя мембраны.

Факторы криповреждений. Многообразие проявлений криповреждений в клетке зависит от одного фактора — фазового перехода воды в лед. При вымораживании воды в лед живые системы подвергаются воздействию комплекса повреждающих факторов, среди которых существенное значение имеют внутриклеточная кристаллизация, гиперконцентрация солей и ионной силы раство-

ра, изменение величины рН и зарядовых характеристик мембран, дегидратация и фазовые превращения биополимеров и надмолекулярных структур.

Процесс кристаллообразования по-разному воздействует на клетки и ткани. Это зависит прежде всего от скорости охлаждения биоматериалов, присутствия в среде замораживания криопротекторов и других защитных добавок, а также от скорости их отогрева.

Криповреждения клеток при медленном замораживании

При медленном охлаждении клеток или тканей, когда скорости замораживания достаточно низкие (например, от 0,5 до 2—3°/мин либо ниже), идут зарождение, формирование и рост внеклеточного кристалла льда. Рост внешнего кристалла осуществляется за счет кристаллизации растворителя, а затем части объемной воды клеток. Под влиянием осмотических сил, создаваемых растущим кристаллом, жидкое содержимое клетки, а также незамерзшего раствора достаточно сильно концентрируется. Это происходит потому, что по мере понижения температуры и роста внешних кристаллов большая часть клеток отодвигается фронтом движущегося льда в извитые микроканалы, в которых происходит концентрирование растворов солей в кристалл за счет вымораживания свободной воды (рис. 2). Так, при замораживании клеток в растворе NaCl его эвтектическая концентрация при замораживании достигает почти 5 М, т. е. клетки, расположенные в жидких фазах микроканалов, подвергаются воздействию всевозрастающих концентрированных растворов солей. Часть клеток при росте кристалла льда может захватываться в ледяные ячейки, где подвергается механическому и гипербарическому воздействию. Как в том, так и в другом случае клетки попадают в неблагоприятные условия своего микроокружения, которые могут способствовать разрушению их компонентов. Особенно активным, повреждающим клетку фактором является гиперконцентрирование солей в жидких микрофазах ледяных каналов, в которых располагаются клетки.

Роль гиперконцентрированных растворов солей. Концентрированные растворы солей оказывают разностороннее действие на липопротеиновые комплексы плазматических мембран, зависящее от природы соли и характера ее диссоциации. В частности, активное влияние на стабильность белков и липидов мембран оказывают Ca^{2+} и Mg^{2+} , а также ряд одновалентных ионов ($\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{K}^+$) и анионов (Cl^- , HCO_3^- , NO_3^- , CH_3COO^-). Например, присутствие 1 мМ/л Ca^{2+} в растворе почти полностью устраняет фазовые переходы фосфатидилглицерина и фосфатидилсерина в диапазоне 0—70°С. Примерно такое же действие на липиды оказывают Na^+ и K^+ . Растворенные катионы и анионы оказывают также хаотропное действие на структуру vicinalной воды и белковые компоненты мембран клеток.

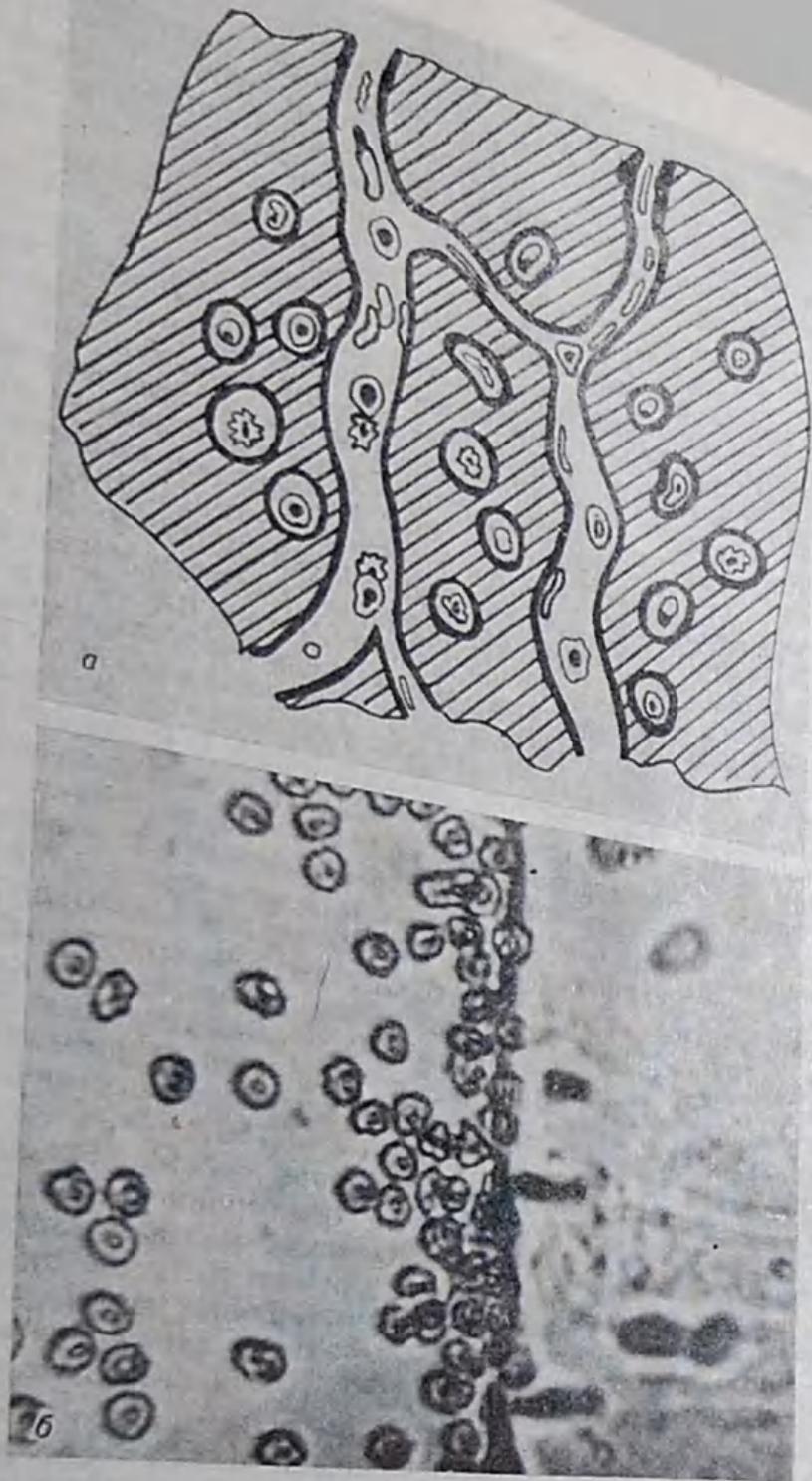


Рис. 2. Схема (а) и микроскопическая картина (б) отодвижения клеток в микроканальцы кристалла и их частичный захват в толщу льда

Ряды ионов, расположенные в порядке уменьшения их способности связывать молекулы среды, называются лиотропными, или рядами Гофмейстера, т. е. лиотропный ряд можно рассматривать как ряд ионов, составленных в порядке усиления или ослабления их влияния на свойства растворителя. Известен лиотропный ряд ионов по их способности адсорбироваться из водных растворов на поверхность белков и изменять их растворимость и набухание. В связи с этим одновалентные катионы и анионы можно поставить в следующий ряд по возрастающей способности адсорбироваться: катионы — $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Pb}^+ < \text{Sc}^+$; анионы — $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{J}^- < \text{Na}_5$.

Для двухвалентных катионов этот ряд выглядит следующим образом: $\text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$. Чаще всего в реальных условиях замораживания интерес представляют в основном катионы Na^+ , K^+ , H^+ и анионы Cl^- , OH^- , поскольку криоконсервацию осуществляют, как правило, в водных растворах натриевых или калиевых солей (NaCl , KCl). Указанные выше катионы и анионы, концентрируясь в микрофазах при замораживании, могут дестабилизировать мембрану клеток по двум механизмам: в результате разрушения структуры внутримембранной (вицинальной) воды, а также при изменении зарядовых характеристик полярных головок липидов и белков за счет нарушения их протонирования. Дж. Лавлок считал, что нарушение структуры клеток при замораживании происходит вследствие лиотропного действия высоких концентраций растворов электролитов на структуру вицинальной (примембранной) воды, повышения ее липофильности и выхода липидных компонентов в окружающую среду. Сейчас установлено, что существует тесная зависимость между влиянием анионов на структуру мембраны и их положением в лиотропном ряду Гофмейстера. Практически такие анионы, как Cl^- , Br^- , NO_3^- и особенно ClO_4^- , способствуют лабильзации мембраны, а F^+ , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , наоборот, стабилизируют мембрану клеток.

Действие высоких концентраций солей на мембраны клеток проявляется в возникновении осмотического градиента между вне- и внутриклеточной средами, их быстром обезвоживании и сжатии. Уровень сжатия (или, наоборот, разбухания клетки) в условиях осмотического воздействия во многом зависит от вязко-эластических свойств мембраны и прочности прикрепления к ней белков цитоскелета. В условиях действия гиперконцентрированного солевого стресса визуальное всегда возникают локальные деформации мембраны, отображающие реакцию белков цитоскелета на осмотическое действие. При этом такие деформированные участки могут подвергаться микровезикуляции и отщипываться в виде липидно-протенновых фрагментов от плазматической мембраны (рис. 3). Потеря мембранного материала приводит к сокращению площади мембраны и ее способности к дальнейшему уменьшению своего объема. Исследование эритроцитов методом ЯМР-релаксации в присутствии парамагнитного Mn^{2+} показывает, что по мере концентрирования NaCl в микроканальцах льда уже при -5°C очень

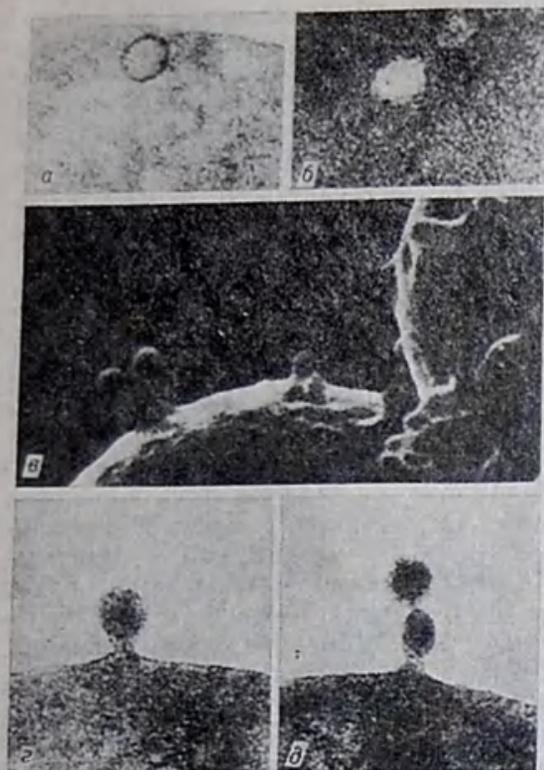


Рис. 3. Процессы спикулообразования (а) и везикуляции мембран (б—д) эритроцитов при осмотическо-температурном воздействии (X 61 000)

влияет на состояние липидного бислоя и белки плазматических мембран клеток, особенно в тех случаях, когда реализуется специфическое связывание иона или его хаотропное действие. Еще Дж. Лавлок заметил, что при повышении концентрации NaCl до 0,8 М в среде инкубации появляются освобожденные из мембран эритроцитов фосфолипиды и холестерин, т. е. наблюдается изменение «растворимости» полярных частей молекул в растворе электролита, которое сопровождается изменением средней площади на молекулу и температуры фазового перехода липида. Например, при увеличении концентрации NaCl от 0,01 до 10 мМ общая средняя площадь на молекулу в монослое кислого дилаурилфосфатилглицерина возрастает от 55 до 66 Å. Это объясняется уменьшением поверхностного потенциала и, следовательно, локального pH вблизи поверхности липидных молекул, что приводит к ионизации фосфатных групп и увеличению межмолекулярного электростатического отталкивания в монослое.

При дальнейшем увеличении ионной силы NaCl до 20 мМ в дисперсии липидных везикул плотность упаковки глицеринового

сильно изменяется объем клеток, а при -7°C , когда осмотическое давление достигает 4 мосм, эритроциты достигают максимального объема. При этом происходит нарушение барьерных свойств мембраны для ионов и мелких молекул. При охлаждении до -9°C , когда осмотическое давление превышает 7 мосм, практически разрушаются все клетки, если в среде замораживания отсутствуют защитные вещества. Прогрессирующее сжатие эритроцитов в этих условиях происходит по закону идеального осмометра в определенном интервале температур до тех пор, пока осмотическое давление не достигает критических величин.

Повышение концентрации электролитов в жидких микрофазах ледяных канальцев сильно

остова, особенно в наружном слое, возрастает, т. е. средняя площадь на полярную головку уменьшается. Однако поскольку ионы уплотняют молекулы только наружного монослоя, то он в целом искривляется. В силу этого возникают структурные напряжения, и система становится крайне неустойчивой. Если концентрация электролитов достигает критических значений, то липидные везикулы сливаются и выпадают в виде мультислойного осадка. Различные соли по-разному влияют на температурные и термодинамические параметры фазовых переходов липидов мембран.

Добавление в водную дисперсию из мультислойной системы дипальмитонилфосфатидилхолина различных солей изменяет температуру начала фазового перехода липида, а также его термодинамические параметры (табл. 1). Ламеллярная мезофаза заряженных липидов в чистой воде очень слабо гидратируется и диспергируется. Поэтому полярные головки этих липидов практически находятся в неионизированной форме и плотно упакованы благодаря водородным связям. В растворах электролитов происходит частичная диссоциация протонов, однако при этом отрицательные заряды компенсируются за счет противоионов, которые могут формировать так называемый электрический шернговский слой, если концентрация электролита достаточно высока. При достижении критических концентраций электролита двухвалентные ионы могут за счет специфического связывания уменьшать поверхностный заряд мембраны и повышать температуру фазового перехода. Так, при повышении концентрации Ca^{2+} и в меньшей степени Na^+ в мембранах происходят структурные перестройки, приводящие к слиянию везикул и осаждению заряженных липидов.

Таблица 1. Температурные и термодинамические параметры фазового перехода в мультислойной дисперсии дипальмитонилфосфатидилхолина в зависимости от природы и концентрации солей

Раствор	Температура начала фазового перехода, °С	$H_{\text{п}}$ кал·г ⁻¹	Кал·град ⁻¹ моль ⁻¹
Вода	42,1	10,0	23,4
1 М NaCl	41,0	9,9	23,7
1 М KCNS	40,8	14,7	34,3
1 М KCl	43,6	9,1	21,6
1 М MgCl ₂	43,1	9,5	22,6
1 М CaCl ₂	44,8	10,2	24,1
3 М CaCl ₂	64,9	15,4	34,2

Таким образом, в присутствии ионов происходит уменьшение средней площади мембраны на молекулу липида, поскольку при этом формируются меж- и внутримолекулярные солевые мостики между фосфатными и жирнокислотными радикалами, т. е. происходит в целом изменение структурной упаковки липидного бислоя.

Концентрированные растворы солей очень сильно влияют на подвижность алкильных цепей фосфолипидов. Например, при концентрации в микроканальцах льда около 3 М гидрофобные ра-

дикалы липидов затвердевают и вытягиваются. Это связано с нарушением характера двойного электрического слоя на межфазной границе, в результате чего происходит, очевидно, нейтрализация зарядов головок липидов, что приводит к нейтрализации электростатического взаимодействия молекул липидов. В силу этого липиды подвергаются фазовому разделению в плоскости бислоя. Плотность упаковки липидов в монослое, зависящая от величины заряда полярных головок, очень сильно нарушается не только при повышении концентрации электролитов, но и при изменении величины рН. При критической концентрации водородных ионов может произойти полная нейтрализация поверхностного заряда биополимеров или надмолекулярных структур.

Таким образом, под влиянием гиперконцентрационных растворов солей уменьшается текучесть и повышается жесткость полярных головок и углеводородных радикалов фосфолипидов мембран. Гиперосмотические растворы отрицательно воздействуют на мембранные белки, изменяя их пространственную и конформационную структуры, что приводит к ослаблению силы взаимодействия в белок-липидных комплексах мембран. Поскольку при осмотическом сжатии клеток нарушается функция нонтранспортирующих макромолекулярных комплексов, это приводит к аномальному перераспределению ионов по обе стороны мембраны и нарушению структурно-функциональной интеграции белков цитоскелета и цитозоля. При повышении внутриклеточной концентрации Na^+ до 0,5 моль/л и повышения рН_{in} дезоксигемоглобин и белки цитоскелета начинают диссоциировать на димеры, и этот процесс возрастает по мере концентрирования внутриклеточного электролита. Поскольку гемоглобин и белки цитоскелета ассоциированы с внутренней поверхностью мембран эритроцитов, то нарушение этих взаимодействий может привести к изменению вязкоупругих свойств мембран и структуры клетки в целом.

Роль дегидратации. Важным фактором, влияющим на стабильность липидного бислоя, являются гидрофобные взаимодействия, а дополнительными, ориентирующими молекулы фосфолипидов в водной среде — электростатические и водородные связи. Эти же связи обеспечивают необходимую ориентацию мембранных белков и белок-липидных взаимодействий. Ван-дер-ваальсовы силы, по видимому, обеспечивают наиболее плотную упаковку углеводородных цепей. Оптимальная упаковка молекул в бислое происходит в том случае, если гидрофобная и гидрофильная части молекул достаточно сбалансированы. Для поддержания этого баланса важно содержание на оптимальном уровне всех фракций воды, входящих в состав биополимеров и мембран клетки. При фазовом переходе вода — лед полимерзует не только поверхностно-связанная вода, но и часть связанной воды. Степень ее вымерзания зависит от присутствия в среде криопротекторов и температуры. Так, при замораживании системы лецитин — вода до -50°C образуется больше льда, чем при охлаждении до -30°C , что указывает на включение части связанной воды в кристаллическую структуру льда.

Уровень гидратации мембран и белков цитоплазмы в существенной мере влияет на их стабильность, особенно при воздействии отрицательных температур. Дегидратация липидных бислоев сопровождается лиотропным мезоморфизмом липидных молекул и сдвигом фазовых переходов в область более высоких температур. Холестерин, эффективно устраняющий фазовый переход при оптимальном содержании воды в мембране в условиях обезвоживания, кластеризуется в отдельную фазу, что приводит к более облегченному воздействию кристаллов льда на «сухой» фосфолипидный слой, лишенный своего естественного пластификатора — холестерина. Методами ЯМР высокого разрешения, рентгеновской дифракции установлено, что обезвоживание эритроцитов и микроорганизмов приводит к разделению липидных и липопротеиновых фаз, потере барьерных свойств мембран из-за формирования в них трансмембранных дефектов, через которые происходит потеря внутриклеточной воды, ионов и малых биомолекул. При дегидратации клеток, вызванной ростом внешнего кристалла и действием экзогенных растворов солей, происходит нарушение структуры и функции внутриклеточных органелл, имеющих явно выраженное мембранное строение (лизосомы, митохондрии, мембраны саркоплазматического ретикулума).

Значение электростатических эффектов. Электролиты обладают способностью адсорбироваться твердыми адсорбентами, в том числе и кристаллами льда. Из различных содержащихся в растворе ионов на поверхности кристалла адсорбируются те ионы, которые, входя в состав кристалла, могут достраивать его кристаллическую решетку. В результате адсорбции ионов поверхность кристалла заряжается. Характер заряда кристалла зависит от природы растворенных солей в жидких микрофазах. При этом около поверхности кристалла начинают концентрироваться ионы противоположного знака в таком количестве, при котором заряды компенсируются. Поэтому на границе раздела между поверхностью кристалла и раствором образуется штерновский двойной электрический слой. Образование двойного электрического слоя обуславливает появление скачка потенциала на межфазной границе, величина которого определяется концентрацией в растворе ионов, являющихся общими для кристалла и раствора. Ионы, определяющие величину потенциала на межфазной границе, называются потенциалопределяющими и образуют внутреннюю обкладку двойного электрического поля. Твердая фаза, на поверхности которой образовался двойной электрический слой, обладает свойством адсорбировать из раствора путем обмена определенными ионами, причем в обмене участвуют ионы наружной обкладки двойного электрического поля. В случае, если поверхность кристалла льда заряжена положительно, наружная оболочка слоя будет состоять из анионов, т. е. в этом случае происходит анионный обмен. Если она заряжена отрицательно, то наружная обкладка будет состоять из катионов, т. е. между поверхностью кристалла и жидкой фазой будет происходить катионный обмен.

Поэтому поверхности кристаллов льда достаточно сильно поляризованы в результате формирования двойного штерновского слоя, который может достигать 200 мВ и при контакте с клетками вызывать электрический пробой плазматической мембраны. Время существования подобного рода потенциала будет зависеть от скорости роста кристалла и существования межфазной границы. При закристаллизованной эвтектической солевой смеси и устранении межфазных границ электрический потенциал устраняется. Однако заряд на межфазной границе поверхности кристалла — жидкая микрофаза быстро спадает, и реальная возможность повреждения клеток под воздействием этого фактора очень сильно снижается.

Поскольку при замораживании системы происходит относительное перемещение фаз, т. е. фаза перемещается в неподвижной жидкости или жидкость перемещается относительно неподвижной твердой фазы, возникает потенциал, связанный с относительным перемещением, который носит название электрокинетического. Его величина и знак зависят от сжатия или диффузионности двойного электрического слоя, а также природы ионов, входящих в него. Электрокинетический потенциал снижается по мере повышения концентрации H^+ в результате сжатия диффузионного слоя, в процессе которого происходит переход H^+ из этого слоя в адсорбционный, т. е. на поверхность кристалла. При увеличении в растворе концентрации OH^- ионы водорода, соединяясь с другими ионами OH^- , будут уходить из двойного слоя, замещаясь катионами металлов, например Na^+ .

Радиус ионов также сильно влияет на их способность адсорбироваться на поверхности. В случае одинаковой валентности (например, Li^+ , Na^+ , K^+ ; Pb^{2+} , Sr^{2+}) максимальную адсорбционную способность проявляют ионы с наибольшим радиусом, так как они обладают большей поляризуемостью и меньшей гидратацией. Чем больше радиус иона, тем меньше степень его гидратации при одной и той же величине заряда. В этом случае они лучше притягиваются поверхностью кристалла, состоящей из ионов или полярных молекул.

Процессам перемещения ионов на поверхности препятствует степень их гидратации, так как наличие гидратной оболочки уменьшает электрическое взаимодействие.

Роль величины рН. Липидный бислой мембран весьма чувствителен к величине рН, которая может изменяться в жидких микрофазах ледяных канальцев при замораживании. Это связано с тем, что протонирование головок липидов играет важную роль в их упаковке и фазовых переходах. Например, в смешанных фосфолипидных везикулах фазовый переход при рН 7,4 происходит при $0^\circ C$, а при рН 2,5 — при $26^\circ C$, т. е. в случае сильного протонирования карбоксильных группировок липидов они разделяются по фазам и затвердевают.

При криоконсервации биообъектов часто используют различные буферные растворы. Такие растворы могут влиять на величину

пу рН в жидких микроканальцах по мере концентрирования замороженного раствора. Например, сдвиг рН в присутствии фосфатного буфера не превышает 0,5—1,0 ед., в то время как в его отсутствие рН в растворе может колебаться в пределах 1,5—2,0 ед. Причиной уменьшения рН фосфатных буферных растворов при замораживании является кристаллизация солей. При температуре —6 °С величина рН буферного раствора, сосуществующего с твердой фазой, снижается на 1 ед. по сравнению с рН того же раствора при 0 °С. Такому понижению рН соответствует уменьшение концентрации щелочного компонента буфера по меньшей мере на порядок.

Таким образом, сдвиг рН фосфатного буфера в кислую область при замораживании является следствием изменения его состава при кристаллизации солей.

При низких значениях рН облегчаются агрегация и солюбилизация белков, а также кластеризация части мембранных липидов, которые опережают другие структурные изменения, возникающие в мембране при охлаждении и замораживании. Солюбилизация цитоплазматических и цитоскелетных белков эритроцитов при низких значениях рН хорошо коррелирует с ее влиянием на деформируемость клеток. Чем сильнее деформируется клеточная мембрана под влиянием рН и тоничности среды, тем больше создается условий для открепления от мембраны и элиминации цитоскелетных и других внутриклеточных белков из клеток. Инкубация клеток при кислых значениях рН (4,0—5,0) может приводить к формированию поперечных сшивок мембранных белков в результате окисления их SH-групп и уменьшению микровязкости внутриклеточных белков.

Снижение рН в жидких микрофазах льда до 0,5—5,5 вызывает спонтанный гемолиз эритроцитов, что совпадает со значительным снижением внутриклеточной вязкости белков цитоскелета.

В указанной выше области рН спонтанный гемолиз эритроцитов происходит еще быстрее, если предварительно денатурировать спектрин. Изменение рН в щелочную сторону (с максимумом до 8,0) сопровождается, наоборот, увеличением микровязкости внутриклеточных белков. Механизмы, при помощи которых рН оказывает влияние на компоненты мембран и белки цитозоля при замораживании клеток, остаются до конца неясными.

Роль механических и гипербарических факторов. При медленном замораживании клетки могут захватываться растущими кристаллами льда, где повреждаются в результате их механического раздавливания. Часть клеток, захваченных в кристалл льда, оказывается в замкнутом пространстве, где они подвергаются гипербарическому воздействию, т. е. возникает эффект «ледяной бомбы» в замкнутом пространстве, при котором клетки могут разрушаться.

Криповреждения клеток при быстром замораживании

Криповреждения клеток при быстром замораживании обусловлены в основном двумя факторами: во-первых, формированием и ростом внутриклеточных кристаллов льда и, во-вторых, процессами рекристаллизации.

В случае быстрого замораживания (например, 300—400°/мин и выше) клетка не успевает обезводиться, в силу чего создаются условия для кристаллизации внутриклеточного раствора.

Возникновение и рост внутриклеточных кристаллов являются детальными факторами для клеток. Поэтому на практике часто используют различные многоступенчатые программы замораживания, которые направлены на постепенное обезвоживание клеток и снижение повреждающего действия физико-химических факторов на биообъекты. С этой же целью при криоконсервации биообъектов используют различные сложные среды, криопротекторы, мембранные и метаболические стабилизаторы, способные поддерживать свойства клеток в цикле замораживания — оттаивания.

Поэтому в реальных условиях вероятность возникновения внутриклеточной кристаллизации как фактора криповреждения очень мала, так как обычно используют оптимальные по времени скорости льдообразования, в течение которых клетки успевают обезводиться. Возможность развития внутриклеточного кристаллообразования также сильно тормозится при замораживании клеток и тканей, если они охлаждаются под защитой различных криопротекторов, способствующих модификации структуры жидкой среды и характера ее кристаллизации. В присутствии проникающих криопротекторов при любой температуре число активных примесей, являющихся центрами зародышеобразования кристаллов льда, снижается, т. е. проникающие криопротекторы служат пассиваторами процесса инициирования кристаллообразования. По мере понижения температуры, согласно теории гетерогенного зародышеобразования в присутствии проникающих криопротекторов, исключается формирование одного зародыша критического размера, т. е. в этих условиях не происходит слияния отдельных мелких кристаллов в один большой, способный разрушить клетку.

По возрастанию пассивирующей активности в интервале температур —35...—55°С криопротекторы располагаются в следующей последовательности: <ДМСО<пропиленгликоль<ПЭО—400<<ПЭО—100<глицерин<этиленгликоль<формамид.

Свойство проникающих криопротекторов (глицерин, 1,2-пропандиол и др.) модифицировать процессы кристаллизации обусловлено их низким молекулярным весом и способностью оказывать коллигативное действие, т. е. свойством снижать криоскопическую температуру замерзания раствора.

Непроникающие криопротекторы типов ПЭГ, ПВП, ГЭК либо сывороточные белки препятствуют внутриклеточной кристаллизации по нескольким путям. Во-первых, они образуют оболочку вок-

руг плазматической мембраны клетки и тем самым способствуют формированию мелкокристаллических форм льда, который не оказывает разрушающего действия на клетку. Реализация этого механизма возможна в результате того, что с началом замораживания концентрация полимерных молекул увеличивается, слой воды между молекулами полимера становится очень тонким и они начинают себя вести как полимеры с небольшой молекулярной массой, это вызывает резкое изменение качества и количества образующего льда. Во-вторых, обладая осмотическими свойствами, они вызывают дегидратацию клеток и их сжатие. Поэтому непроникающие в клетку полимеры оказываются такими же эффективными криопротекторами, как и проникающие соединения, т. е. выступают в роли солевого буфера и пассиваторов гетерогенного зародышеобразования кристаллов льда.

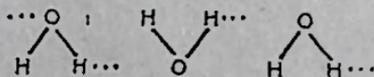
Существенное значение для инициации внутриклеточных кристаллов льда имеют процессы, связанные с формированием гидрофильных каналов в мембране, через которые проникают инициаторы кристаллообразования. Процессы внутриклеточного льдообразования значительно активируются при длительном пребывании клеток в переохлажденном состоянии. Если при этом нарушаются барьерные свойства мембраны и формирующиеся в ней каналы способны пропускать внутрь кристаллизационные затравки, это приводит к быстрой внутриклеточной кристаллизации. Ускорить кристаллизацию вне- и внутри клетки можно с помощью частиц коллоидного серебра, которые встраиваются в мембрану, способствуют проникновению кристаллов внешнего льда внутрь клетки и таким образом снимают опасный уровень переохлаждения. Подобного рода вещества при замораживании смещают температуру начала кристаллизации в область более высоких температур, сокращая при этом латентный период иницирования кристаллизации. Повреждение клеток при внутриклеточной кристаллизации связано не только с механическим давлением растущего кристалла, но и с денатурацией внутриклеточных макромолекул и их дискомплектацией с последующим коллоидно-осмотическим лизисом. Механизм повреждения клеток процессами рекристаллизации будет изложен ниже.

ЗНАЧЕНИЕ ФРАКЦИИ ВОДЫ В ТЕМПЕРАТУРНОЙ СТАБИЛИЗАЦИИ БИОПОЛИМЕРОВ, КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

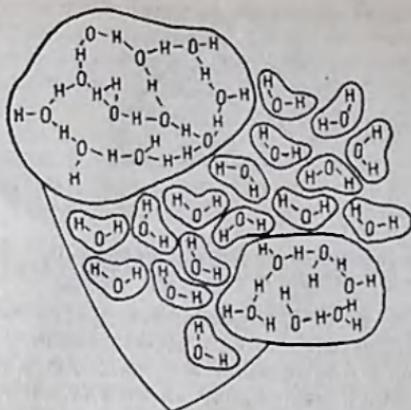
Живые системы содержат 60—80 % жидкой воды, которая играет важнейшую роль в метаболических процессах и стабилизации функциональной активности биополимеров и надмолекулярных структур клеток и тканей. Охлаждение, низкотемпературное воздействие, равно как и различные криопротекторы и соли, сильно изменяют структуру воды, фракции которой участвуют в стабилизации конформационного и пространственного положения биополимеров.

Вода, локализованная в клетке или связанная с поверхностью биомолекулы, сильно отличается своими параметрами от так называемой свободной воды.

Принципиально различают два основных типа моделей свободной воды: смешанную и равномерную. Все остальные модели являются модификациями этих двух. Смешанная модель предполагает существование в водной системе льдоподобных структур, имеющих тетраэдрическую координацию молекул и смешанных со структурами с более плотной упаковкой — мерцающими или текущими кластерами (рис. 4). Равномерная модель предусматривает, что жидкая вода — это смесь однородных молекул. Квантовомеханическая модель воды постулирует существование льдоподобных структур в виде шестичленных колец. Таким образом, жидкая вода представляет сложную структуру, которая усложняется при взаимодействии с биополимерами и мембранами. Однако важным является тот факт, что электронные орбиты молекулы H_2O имеют две донорные и две акцепторные связи (рис. 5). Это позволяет каждой молекуле воды образовать четыре водородные связи с соседними молекулами, т. е. молекулы H_2O весьма реакционноспособны. В жидкой воде водородная связь образуется между атомом водорода одной молекулы воды и атомом O_2 другой молекулы H_2O согласно схеме



Предполагают, что при $0^\circ C$ вода в значительной мере состоит из утроенных молекул — $(H_2O)_3$. Однако она может формировать и более сложные ассоциации, например такие, как на рис. 6. При



Кластеры

Рис. 4. Схема смешанной модели воды (текущие кластеры по Неметн—Шерага)

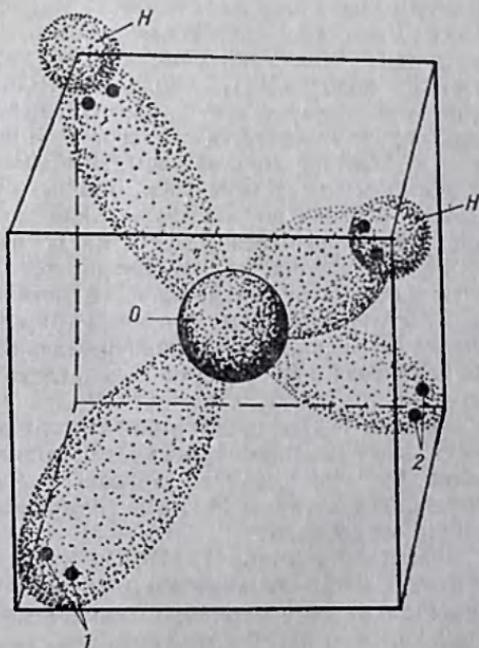


Рис. 5. Строение молекулы воды по методу валентных связей:

1, 2 — неподеленные пары электронов; Н — водородная связь; О — кислородная связь

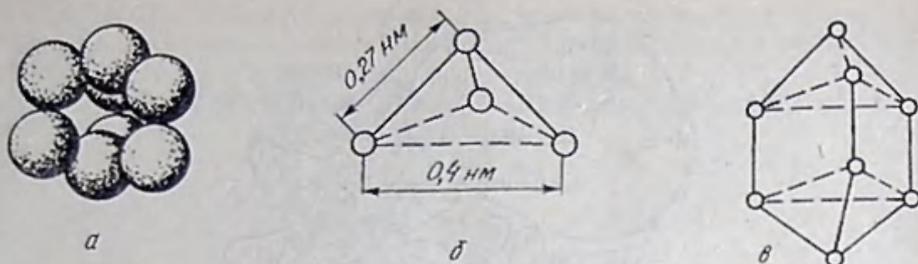


Рис. 6. Молекулярные ассоциаты из восьми молекул H_2O (а), ассоциат типа $(\text{H}_2\text{O})_3$ (б), льдоподобные агрегаты типа $(\text{H}_2\text{O})_8$ (в)

их нагревании от 0 до 4 °C утроенные и другие типы молекулярных ассоциатов H_2O распадаются с образованием удвоенных молекул $\text{H}_2\text{O} - (\text{H}_2\text{O})_2$, которые придают воде более высокую плотность. При дальнейшем нагревании число удвоенных молекул H_2O хотя и снижается, однако полностью не исчезает.

Способность воды формировать удвоенные, утроенные либо другие типы ассоциированных молекул придает всей системе определенную устойчивость к температурным колебаниям.

Свойства воды биополимеров. Вода играет важную роль в стабилизации структуры биополимеров и биомембран, которые можно рассматривать как сложные биодисперсные системы, формирующие большое число извитых, тонких каналов, щелей и карманов, в которых располагаются молекулы H_2O . Из классической физико-химической модели воды следует, что вода, помещенная в тонкие капилляры, очень сильно отличается по своим температурным и другим свойствам от обычной жидкой воды. Например, криоскопическая точка такой воды лежит за пределами 0 °C.

При охлаждении и особенно замораживании свойства воды, поддерживающей в физиологических условиях нативную конформацию биомакромолекул, очень сильно изменяются. Поэтому выяснение роли воды в структурной стабильности (или нестабильности) охлажденных (до 0 °C) или замороженных (ниже 0 °C) клеток важно для понимания механизмов криповреждений, их обратимости в цикле криоконсервации и разработки средств криозащиты.

Важным является тот факт, что подвижность (коэффициент самодиффузии) молекул H_2O в присутствии белков и других биополимеров очень сильно замедляется, поскольку происходит связывание воды и белка. По мере удаления от поверхности биополимеров силы взаимодействия молекул H_2O с активными группировками белков и липидов ослабевают.

По данным различных методов (ЯМР, ДСК), в биообъектах можно условно различать три фракции воды. Первая, находящаяся на отдаленном расстоянии от поверхности биополимеров или компонентов мембран, характеризуется высокой подвижностью молекул H_2O и в научной литературе обозначается как свободная, или объемная. Эта фракция воды является метаболически активной, т. е. при ее участии облегчаются транспорт веществ и метаболитов,

катализ и другие функциональные процессы. Вторая, расположенная ближе к поверхности биополимера, менее подвижная, локализована в гидрофобных карманах либо других извитых каналах, существующих внутри биомолекул и мембран. Эта фракция воды имеет более сложную структуру, чем первая. Считают, что она построена из клатратгидратов или полиморфно-льдообразных систем. Третья фракция воды, составляющая би- или мономолекулярный слой, прочно фиксирована непосредственно на поверхности биомолекул за счет сил сцепления с заряженными группировками белка.

Состояние различных фракций H_2O , расположенных вблизи и в отдалении от поверхности биомолекул, может быть определено по своей вращательной и трансляционной подвижности методом ЯМР высокого разрешения на протонах, а также по температурам замерзания. По мере удаления от поверхности биополимера молекулярная подвижность молекул воды возрастает, равно как и температура кристаллизации. Методы ЯМР и ЭПР-спиновых меток показывают, что в окружности молекул белков существует слой воды толщиной 0,5—0,6 нм, микровязкость которого в 2—3 раза выше, чем свободной фракции воды. Прочность связывания фракций воды с молекулами биополимеров играет важную роль в формировании и поддержании их нативной структуры и функции в живых системах. Одним из важных термодинамических свойств связанной с поверхностью биополимера фракции воды является ее достаточно низкая температура плавления, которая еще более понижается по мере дегидратации. Например, для 20 %, 40 % и 60 %-х растворов коллагена температура денатурации составляет 52, 53 и 84 °С. Следовательно, для денатурации 60 %-го раствора белка необходимо нагреть его концентрированный раствор до более высокой температуры, чем разбавленные растворы, которые плавятся при температуре 40 °С. В концентрированных растворах белков или нуклеиновых кислот процессы плавления биомолекул обратимы в 85—90 % случаев. Поэтому при осуществлении процессов криоконсервирования клеток необходимо стремиться частично их дегидратировать с тем, чтобы сконцентрировать растворы биополимеров во фракции связанной воды, которая имеет достаточно низкую криоскопическую точку.

Считают, что фракции воды, локализованные вблизи поверхности или в замкнутых полостях биополимеров, при замораживании имеют размытую зону кристаллизации, охватывающую температурный диапазон от 0 до -70 и даже -80 °С, а прочно фиксированный би- или мономолекулярный слой H_2O сохраняет подвижность молекул при температурах порядка -120...-130 °С.

Свойства воды биологических мембран. Вода имеет также определяющее значение в поддержании структуры мембран. Мембраносвязанная вода контролирует латеральную диффузию гидратированных полярных групп липидов и белков, а также ионную проницаемость мембраны. В мембране так же, как и в изолированных биополимерах, существует несколько слоев воды, которая имеет

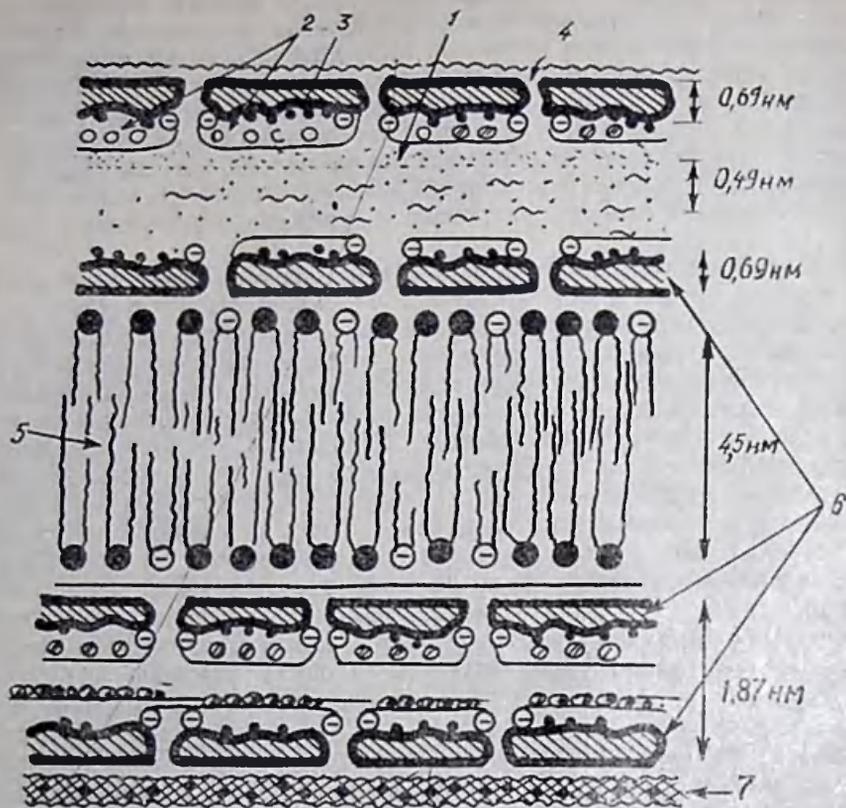


Рис. 7. Схема водных слоев вичинальной воды биомембраны (нм):

1 — свободный (подвижный) слой H_2O , образующий водный канал между белками; 2 — гидратный слой воды; 3 — фиксированный слой воды; 4 — ионные каналы; 5 — липидный бислой; 6 — белки; 7 — примембранный цитоскелетный комплекс

черты, сходные с капиллярной водой (рис. 7). Первый слой представлен относительно свободными молекулами H_2O , ротационная и трансляционная подвижность которой сохраняется в температурном диапазоне от 0 до $-15^{\circ}C$. Второй слой составляют молекулы связанной H_2O , которые замерзают при температурах от -35 до $-50^{\circ}C$. Третий слой — это фракция молекул воды, тесно взаимодействующих с поверхностью биополимеров и входящих в координационные сферы сил притяжения их полярных и неполярных участков. Этот слой воды не замерзает при температурах $-120... -130^{\circ}C$.

Вода, локализованная в мембране, осуществляет разнообразные функции, например стабилизирует макромолекулы, регулирует проницаемость мембраны. Эти слои воды очень чувствительны к сдвигу температуры и в специальной литературе называются примембранными или вичинальными. Для вичинальной воды мембран характерны фазовые изменения, так называемые температурные

аномалии, которые проявляются в различных интервалах температур (14—16 °С, 29—32, 44—46 и 59—62 °С). Считают, что эти изменения связаны с нарушением гидратации биополимеров мембраны и появлением при 28 °С или исчезновением при 32 °С слоев связанной воды на межфазных границах. Отмечено, что при фазовом переходе происходит очень быстрая модификация структуры молекул воды, подобная той, которая осуществляется при появлении и исчезновении мерцающих кластеров.

На структурные переходы молекул вращательной воды оказывают влияние фазовое состояние липидов, и в частности фазовые переходы анионных липидов, которые обнаруживают аномалии своего состояния при тех же температурах, что и молекулы вращательной воды. Структурно-фазовые переходы липидных компонентов мембраны вблизи 15 °С выявлены во многих биообъектах, и проявляются они в изменении активности белковых переносчиков катионов, например Na⁺, K⁺, АТФазы, сахаров, водорастворимых биомолекул и других веществ. В связи с этим Дрост-Хансен считал температуру 15 °С «нижней температурной границей жизни», хотя в реальных условиях жизни эта граница довольно размыта и зависит от природы и эволюции организмов. Температурная граница жизни повышается по мере усложнения организации живых систем, и наоборот. Например, для высших млекопитающих (гомойотермных), включая человека, «граница температурной жизни» колеблется в пределах 28—30 °С, а у пойкилотермных и гибернарующих животных она опускается до 4 °С и несколько ниже.

Указанные выше структурно-фазовые переходы при 15 °С, выявляемые во фракции вращательной воды, изменяют также структурно-функциональные свойства биологических мембран в целом и могут снижать их устойчивость к охлаждению и замораживанию. Имеются доказательства того, что фазовые переходы вращательной воды мембран являются одним из факторов холодового шока клеток. Вращательная вода в очень тонких каналах биомембран представляет собой в основном связанную форму и при замораживании кристаллизуется в довольно размытом интервале температур —1...—15 °С.

Фракция связанной воды, как и в случае биополимеров, играет важную роль в стабилизации структурных компонентов мембраны. По своей природе эта фракция воды представляет собой сильно упакованные системы, имеющие достаточно прочные связи с поверхностью биополимеров мембраны. Эти слои воды контролируют латеральную диффузию гидратированных полярных групп фосфолипидов и белков. Количество молекул воды, гидратирующей липиды, зависит от природы и ориентации полярных головок липидов и насыщенности жирнокислотных цепей. Усиление или ослабление протонирования липидов и белков влияет на потенциал поверхности мембраны. Связанная фракция воды контролирует ионную проницаемость мембран и, очевидно, рецепторные функции мембраны, так как влияет на конформационное состояние белков (например, аденилатциклазы). В обычных условиях с головкой лецитина свя-

зывается до 20 молекул H_2O , при температуре $-7^\circ C$ их становится 10, а при $-25^\circ C$ — всего лишь 6,0 молекул H_2O на каждую молекулу липида, т. е. при замораживании системы идет прогрессирующее уменьшение фракции H_2O , связанной с биополимером. Фракция связанной воды в мембранах сохраняет свою подвижность при температурах порядка $-35...-50^\circ C$. При удалении замораживанием более 20—30 % воды из мембран наступает гомогенизация липидного бислоя, формирование в нем долгоживущих сепарированных кластеров и выталкивание белков из липидной фазы.

От характера гидратации липидов мембран зависит температура их фазовых переходов. Если фосфолипиды мембран содержат много двойных связей, то степень их гидратации выше, а температура фазового перехода смещается в область отрицательных температур. Например, фазовый переход днolenлфосфатидилхолина, имеющего больше двойных связей, чем фосфатидилхолин, происходит при температуре $-20^\circ C$, в то время как молекул насыщенного фосфатидилхолина — при $5-0^\circ C$. На степень гидратации фосфолипидов мембран существенное влияние оказывает холестерин.

Необычные свойства воды, локализованной в мембранных структурах клетки, во многом связаны с тем, что поверхности раздела фаз в мембране неоднородны и присутствующие в них молекулы взаимодействуют с помощью водородных связей как с полярными, так и с неполярными поверхностными группами белков, липидов и их комплексов, имеющих весьма сложную пространственную конфигурацию типа капиллярных структур. При взаимодействии неполярных поверхностных групп образуется более жесткая водная структура, подобная кристаллогидратам. Такие взаимодействия в разветвленных сетях приводят к образованию такой же трехмерной водной структуры, которая обнаружена при исследовании гидратации белков.

Свойства воды клеток и тканей. Свойства воды клеток и тканей практически не отличаются от свойств и состояния воды, локализованной в биополимерах и мембранах, т. е. в клетках содержится свободная, связанная и фиксированная фракции воды. Вода, которая в клетках выступает в роли растворителя или среды для переноса веществ (ионов, метаболитов), регулирует интенсивность метаболических и физиологических процессов, в то время как другие фракции воды участвуют в поддержании структурной устойчивости биомакромолекул и мембранных комплексов. По данным разных методов, количество свободной воды в клетках гораздо выше (до 80 %), чем связанной (около 40 %). Содержание метаболически активной фракции свободной воды в клетках сильно варьирует. Так, если в мышечных клетках ее содержание колеблется от 25 до 41 % общего объема клеток, то в ооцитах и сперме морского ежа ее содержится не более 8—33 %, в фибробластах эмбриона цыпленка — 22, седалищном нерве лягушки — 70 %. Остальную массу воды этих объектов составляют фракции связанной воды, которые играют важную роль в стабилизации и функ-

циональной интеграции внутриклеточных макромолекул и мембранных структур, а также в процессах диффузии веществ через мембрану. Для изучения состояния фракции воды и проницаемости мембран для воды в зависимости от температуры и ионной силы среды обычно используют методы биофизического и биохимического анализа (ЯМР — высокого разрешения, ЭПР-спин-метки и зонды, ДСК, изотопная техника).

В нативных клетках и тканях присутствуют фракции воды, которые не кристаллизуются при очень низких температурах. Так, при замораживании мышц лягушки ниже -70°C замерзает только 80% имеющейся воды, остальная, сохраняющая подвижность вплоть до $-80\text{...}-90^{\circ}\text{C}$, представляет собой фракцию, прочно связанную с белками. При воздействии низких температур вода живых систем кристаллизуется по-разному. Одни фракции воды образуют крупные кристаллы льда, имеющие гексагональную молекулярную структуру, другие — становятся аморфными. Если замораживание проводят в присутствии глицерина, сахаров, этиленгликолей и других низкомолекулярных криопротекторов, то формируются аморфные так называемые витрифицированные структуры, которые не так губительны для клеток в цикле замораживания — отогрева.

Здесь уместно подчеркнуть, что вода при комнатной температуре представляет собой смесь двух структурных форм: плотноупакованных и льдоподобных молекул H_2O . С понижением температуры доля льдоподобной воды в системе увеличивается, и при температурах $\sim 4^{\circ}\text{C}$ она состоит в основном из так называемой квазикристаллической льдоподобной структуры, которая может изменять метаболизм клетки.

Поэтому температуры в пределах 4°C считают граничными в активной и пассивной жизнедеятельности клеток. В этом температурном диапазоне у холодоустойчивых организмов происходит смена одних форм белка другими — так называемыми криобелками. Сейчас уже известно, что при холодовой адаптации биообъектов в клетках происходит накопление водорастворимых белков и увеличивается их гетерогенность. Так, например, в пероксидазе хрена с похолоданием увеличивается число молекулярных субъединиц, а в составе клеток, входящих в стадию закаливания растений, появляются криобелки, в том числе и криоферменты, поддерживающие функциональную активность клеток при низких температурах. При температурах ниже 4°C такие важные процессы, как водообмен, дыхание, рост, развитие и размножение, сильно подавляются, поскольку при этом определенная доля молекул H_2O трансформируется в льдоподобную структуру, претерпевая при этом аномалии, хорошо выявляемые на кривых Аррениуса (табл. 2). Поэтому в большинстве случаев активная жизнь при таких температурах невозможна, и организмы на физиологическом уровне переходят в состояние покоя, хотя на молекулярно-клеточном уровне у адаптированных к холоду животных поддерживается некоторый уровень метаболической активности, обеспечивающий им выживаемость

Таблица 2. Характер физиолого-биологических процессов у организмов в температурном диапазоне 4—0 °С

Выше 4 °С	ниже 4 °С
Развитие и размножение	Покой у растений, закалывание холодоустойчивых растений, гибернация, диапауза у животных
Рост	Полная остановка ростовых процессов
Фотосинтез, дыхание	Ингибирование фотосинтеза и дыхания
Водообмен	Выключение метаболической функции воды
Процессы синтеза	Прекращение синтеза нуклеиновых кислот, белков, других биополимеров и их комплексов

при температурах 0—4 °С. Эти процессы, протекающие в условиях льдоподобной, кристаллической воды, можно рассматривать как протокриобиологические, т. е. как начальные стадии криобиологических состояний у организмов (И. Н. Угаров, 1988).

В реальных условиях естественного или искусственного замораживания клеток или тканей во внеклеточной среде повышается концентрация солей, а в цитоплазме — белков, которые сильно изменяют структуру воды. В результате этого в таких условиях изменяются барьерные свойства мембран для ионов, и прежде всего для K^+ .

При воздействии низких температур вода клеток и тканей по времени и по характеру кристаллизуется неодинаково, поскольку часть воды связана, а часть — прочно фиксирована физико-химическими связями к поверхности реакционноспособных групп биомакромолекул. Гидрофильные биополимеры, входящие в состав клеток, характеризуются тем, что способны удерживать в своем составе и ближайшем микроокружении определенное количество связанной и фиксированной воды, которая не замерзает при довольно низких температурах (—80...—130 °С). Считают, что эти фракции воды состоят из так называемых гидратационных, т. е. особо плотноупакованных молекул, которые характеризуются низкой криоскопической точкой. Очевидно, в связи с различиями в физико-химическом состоянии фракций воды в клетке форма кристаллов льда, образованного в клетке, отличается от формы льда, сформированного вне ее.

Существенно то, что вода, локализованная внутри клетки, может переохлаждаться до весьма низких температур. Так, вода мышечных волокон легко переохлаждается до —10 °С, если не соприкасается с кристаллами льда. Однако в случае контакта с льдинками она кристаллизуется уже при —2 °С. Аналогичные фракции воды обнаружены в клетках растений, мышечных волокнах крысы (~20 %), лягушки (~7—12 %), а также трески, которая может переохлаждаться до отрицательных температур. Как видно из приведенных ниже данных, в геле желатины вода в жидком состоянии обнаруживается при —78,5 °С, в то время как при тех же температурах в мышечной ткани она не выявляется, т. е. в условиях низких температур фракция свободной воды мышечных волокон элиминирует из клеток уже при температурах порядка —35...—40 °С.

Температура, °С	Гель желатин, %	Мышечная ткань, %
-2,5	—	36,5
-5,0	18,0	24,4
-10,0	14,5	16,3
-20,0	11,7	10,6
-40,0	10,4	—
-60,0	8,2	—
-78,5	7,6	—

Очевидно, в клетках при воздействии низкой температуры вода может существовать в трех состояниях: переохлажденном, льдоподобном и аморфном, в каждом из которых она кристаллизуется по-разному.

Фракции фиксированной воды в клетке, очевидно, не замерзают при -70°C и даже -130°C , поскольку при этих температурах методом ЯМР еще определяется подвижность молекул H_2O . Такая низкая точка замерзания этой фракции воды связана с ее способностью концентрировать большое число растворенных веществ, в том числе ионов, в результате чего формируется высоковязкая белково-минеральная смесь в локализованных белковых компонентах цитоплазмы и мембранных структурах клетки. Существование в клетке фракции связанной воды может рассматриваться как своеобразный барьер, противостоящий повреждающему действию концентрированных растворов солей на биополимеры клетки в процессе вымораживания свободной воды.

Существование такого механизма может обеспечивать устойчивость клеток к воздействию не только температуры, но и, возможно, других экстремальных факторов (радиация, яды). Вероятно, причиной устойчивости некоторых высушенных форм бактерий к воздействию абсолютного спирта и других неводных растворителей является именно высокое содержание в них прочно связанных форм очень вязкой воды.

Поэтому частичная дегидратация клеток перед их глубоким замораживанием имеет важное значение в их защите от летального действия «эффекта раствора» и внутриклеточных кристаллов льда. Более того, кристаллизация такой вязкой фракции воды будет протекать с формированием аморфных структур льда, которые не способны повреждать структуры клеток, как это происходит в случае роста внутри клетки крупных гексагональных форм льда. Следовательно, если клетка перед замораживанием частично дегидратирована, то связанная вода кристаллизуется по механизму витрификации, особенно если в среде присутствуют такие проникающие криопротекторы, как ДМСО, глицерин, 1,2-пропандиол либо их смеси. Такие переходы внутриклеточной воды в стеклообразное состояние достаточно четко регистрируются с помощью ЯМР, ДТА и ЭПР-спин-меток и зондов.

Роль различных фракций воды хорошо проявляется при осуществлении сублимационной сушки клеток и тканей. Когда при отрицательных температурах удаляют кристаллики льда, образованные в результате замораживания объемной воды, какая-то доля связан-

ной воды также удаляется. В этом случае необходимо выбрать режим сушки, при котором остаточная влажность снижается не более чем на 1—2 %.

Вода играет решающую роль в сохранении жизнеспособности и метаболической активности различных видов бактерий, грибов, прокариотов, пойкилотермных животных и различных растений, которые в процессе эволюции выработали генетически детерминированные механизмы, регулирующие определенным образом их водный режим и препятствующие зарождению и развитию процессов внутриклеточной кристаллизации.

СТРУКТУРА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА ЛЬДОВ

Замораживание воды биологических систем или растворов, которые применяются для криоконсервации биообъектов, сопровождается формированием вне- или внутриклеточных кристаллов льда. Лед — это твердая фаза любой разновидности воды независимо от ее строения. Значение кристаллов льда в механизмах криоповреждений макромолекул, клеток и тканей прежде всего определяется тем, что кристаллический лед формирует самые разнообразные полиморфные модификации, имеющие различное строение пространственной решетки, которое неодинаково влияет на структурно-функциональное состояние биологической системы в процессе криоконсервации. Например, в случае формирования гексагональных кристаллов льда возникают сильные механические напряжения в системе, которые могут оказывать повреждающее действие, особенно на биообъекты, морфологическая архитектура которых отличается высокой плотностью (ткани, крупные органы). При добавлении в среду консервации криопротекторов или криоконсервантов характер кристаллизации резко меняется — формируются менее травматичные аморфные или другие разновидности мелкозернистых кристаллов льда. При формировании и росте кристаллов льда в клетке возникают условия, при которых механическое давление льда может разрушить клетку. Важным свойством льдов является то, что они, обладая молекулярной подвижностью, упругостью, адгезивными свойствами, могут оказывать отрицательное действие на замораживаемые или отогреваемые биообъекты.

Молекулярная структура льдов и их свойства. Вода формирует большее число модификаций твердых фаз по сравнению с другими известными нам веществами. На фазовой диаграмме линии ограничивают области состояний «температура — давление», в которых устойчивой является та или иная модификация льда (рис. 8). В обычных условиях давления наиболее стабильной является фаза льда — I_h . В тех же условиях может существовать и другая, метастабильная по отношению к первой, фаза льда — I_C , подобная фазе I_h , но кубической, а не гексагональной структуры. При повышенных давлениях лед имеет девять кристаллических модификаций, области существования которых показаны на фазовой диаграмме льда (см. рис. 8). Кроме того, существует так называемая аморфная (или витрифицированная) фаза льда, которая образует-

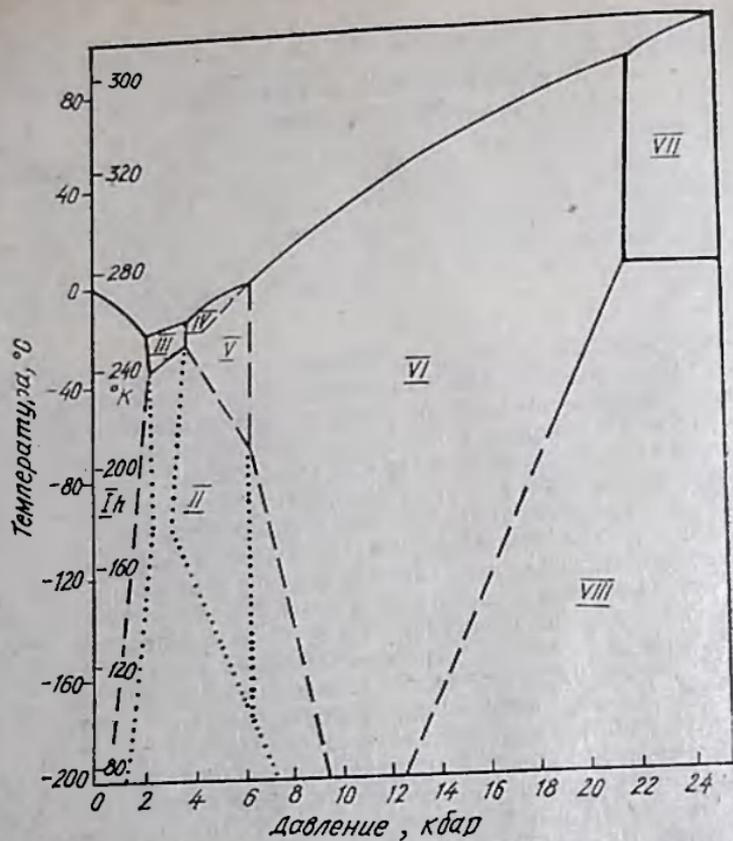


Рис. 8. Фазовая диаграмма воды:
I-VIII — модификация льда

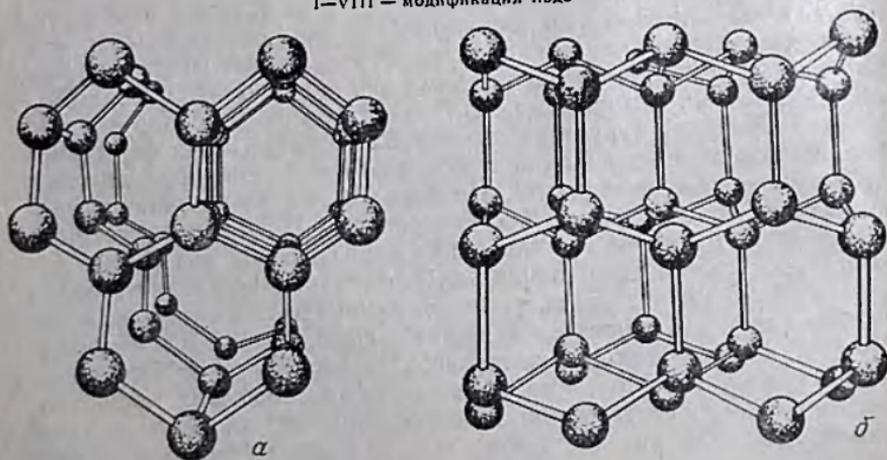


Рис. 9. Расположение атомов кислорода (б) в гексагональной структуре льда I_h (а)

ся при медленной конденсации водяного пара при температуре жидкого азота. Существует также большое число других фаз, известных как клатратные гидраты, имеющие рыхлую и сложную структуру, заполненную молекулами инертных газов.

Одна из наиболее распространенных форм льда — лед Ih — является кристаллической и существует в диапазоне от 0 до -70°C (рис. 9). Лед II формируется при температурах ниже -70°C (рис. 10), и остальные шесть форм (лед III, VIII) могут быть получены только в условиях повышенного давления (рис. 11, 12).

Каждая молекула H_2O во льду может принимать шесть возможных ориентации, поэтому практически во льду существуют большие возможности модификации положений атомов H^+ . Молекулы воды при замерзании в лед практически остаются упорядоченными примерно до температуры $-45...-50^{\circ}\text{C}$. По данным диффракции нейтронов, в области $-50...-150^{\circ}\text{C}$ структура льда Ih становится неупорядоченной, т. е. в этой области возможны молекулярные сдвиги, характерные для процессов рекристаллизации. Поскольку лед Ih обладает высокой диэлектрической константой, то в диапазоне указанных выше температур конфигурация льда может непрерывно меняться. При ультранизких температурах порядка -196°C и ниже кристаллы льда Ih характеризуются высокой стабильностью и могут кристаллизоваться как в упорядоченном, так и разупорядоченном состоянии. Поскольку неупорядоченная структура имеет более высокую кинетическую энергию, при ее плавлении в кристалле возникают механические напряжения, сопровождающиеся изменением его объема и формы.

Все виды проявлений разрушения биообъектов прямо или косвенно связаны с образованием льда. Если кристаллы льда образуются вне клетки, то ее повреждение будет осуществляться главным образом «эффектом растворов», а при образовании кристаллов внутри клетки наступает механический разрыв плазматической мембраны из-за нарастающего давления в результате их роста.

Вода при замораживании способна формировать различные кристаллические фазы, структурные и физические особенности которых зависят от температуры, уровня внешнего давления, наличия примесей.

Физико-химические свойства льда. Физико-химические свойства льда зависят от скорости формирования кристаллов, уровня температуры и присутствия различных примесей. В зависимости от этих факторов лед может вести себя как упругое, пластичное или хрупкое тело.

Понижение температуры и давления очень сильно влияет на упругие свойства льда. Например, при давлении 2000 атм при температуре -20°C лед Ih находится в жидком состоянии. При снижении температуры прочностные и особенно пластические свойства льда Ih резко снижаются.

На поверхности льда располагается квазижидкая, электрически активная пленка, которая играет большую роль в подвижности

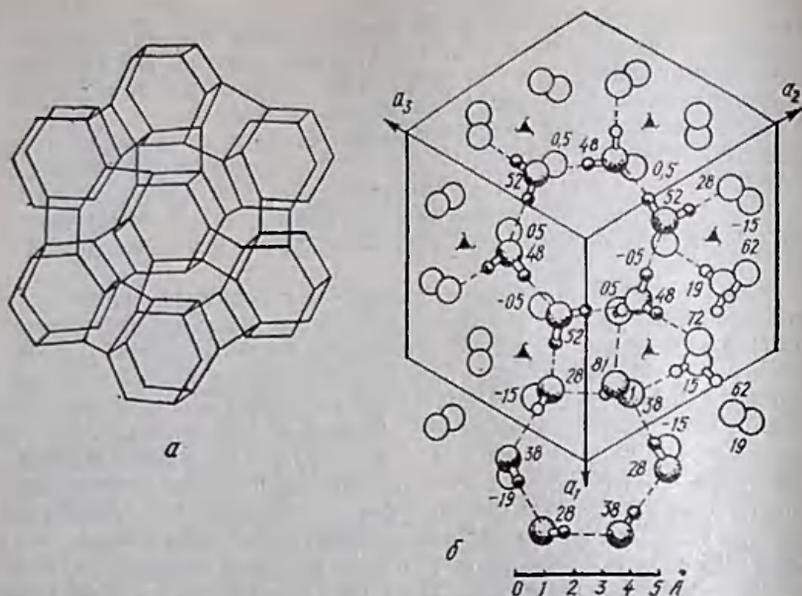


Рис. 10. Топология водородных связей (а) и пространственно-кристаллографическая (б) структура льда

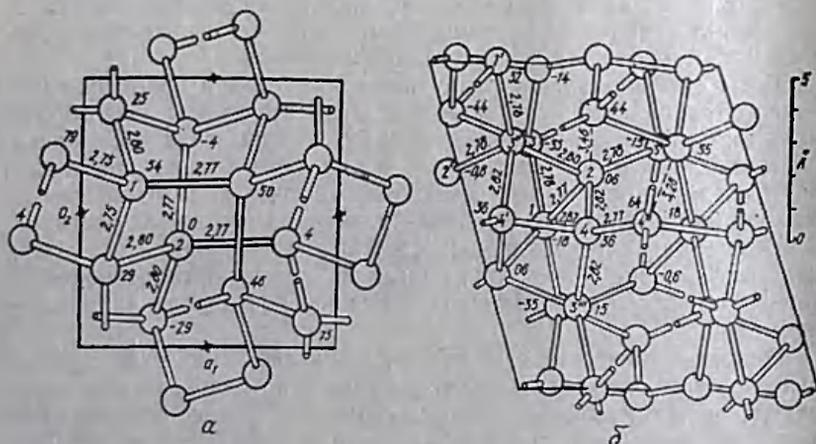


Рис. 11. Схема кристаллографической структуры единичной ячейки льда III (а) и V (б)

кристаллов льда относительно друг друга, т. е. кристаллы льда можно рассматривать как совокупность плотно прилегающих друг к другу тонких пластинок, которые сравнительно слабо сцеплены между собой по так называемым плоскостям ослабления. Существование квазижидкой и закристаллизованной воды в кристалле

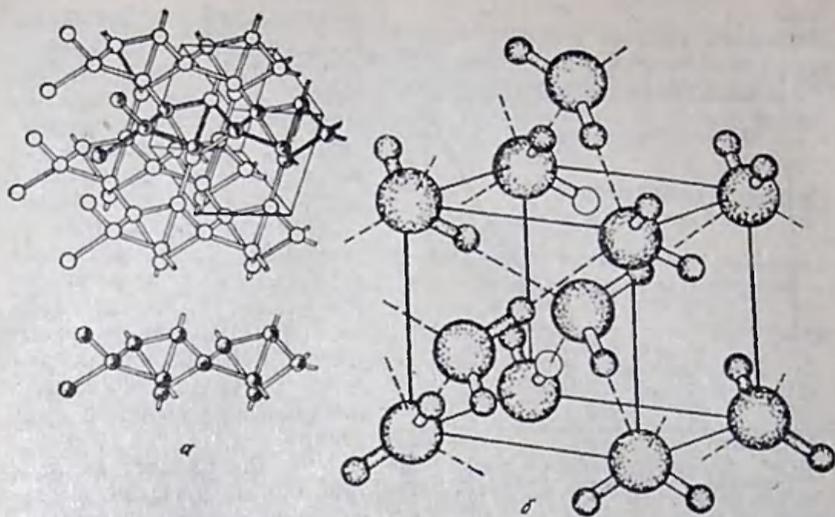


Рис. 12. Схема кристаллографической структуры льда VI (а) и VII—VIII (б)

толщиной несколько сотен или десятков молекул с непрерывно изменяющимися свойствами играет важную роль в механизме молекулярной подвижности кристаллов льда при изменении температуры. Квазижидкий слой на поверхности кристалла льда имеет толщину порядка 10^{-6} — 10^{-5} см и сохраняется при температурах -25°C , если замораживание проводить в насыщенной водяными парами атмосфере. При температурах -40 и -80°C этот слой в кристаллах исчезает, а затем вновь появляется. Даже при температурах -130°C определяется движение молекул по поверхности кристаллов льда, причем слой квазижидкой воды при -11°C имеет толщину $0,1$ м, а величину электропроводности — на порядок выше, чем остальная масса льда. В биологических системах, в которых преобладают поверхностные свойства (замораживание в капиллярах, пористых системах, тонких пленках), кристаллы льда всегда содержат квазижидкий слой, в котором молекулы H_2O находятся в сильно ориентированном по заряду состоянии.

Проявление упругих, пластических и хрупких свойств льда во многом связано с существованием либо исчезновением слоя квазижидкой среды на поверхности. Лед Ih по своей структуре представляет молекулярный кристалл, состоящий из молекул, имеющих более слабые межмолекулярные связи, чем внутримолекулярные.

В структуре такого льда, кроме молекул H_2O , содержатся ионизированные молекулы, определяющие его электропроводность. Указанные выше электрически активные молекулы образуются в результате диссоциации H_2O на ионы и перехода (рекомбинации) протонов от одной молекулы H_2O к другой с образованием H_3O^{++} + OH^- . Монокристаллы льда Ih обладают определенным объемом

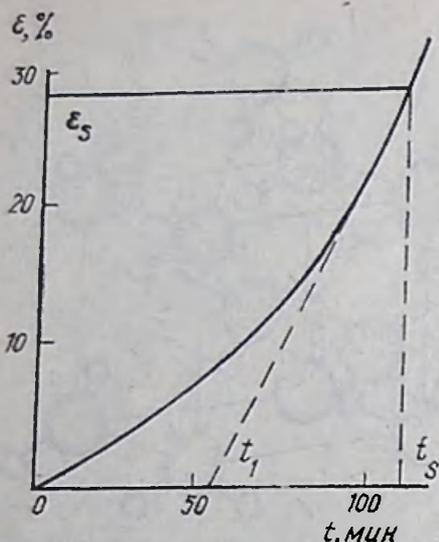


Рис. 13. Динамика относительного растяжения кристалла льда под действием постоянной силы в зависимости от времени воздействия

пластической деформации, т. е. способностью к растяжению под действием приложенной силы (рис. 13). Вначале относительное растяжение нарастает медленно, а затем в определенной точке скорости нарастания деформации становится постоянным. Если кристаллы льда содержат примеси, то это уменьшает максимально возможные значения деформации, т. е. примеси ослабляют упругоэластические и механические свойства кристалла.

Лед II обладает диэлектрическими свойствами, физический смысл которых состоит в том, что в кристалле происходят процессы смещения вектора электрической индукции по фазе относительно вектора напряженности.

Это связано с тем, что в диэлектриках с ориентационной поляризуемостью электрические явления осуществляются с конечным временем релаксации, которое зависит от энергии активации и температуры. Электропроводность кристаллов льда II определяется двумя факторами: подвижностью зарядов и их числом. Она равна $1,0 \cdot 10^{-9} \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при температуре -10°C и изменяется в зависимости от температуры по закону Аррениуса. Зарядовые характеристики и электропроводность в кристалле льда II обусловлены в основном ионными молекулами, подвижность которых достигает $2 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{в} \cdot \text{с}^{-1}$ или $7,5 \cdot 10^{-2} \text{ см}^2/\text{в} \cdot \text{с}^{-1}$ при -10°C . В диапазоне от $0 \dots -20^\circ \text{C}$ проводимость льда возрастает, поскольку при этих температурах его поверхность еще покрыта слоем квазижидкой H_2O , которая определяет поверхностные свойства кристалла. При более низких температурах проводимость поверхности кристалла снижается и приближается к величинам объемной проводимости.

Таким образом, механизм электропроводности льда II тесно связан с реакциями диссоциации молекул воды на ионы и их подвижностью. Подвижность заряженных ионов во льду II значительно выше, чем значения подвижности одновалентных ионов в растворе при обычных температурах. Имеется другое мнение, которое основывается на том, что константа диссоциации молекул воды во льду II в три раза ниже, чем это предполагали, а подвижность носителей зарядов не превышает $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2/\text{в} \cdot \text{с}^{-1}$. С уменьшением

температуры подвижность носителей зарядов во льду несколько возрастает, а подвижность чистых ионов H_2O в кристалле льда очень низкая. Высокая транслокация заряженных ионов в кристалле льда при отрицательной энергии активации этого процесса свидетельствует в пользу того, что во льду существует особый механизм передвижения ионов H_2O .

Природа движения H^+ , H_3O^+ и OH^- по решетке водородных связей в кристаллах гексагонального льда может носить характер

туннелирования до тех пор, пока они не рекомбинируют. При использовании меченых маркеров D_2O и $^{18}H_2O$ установлено, что коэффициент самодиффузии радиоактивных меток при температуре $-1^\circ C$ одинаков, что может быть только в случае диффундирования не отдельных ионов, а целых молекул. Поэтому в кристаллах льда, кроме перемещения ионов и молекул по кристаллической

решетке, существует перемещение их по каналам кристаллической структуры. В каналах гексагонального льда возможно перемещение веществ, радиус которых не превышает $0,12$ нМ. Поскольку радиус $H_3O^+ \sim 1,0-1,1$ А, а H^+ несколько меньше, то они могут совершать перемещения по каналам со скоростью $\sim 2 \cdot 10^{-9}$ с. При этом различные ионы обладают разными коэффициентами диффузии внутри кристалла (табл. 3).

В процессе роста кристалла льда на его поверхности собираются ионы, которые по мере увеличения размера кристалла вытесняются в жидкую фазу. Если скорость роста кристалла очень низкая ($\sim 10^{-4}$ см/с), между твердой и жидкой фазами возникают значительные разности потенциалов. Например, в случае замораживания 10^{-7} М раствора $NaCl$ разность потенциалов составляет ~ 100 В. Это так называемый кинетический эффект Воркмана—Рейнольдса. Если концентрация примесей в воде не превышает 10^{-3} М, лед поляризуется положительно. В процессе роста кристалла происходит уменьшение в нем активных ионов H_3O^+ и OH^- , поскольку их содержание во льду на три порядка ниже, чем в жидкой фазе. В связи с этим на границе раздела фаз возникает градиент концентраций ионов, подвижность которых в кристалле и жидкой фазе различна. Методом ЯМР обнаружено, что коэффициент диффузии ионов в кристалле льда при температуре $-10^\circ C$ довольно высок и достигает $10^{-6}-10^{-7}$ см²/с, т. е. на четыре порядка выше, чем молекул воды. Представляет интерес тот пока необъяснимый факт, что

Таблица 3. Подвижность заряженных ионов (носителей зарядов) в растворе и кристалле льда Ih

Природа заряженной частицы и ее микро-окружение	Скорость движения, см ² ·с ⁻¹
В воде	
Na ⁺	$3 \cdot 10^{-4}$
F	$3 \cdot 10^{-3}$
В кристалле льда	
Ih Na ⁺	$1,6 \cdot 10^{-5}$
Ih F	$2,5 \cdot 10^{-3}$

Таблица 4. Структурные характеристики различных типов льда

Тип льда	Плотность при 1 атм и температуре -175°C , г/см ³	Характер кристаллической решетки
I	0,94	Гексагональная
II	1,17	Ромбодрическая
III	1,14	Тетрагональная
V	1,23	Моноклиная
VI	1,31	Тетрагональная
VII	1,43	Кубическая
VIII	1,50	»
IX	—	Тетрагональная

коэффициент диффузии ионов в кристалле в перпендикулярном направлении на 20 % выше, чем в продольном направлении.

Различные льды отличаются своей плотностью и формой кристаллов (табл. 4). Переходы льда Ih в другие виды при изменении величины внешнего давления обусловлены тем, что внешнее давление нарушает равновесие сил водородсвязанной системы, в результате чего изменяются длина и углы водородных связей: водородные связи изгибаются и средние значения углов O—H—O отличаются от 180°. При этом происходит как бы взаимопроникновение двух независимых водородсвязанных структур друг в друга. Такая перестройка под влиянием внешнего давления приводит к ослаблению водородных связей и уплотнению структуры льдов III—V—VI и VII. Льды типов II—VIII и IX отличаются тем, что расстояние в кристалле между неводородсвязанными молекулами меньше, чем между водородсвязанными.

Хотя с понижением температуры возрастают плотность и теплопроводность льда, однако при этом уменьшаются теплоемкость и коэффициент его объемного расширения. Пластичность льда хорошо сохраняется при температурах вблизи 0°C. При понижении температуры от 0 до -20°C вязкость льда увеличивается почти линейно, около -30°C сопротивление раздавливанию возрастает в два раза, и при дальнейшем понижении температуры прочность льда продолжает возрастать. Снижение температуры плавления льда при повышении внешнего давления определяется уравнением

$$\frac{dT}{dP} = \frac{\Delta V}{L}$$

где T — абсолютная температура; P — давление; A — термический эквивалент работы; L — скрытая теплота превращения.

При температуре 0°C $\frac{dT}{dP} = 0,00752^{\circ}\text{C}/\text{атм}$. Повышение давления до 2 кбар и выше снижает температуру плавления до -22°C с образованием полиморфной разновидности льда III, а при более высоких давлениях формируются другие разновидности льда, которые оказываются по величинам ΔV плотнее жидкости.

Витрифицированный (аморфный) вид льда может быть получен при медленной конденсации паров воды на металлической поверх-

ности либо при очень быстром (~ 2000 °C/мин) замораживании тонкого слоя воды или раствора. При этом аморфный лед, полученный конденсацией паров воды, проявляет аномальные свойства теплоемкости при температурах порядка $-138\text{...}-143$ °C, где выявляется стеклопереход, отсутствующий в системе гексагонального льда. Если температуру поднимать, то можно выявить выраженный экзотермический эффект, связанный с процессом кристаллизации. Это свидетельствует о том, что конденсированная аморфная вода существует в стекловидном состоянии при температурах ниже -138 °C.

Кубический лед имеет аномальные показатели теплоемкости между -113 и -63 °C, т. е. в этом диапазоне температур он переходит в гексагональный, поскольку энергия его кристаллической решетки более устойчива, чем кубического льда. Стекловидное состояние льда идентифицируют с некристаллическим или аморфным, и оно отличается от других состояний льда главным образом тем, что в нем невозможно достичь термодинамического равновесия. Выявляемый стеклопереход свидетельствует о том, что между стекловидным и переохлажденным жидким состояниями имеется существенная связь.

Переход льдов II, V и IX в кубический лед IC происходит при температуре -107 °C. Видно, что возникшие в биосистемах кристаллы льда характеризуются определенной динамикой, в которой важную роль играют такие факторы, как молекулярная подвижность отдельных его кристаллов относительно друг друга, способность поляризоваться и формировать различные структуры кристаллов в зависимости от температуры, давления и особенно экзогенных примесей. Эти свойства льда при понижении температуры могут отрицательно влиять на замораживаемые биосистемы путем реализации эффекта рекристаллизации, создания достаточно сильных электромагнитных полей или форм напряженных кристаллов, обладающих большой кинетической энергией.

Глава 5

ЗАМОРАЖИВАНИЕ БИООБЪЕКТОВ: МЕХАНИЗМЫ И ДИНАМИКА ПРОЦЕССОВ КРИСТАЛЛООБРАЗОВАНИЯ

Замораживание любого биообъекта осуществляется с помощью низких температур, под которыми следует понимать интервал температур от 0 до -273°C . Замораживание — это процесс фазового перехода, связанный с образованием льда в биообъекте, т. е. процесс затвердевания жидкости. Он может быть условно разделен на два основных вида: затвердевание, при котором молекулы H_2O располагаются упорядоченно, т. е. формируются типичные кристаллы льда, и затвердевание, при котором молекулы H_2O располагаются разупорядоченно, в результате чего происходит аморфизация. Существуют и другие формы процесса затвердевания, при котором наряду с типичными кристаллами могут существовать, например, кубический лед, быстро исчезающие сферулиты и т. д.

Механизмы кристаллизации

Образование кристаллов льда в водном растворе, как и в других растворах, происходит в результате тепловых флуктуаций. При охлаждении жидкости процесс кристаллизации начинается при наличии в среде зародышей кристаллов. Зародыши кристаллов могут появиться в результате спонтанной агрегации молекул воды или агрегации их при участии твердых примесей, например белков, метаболитов и т. д. В первом случае зародышеобразование называется гомогенным, во втором — гетерогенным. Таким образом, при гетерогенном зародышеобразовании центрами могут служить подходящие твердые примеси, при гомогенном — случайно возникшие молекулярные ассоциации. Непременным условием возникновения зародышей кристаллов является достижение системой определенного уровня переохлаждения. Это необходимо в связи с тем, что переход системы из переохлажденного (метастабильного) жидкого состояния в стабильное кристаллическое требует дополнительной затраты энергии на создание свободной энергии, что выражается уравнением

$$\Delta G = -\Delta G_V + \Delta G_S,$$

где ΔG — изменение свободной энергии системы при снижении температуры от точки плавления до заданной; ΔG_V — изменение объемной составляющей свободной энергии; ΔG_S — изменение поверхностной составляющей свободной энергии.

Механизмы гомогенного зародышеобразования при понижении температуры тесно связаны с упорядоченностью и повышенном числе водородных межмолекулярных связей в замораживаемой системе.

В случае роста зародышей размером меньше критического радиуса происходит возрастание свободной энергии, поэтому их рост энергетически затруднен. Напротив, зародыши размером больше критического радиуса могут расти, так как это сопряжено с уменьшением свободной энергии. Критический радиус является функцией переохлаждения, причем чем больше переохлаждение, тем меньше становится критический радиус (рис. 14). Скорость образования центров кристаллизации зависит от вероятности образования способных к росту зародышей, подвижности молекул H_2O и степени переохлаждения, которая имеет температурный максимум для того или иного раствора. Если в жидкость не будут привнесены посторонние инициаторы зародышеобразования, то чистая вода в капиллярах не замерзает при $-33^\circ C$, а в более мелких капельках — при $-40^\circ C$ и, возможно, -50 или даже $-72^\circ C$. Температура $-72^\circ C$ является границей возможного переохлаждения чистой воды в метастабильном состоянии.

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

Скорость роста и структура формирующихся кристаллов льда в биологических системах зависят от числа зародышевых центров, скорости охлаждения и конечной температуры замораживания.

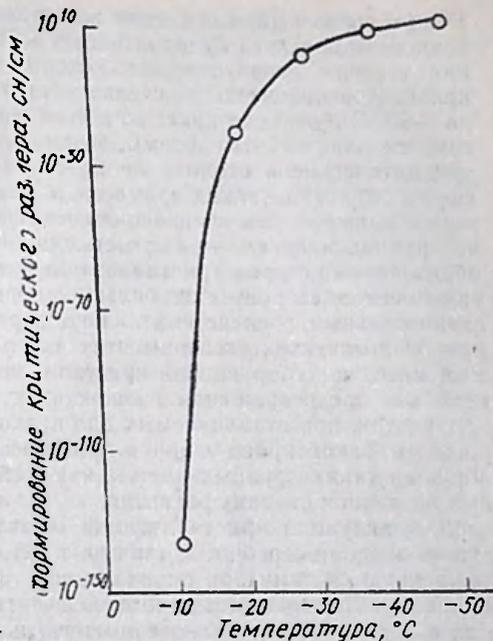


Рис. 14. Зависимость формирования центров кристаллизации льда от степени переохлаждения чистой воды (механизм гомогенного зародышеобразования)

Если степень переохлаждения жидкости низкая, то скорость образования зародышей будет небольшая. Наоборот, по мере возрастания степени переохлаждения скорость образования зародышей кристаллов значительно увеличивается. При температурах от 0 до -20°C при росте кристалла льда формируются, главным образом, его пластинчатые формы, а при более низких температурах — призматические и столбчатые кристаллы. Рост кристаллов такой формы зависит от таких примесей, как газогидраты и соли. Растворимые примеси, увеличивающие поверхностную энергию активации на границе кристалл — жидкость, как правило, тормозят процесс образования центров кристаллизации и смещают границу метастабильности в сторону еще больших переохлаждений. Для снятия отрицательных последствий сильно переохлажденной жидкости в криобиологических экспериментах часто используют так называемый метод индуцированной кристаллизации. Этот метод используется для предотвращения повреждения не полностью обезвоженных клеток, подготавливаемых для низкотемпературного консервирования. Такой прием широко применяют, например, при замораживании таких крупных клеток, как эмбрионы человека и животных на ранних стадиях развития.

Для индукции кристаллизации обычно используют различные затравки (соли серебра, льдинки и т. д.), которые вносят в переохлажденную систему при определенной температуре перед замораживанием. В результате такого воздействия система кристаллизуется с образованием мелкозернистого льда, который не оказывает столь повреждающего действия на биообъекты, как гексагональные формы льда. Примеси, уменьшающие поверхностную энергию активации, способствуют зародышеобразованию. Ионы в качестве центров кристаллизации малоэффективны, так как, согласно теории гидратации, способны разрушать льдоподобную структуру воды и при замерзании вытесняются фронтом кристаллизации в жидкую фазу. Поэтому чаще центрами кристаллизации являются гетероморфные низкомолекулярные примеси, например пептиды.

В жидкой части клеток локализовано множество ионизированных частиц и молекул, которые формируют дисперсные системы. Такие микроскопические частицы могут оказаться весьма эффективными центрами зародышеобразования при низкой температуре вследствие чрезмерно большой кривизны поверхности и слабости сорбционных сил. Образовавшись на внешней границе сорбционного слоя, частицы зародышевого кристалла льда растут по поверхности, достигая того или иного кристаллического размера.

Механизм действия гетероморфных включений окончательно не выяснен, однако они либо могут оказывать чисто механическое торможение термических движений молекул, либо служить основой для сорбции молекул, где важную роль играют физико-химические свойства поверхности сорбционного слоя частиц. При этом кристаллизация раствора всегда начинается во внешних (имеющих слабые связи сорбционного слоя) изогнутых участках поверхности, в которой молекулы обладают достаточной свободой для кристалли-

зации под влиянием гетероморфных включений. Поэтому эффективными в качестве центров кристаллизации являются лишь участки с определенной степенью кривизны поверхности.

Таким образом, различные растворенные вещества могут оказывать значительное влияние на скорость зародышеобразования, причем чем выше энергия активации процесса диффузии, тем ниже скорость зародышеобразования. В высококонцентрированных растворах зародышеобразование может не происходить, так как компоненты раствора переходят полностью из жидкого состояния в аморфное. Способности к такому аморфному затвердеванию обладают высококонцентрированные растворы многих криопротекторов: глицерина, 1,2-пропандиола, этиленгликоля, сахарозы и др. В основе действия таких растворов лежит увеличение вязкости среды, и хотя это способствует интенсивному образованию зародышевых центров, однако сильно тормозит рост кристаллов в объеме, которые не способны достигать критического размера и повреждать клетку.

Классификация и характеристика скоростей замораживания. Замораживание сложного раствора протекает в две стадии: первая — первичная кристаллизация, при которой кристаллизуется растворитель (вода), и вторая — вторичная кристаллизация, при которой затвердевают растворитель и растворенные в нем вещества.

Процесс возникновения и роста кристалла льда зависит от интенсивности охлаждения и переохлаждения, скорости замораживания — отогрева, природы и концентрации растворенного вещества. Ориентировочно различают несколько видов скоростей замораживания биообъектов (табл. 5). При оценке действия скорости замораживания на состоянии биологических объектов прежде всего следует выделить диапазон температур, оказывающих определенное влияние на обмен веществ и другие показатели жизнеспособности. Условно выделяют следующие зоны температур, вызывающие те или иные изменения в структурно-функциональном состоянии клеток: 40—25 °С — зона высокой активности физиологических и обменных процессов; 25—0 °С — зона перехода биообъекта в состояние гибернации и от 0 до —80 °С — зона кристаллизации охлажденной вне- и внутриклеточной воды и перехода биообъекта в состояние неполного анабиоза; температурная зона от —80 до —150 °С — зона кристаллизации фракции связанной воды и рекристаллизационных процессов. Наконец, переход биообъекта в состояние полного анабиоза, происходящий при температурах от —150 до —273 °С, — это зона завершения кристаллизации и отсутствия рек-

Таблица 5. Классификация скоростей замораживания биообъектов

Вид замораживания	Скорость снижения температуры, °С/мин
Сверхбыстрое	5000—10 000 и более
Быстрое	10—5000
Медленное	1—10
Очень медленное	Менее 1

ристаллизационных процессов, т. е. зона глубокого анабиоза живых систем. Данная температурная классификация относится к биообъектам, высокая активность обменных процессов которых отмечается в диапазоне температур от 25 до 40 °С и, по-видимому, оказывается наиболее подходящей для клеток гомоитермных животных. В то же время известны организмы, биокинетика которых протекает при более низких (2—10 °С) температурах. В связи с этим Л. К. Лозина-Лозинский распределяет отрицательные температуры по их воздействию на биообъекты следующим образом: первая зона — от 0 до —20 °С — зона перехода клеток в состояние неполного анабиоза и вторая — от —20 до —80 °С — зона перехода в анабиотическое состояние. Эту область можно отнести также к критической или наиболее опасной для жизни.

Ниже —80 °С располагается зона ультранизких и сверхнизких температур, при которых возможна длительная консервация биологических объектов. Поскольку рекристаллизационные процессы происходят и в области температур, лежащих выше —150 °С, то иногда выделяют температурную зону от —80 до —150 °С. Однако о сущности протекающих в этой зоне фазовых превращений и биокинетических процессах известно очень мало.

Биообъекты, существующие в указанных температурных диапазонах, способны выживать с учетом их эволюционных и биологических особенностей, уровня развития, условий и способов замораживания структур клеток. Поэтому не существует строго фиксированных диапазонов низких температур, которые могут быть общими для различных биообъектов. Скорости охлаждения и заморозания играют большую роль в выживании тех или иных организмов, адаптирующихся к неблагоприятным температурным условиям внешней среды. Обычно в окружающей среде похолодание происходит медленно, и организмы успевают адаптироваться к действию низких температур. В случае резкого снижения температуры наступают внутриклеточная кристаллизация живых объектов и их гибель.

Скорости замораживания имеют важное значение, поскольку позволяют регулировать степень дегидратации клеток и тканей в цикле криоконсервации. Более того, степень элиминации свободной воды из клеток при замораживании является процессом, влияющим на темпы и уровень внутриклеточной кристаллизации. При этом имеется прямая зависимость между уровнем внутриклеточной дегидратации клетки и уменьшением ее объема. При очень больших скоростях охлаждения (~100 °С/мин) некоторые виды клеток не успевают обезводиться и замерзают внутриклеточно. Если скорость замораживания снизить, например, до 1—5 °С/мин, то клетка уменьшится примерно на 1/3 своего первоначального объема. В такой клетке либо кристаллы льда не формируются, либо их рост не достигает критических размеров. Скорость охлаждения биологических объектов является одним из основных факторов, определяющих, каким путем осуществится уравнивание давления паров в клетках, т. е. достигнет ли клетка этого состояния путем частичной

дегидратации либо путем внутриклеточной кристаллизации, зависит от скорости замораживания. Медленное замораживание включает первый путь уравнивания, быстрое — второй. Скорость замораживания и конечная температура влияют также на размер и форму кристаллов, формирующихся как вне, так и внутри клетки.

Поскольку на поверхности возникшего зародышевого кристалла содержится тонкая квазижидкая пленка, которая значительно концентрированней, чем окружающий ее раствор, в ней возникают процессы диффузии веществ (течение вещества), которые уравнивают рост кристалла на поверхности. Однако при понижении температуры и по мере роста кристалла возникают условия, способствующие дотраиванию кристаллов в объеме. Влияние скорости замораживания на рост кристалла заключается в том, что при медленном охлаждении, когда пребывание образца в данном интервале температур достаточно велико, в нем формируются крупные кристаллы льда. С увеличением скорости охлаждения размеры кристаллов увеличиваются незначительно, но увеличивается число зародышей небольшого размера. При дальнейшем увеличении скорости замораживания можно достичь витрифицированного (стеклообразного) состояния образца, включающего в себя незавершенные кристаллические структуры и аморфные участки.

При медленном замораживании ($\sim 0,5-1^\circ\text{C}/\text{мин}$), когда имеется достаточно времени для перестройки молекул воды, возникают упорядоченные структуры льда гексагональной формы (рис. 15). При повышении скорости охлаждения ($5-10^\circ\text{C}/\text{мин}$) гексагональные кристаллы льда (рис. 15, а) трансформируются и вначале образуются структуры типа неправильных дендритов (рис. 15, б), а затем, при еще большем увеличении скорости снижения температуры, — грубые сферулиты (рис. 15, в, г), характерной чертой которых является радиально расположенная лучистость, идущая от центра кристаллизации. При сверхбыстрых скоростях замораживания в тонком слое ($1000^\circ/\text{мин}$ и выше), когда молекулярная структура воды не успевает перестроиться и процесс ее кристаллизации остается незавершенным, возникают аморфные структуры или структуры типа быстро исчезающих сферулитов, при которых

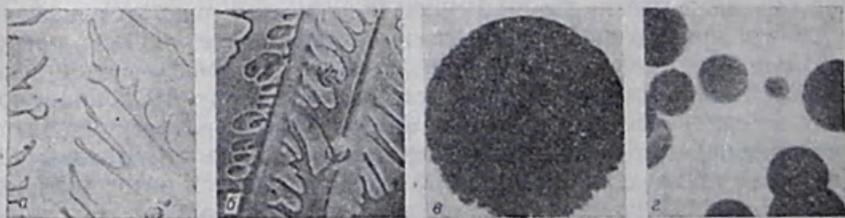


Рис. 15. Влияние скорости охлаждения на формирование льда для водных растворов при различных температурах:

а — гексагональные формы льда при скорости замораживания $5-10^\circ/\text{мин}$ клеточной суспензии в растворе 0,15 %-го NaCl до -5°C ; б — формирование кристаллов типа неправильных дендритов при температуре 10°C ; в — простые сферулиты при 60°C ; г — исчезающие сферулиты при 45°C .

какие-либо различия между льдом и раствором исчезают. При указанных выше переходах льда могут встречаться самые разнообразные структуры, имеющие промежуточное строение (коллоидные, услоподобные сферулиты и т. д.).

После завершения первичной кристаллизации, когда растворитель полностью вымораживается, наступает вторичная кристаллизация, при которой начинает затвердевать следующая фаза — растворенные вещества. На этой стадии происходит формирование в твердофазной матрице микроканалцев, в которых концентрируются растворенные вещества, кристаллизующиеся в эвтектической точке. Например, с раствором NaCl это происходит при температуре $-21,8^{\circ}\text{C}$, а CaCl_2 — при $-54,9^{\circ}\text{C}$. Процессы вторичной кристаллизации играют очень важную роль при замораживании биологических объектов, и в частности клеточных суспензий, охлаждаемых с низкой скоростью, когда образуется кристалл внеклеточного льда, а клетки оттесняются в микроканалцы с жидким гиперконцентрированным содержимым (при температурах выше эвтектических). По мере приближения к зоне эвтектики содержимое микроканалцев все больше концентрируется, а в эвтектической точке соли кристаллизуются. Поскольку для криоконсервации клеток используют сложные криоконсерванты, содержащие соли, белки, органические молекулы и криопротекторы, эвтектическая зона этих веществ оказывается довольно размытой и определить точку эвтектики очень трудно. Поэтому по мере снижения температуры в микроканалцах льда вторичная кристаллизация может быть очень растянута по температурной шкале. Считается, что основная масса свободного растворителя завершает первичную кристаллизацию при температурах порядка $-15...-18^{\circ}\text{C}$, а вторичная тесно связана с процессами эвтектической кристаллизации.

Эвтектическая кристаллизация. При замерзании разбавленных растворов вначале выделяется в твердом виде чистый растворитель, т. е. молекулы воды превращаются в лед. Поскольку по мере выделения льда концентрация раствора увеличивается, то температура замерзания смеси не остается постоянной, а постепенно понижается. Однако выделение льда и понижение температуры замерзания происходят лишь до тех пор, пока концентрация раствора не достигнет некоторой определенной для данного вещества величины, при которой весь раствор застывает в сплошную массу, состоящую из тонких прослоек льда и растворенного вещества в твердом виде. Такая застывшая масса, называемая эвтектикой, состоит из смеси твердых веществ. Интервал температур, в котором выделяющиеся из замороженной системы твердые компоненты находятся в равновесии с жидкой фазой, называется эвтектической зоной. Температура, при которой происходит образование тотальной твердой массы, называется эвтектической температурой (точкой), а соответствующая концентрация раствора — эвтектической концентрацией. Количественные стороны замерзания растворов описаны в виде законов Рауля, которые утверждают, что, во-первых, понижение точки замерзания пропорционально количеству

вещества, растворенного в данном количестве растворителя, и, во-вторых, эквимольные количества различных веществ, будучи растворенными в одном и том же количестве данного растворителя, понижают его точку замерзания на одно и то же число градусов. Например, при растворении 0,1 моль сахара в 1000 г воды точка замерзания понижается на 0,186 °С. Такое же понижение дает 0,1 моль глюкозы, ксилозы и т. д. Понижение точки замерзания, соответствующее растворению 1 моль вещества в 1000 г растворителя, является величиной постоянной для данного растворителя, называемой криоскопической константой растворителя. Точкой замерзания раствора считается та температура, при которой начинается выделение твердой фазы.

Таким образом, концентрация растворенных веществ, приводящая к самой низкой температуре, при которой раствор находится еще в жидком состоянии, представляет собой эвтектический раствор. Эвтектические растворы при низких температурах прежде всего формируют растворы электролитов. Ниже приведены эвтектические температуры для типичных растворов электролитов, из которых видно, что наиболее низкая эвтектическая температура возникает при замораживании растворов, в которых растворены катионы магния и кальция. При замораживании растворов электролитов до эвтектической точки наблюдается два вида кристаллизации в результате затвердевания эвтектической смеси.

Во-первых, может формироваться один кристаллический гидрат, включающий, например, комплекс $\text{NaCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$. Подобного рода комплексы формируют также соли типов LiF , NaBr , NaF , KNO_3 , MgCl_2 , LiCl , NaJ , NaOH , CaCl_2 и др.

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

Во-вторых, при эвтектическом замораживании вместо образования одного кристаллического гидрата раствор может разделяться на кристаллический лед и кристаллическую соль.

Следовательно, одни виды солей в насыщенном растворе могут связывать всю воду, образуя при этом гидратный кристалл, другие — кристаллизуются индивидуально в лед и соль. В первом случае это происходит в результате того, что одновалентные ионы, обладающие текучестью и молекулярными радиусами, близкими к воде, не способны разрушить ее структуру.

Эвтектическая кристаллизация растворов электролитов в значительной мере тормозится добавлением таких эффективных криопротекторов, как глицерин, 1,2-пропандиол, ДМСО, ПЭГ, которые способны связывать воду и тем самым снижать точку эвтектики. Соли при этом остаются в водном растворе в виде сложного комплекса и при дальнейшем понижении температуры затвердевают в стекловидную массу.

Рекристаллизация. Рост кристаллов льда тесно связан с явлением рекристаллизации.

Структура кристаллов льда зависит от скорости их роста. При увеличении скорости замораживания рост кристаллов в биосистемах зависит от содержания ионов, криопротекторов, белков и других примесей. При быстрых скоростях охлаждения обычно наблюдается следующая последовательность возникновения кристаллических структур: твердые компактные тела → дендриты → → нерегулярные дендриты → сферулиты → «исчезающие сферулиты». Такое многообразие форм кристаллов при быстром охлаждении свидетельствует о метастабильном состоянии кристаллов и незавершенности их структур, которые в зависимости от температуры могут переходить друг в друга. Кинетические процессы, возникающие при подобном рода переходах, сопровождаются молекулярными подвижками кристаллов, образованием ассоциатов, отличающихся своим характером и объемом на температурной шкале.

Процессы, которые сопровождаются молекулярной транслокацией кристалликов льда в замороженной матрице при ее затвердевании и отогреве, называются рекристаллизационными. Различают рекристаллизацию спонтанную, происходящую при снижении температуры, и индуцированную, развивающуюся при нагреве замороженного образца. Оба вида рекристаллизации в своей основе имеют одну и ту же природу — недостроенные кристаллы льда, отличающиеся скоростью выделения скрытой теплоты кристаллизации. Например, при отогреве быстро полученного аморфного льда от температуры -196°C до $-120\text{...}-130^{\circ}\text{C}$ лед становится частично кристаллическим. Более детальное исследование этих процессов показывает, что первое изменение аморфизированного льда при отогреве происходит в интервале $-160\text{...}-130^{\circ}\text{C}$, когда лед трансформируется из аморфного в кубический. Второе изменение происходит при температурах выше -130°C и сопровождается переходом кубического льда в гексагональный.

Нестабильность кристаллов и возможность их рекристаллизации при температурах выше -130°C зависят от природы растворов, молекулярной массы их компонентов и конечной температуры замораживания. Например, концентрированные растворы желатинны стабильны при температурах ниже -20°C , сахарозы — при -40°C , а глицерина — при $-60\text{...}-75^{\circ}\text{C}$.

Стабильность или нестабильность кристаллических структур зависит также от размеров частиц льда, образовавшегося при замораживании. Так, структура, кристаллизующаяся в виде сферолитов, становится нестабильной при более низкой температуре, чем структура, закристаллизовавшаяся в виде неправильных дендритов. Подтверждением этому может служить тот факт, что 6 М раствор глицерина, замороженный до -80°C , более стабилен, чем замороженный до -45°C и хранившийся несколько часов при -80°C . Это объясняется тем, что глицерин оказывает двойственное действие на кристаллическую матрицу: одна часть раствора затвердевает аморфно, а другая — кристаллизуется с образованием более крупных кристаллов.

Рекристаллизационные процессы при отогреве особенно интенсивно происходят в быстро замороженных витрифицированных образцах, которые характеризуются изотропностью, аморфностью структуры и неустойчивостью кристаллов льда. При отогреве таких образцов аморфные кристаллы льда переходят в кристаллическое состояние, т. е. происходит достройка кристалла. Это сопровождается выделением скрытой теплоты плавления и кратковременным скачком температуры образца, что хорошо выявляется с помощью ДТК. Процесс достройки кристалла, при котором увеличивается его рост, называется процессом миграционной рекристаллизации.

Таким образом, процессы рекристаллизации в витрифицированных системах происходят только при отогреве образца, а в более медленно замороженных — в период охлаждения. Поэтому рекристаллизационные процессы могут происходить не только при отогреве витрифицированной системы, но и в период замораживания, когда в обоих случаях идет достройка кристаллов. Если проследить, например, кинетику роста кристаллов льда в медленно замороженной клеточной суспензии под защитой оксипропирированного глицерина, то можно заметить, что процесс кристаллизации протекает двухэтапно: на первом, не зависящем от скорости замораживания, происходит рост кристаллов дендритного типа, а затем — медленная достройка кристалла, сопровождающаяся процессом рекристаллизации и формированием мелкоячеистых структур (рис. 16). Характерно, что рост кристаллов в суспензиях без криопротектора в этом случае прекращался уже в температурном диапазоне $-15...-20^{\circ}\text{C}$, а в суспензиях с криопротектором — при $-50...-60^{\circ}\text{C}$. В данном случае первый этап кристаллизации можно рассматривать как переход переохлажденной системы из равновесного состояния в состояние, близкое к равновесию. Образующиеся при этом кристаллические структуры отличаются неустойчивостью, в результате чего они и подвергаются процессам рекристаллизации.

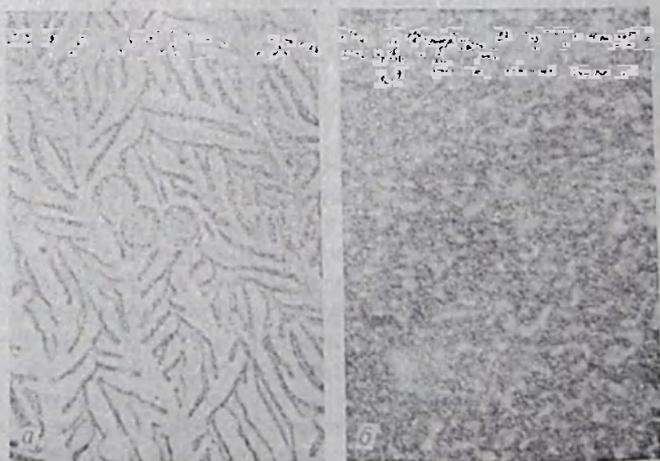


Рис. 16. Кинетические характеристики формирования кристаллов дендритного (а) и мелкоячеистого (б) льда

При скоростях охлаждения 0,3 и 1 °С/мин рекристаллизация приводит к формированию крупнокристаллических структур независимо от характера первичной структуры. Если скорость охлаждения увеличить до 10 °С/мин, то процессы рекристаллизации дендритных структур почти не происходят, а при скорости 60 °С/мин формируются в основном мелкокристаллические структуры льда. В этом случае процессы рекристаллизации происходят при отогреве клеточной суспензии в диапазоне —40...—30 °С, если скорость отогрева не превышает 1 °С/мин. При увеличении скорости отогрева до 50 °С/мин процессы рекристаллизации смещаются в область более высоких температур —15...—20 °С. Однако независимо от скорости отогрева лед, кристаллизующийся при отогреве из стеклообразного состояния, имеет вначале в основном кубическую форму, а затем трансформируется в обычный гексагональный лед. Поэтому для устранения повреждающего действия процессов рекристаллизации необходимо применять очень высокие скорости отогрева. В принципе такие скорости отогрева могут быть достигнуты на основе применения электромагнитных СВЧ-устройств, способных обеспечивать равномерное по объему нагревание органов со скоростью от нескольких сотен до тысячи градусов в минуту.

Процессы рекристаллизации играют важную роль в криоповреждении клеток, поскольку укрупнение кристаллов внутри клетки льда может привести к механическим разрушениям ее структур.

Витрификация (стеклообразное состояние). Процесс витрификации является одним из альтернативных подходов к проблеме криоконсервирования клеток, тканей и, возможно, органов. Хотя преимущества, которыми обладает витрификация, были известны более 100 лет назад, практическое ее применение было осуществлено относительно недавно.

Стеклообразная форма системы фактически представляет собой состояние переохлажденной жидкости, которая из-за огромной вязкости приобретает свойственную твердым телам устойчивую форму. Практически это означает, что витрификация — это отверждение жидкости с образованием аморфного или стеклообразного состояния кристаллов льда. Это состояние отличается от затвердевания при замораживании, когда происходит типичная кристаллизация. Хотя переохлажденная жидкость, в отличие от кристаллического состояния, является термодинамически неустойчивой, она может существовать практически неограниченно долго, если время перехода из жидкого в кристаллическое состояние достаточно велико. В отличие от замораживания при витрификации не происходит существенных изменений межмолекулярных взаимодействий в витрифицируемой жидкости, в результате чего образуется твердая масса, напоминающая снимок с жидкого состояния. При этом важен тот факт, что переход из жидкого состояния в стеклообразное не сопровождается выраженными побочными эффектами, в результате чего степень повреждения биообъектов в состоянии витрификации минимальна. Теоретические основы витрификации биообъектов были заложены физико-химиком Г. Тамманом и криобиологом

Б. Люйе (1903—1937 гг.), которые исследовали процессы кристаллизации при сверхбыстром замораживании (10^{-6} — 10^{10} °C/с) органических веществ и клеток в тонком слое. При таких условиях замораживания затвердевание жидкости идет по механизму формирования быстропросвечивающихся сферуллитов, которые имеют незавершенную кристаллическую структуру и могут трансформироваться в другие формы. Витрифицированного состояния можно достичь также при малых скоростях замораживания, но при условии доставки в среду замораживания высоких концентраций смеси криопротекторов. Процесс витрификации можно также вызвать комбинацией факторов — медленным замораживанием, высоким давлением и высокой концентрацией криопротекторов.

Поэтому для водных растворов с включенными простыми молекулами витрифицированное состояние может быть получено только при высоких скоростях охлаждения ($\sim 10^4$ °C/мин). Исходя из этого была изучена возможность замораживания клеток с помощью сверхбыстрого охлаждения, осуществляемого, например, диспергированием мелких капель клеточной суспензии непосредственно в жидкий азот, распылением на сильно охлажденную металлическую пластину и т. п. Теоретические расчеты показывают, что в принципе для стабилизации исходной структуры водного раствора, т. е. его стеклования, скорость охлаждения должна составлять не менее 10^4 K/с. В процессе отогрева, особенно при температурах, близких к температуре плавления, метастабильная стеклообразная фаза переходит в термодинамически стабильную кристаллическую, т. е. структура кристаллической сетки не сохраняется в неизменном состоянии на протяжении всего цикла охлаждения-отогрева. Поскольку при использовании метода витрификации криоповреждения биообъектов минимальны, это открывает перспективы криоконсервации таких сложных систем, как крупные органы (почка, печень и т. д.), которые не переносят кристаллизацию.

При добавлении в раствор смеси или высоких концентраций криопротекторов — ДМСО, глицерина или полимерных соединений (ПЭГ, ПЭО, ПВП), повышающих его вязкость, для достижения состояния витрификации образца требуется значительно меньшая скорость охлаждения, поскольку в таких вязких средах уменьшаются скорость зародышеобразования и линейная скорость роста кристаллов. Различные криопротекторы по-разному влияют на количество образующегося льда при замораживании. По мере повышения концентрации криопротектора количество образующегося в системе льда уменьшается (табл. 6). Вместе с тем использование больших скоростей охлаждения или применение высоких концентраций криопротекторов для консервации биообъектов имеет ряд недостатков. Во-первых, высокие скорости охлаждения невозможно применить при замораживании биообъектов большого объема, например тканей или органов млекопитающих. Во-вторых, при отогреве стеклообразной массы (девитрификации) начинают формироваться крупные кристаллы льда (процесс рекристаллизации), которые оказывают повреждающее действие на биообъект. Поэто-

Таблица 6. Влияние различных концентраций криопротекторов на количество (г/100 г раствора) образующегося льда в системе при замораживании

Природа криопротектора	Концентрация криопротектора, %	
	35,0	45,0
1,2-Пропандиол	151	5,7
1,3-Бутандиол	472	4,0
1,2,3-Бутантриол	574	7,0
1,2,4-Бутантриол	1233	142
Глицерин	—	244
Этиленгликоль	—	182
1,3-Пропандиол	—	743

применяется в основном для низкотемпературного консервирования клеток в тонком слое, т. е. в тех случаях, когда объем образца чрезвычайно мал, поскольку в таких случаях вероятность флукту-

му для устранения негативных процессов, возникающих при девитрификации системы, необходимо применять строго рассчитанные, но всегда высокие скорости отогрева с тем, чтобы свести к минимуму повреждающее действие рекристаллизационных процессов.

В настоящее время способ сверхбыстрого охлаждения в силу указанной причины и других недостатков на практике

Таблица 7. Влияние витрифицирующих растворов (ВР) на выживаемость различных клеток

Природа клеток	Выживаемость, %	Состав витрифицирующей среды
Эритроциты человека	100	5 М глицерин
	95	4,1 М глицерин
	88—94	4,4 М пропандиол (1,2-пропандиол)
Моноциты человека	92—96	ВР ¹
Яйцеклетки человека: выживаемость оплодотворение рост до 8-бластомеров	63	ВР ¹
	25—46	
	19	
Яйцеклетки хомяка: — морфологически не поврежденные — проницаемость для спермиев	61—76	ВР ¹
	16—37	
Эмбрионы мыши: — на стадии 2-клеточных бластомеров — на стадии 8-клеточных бластомеров — морулы — ранняя бластоциста	89	ВР ¹
	81—88	
	80—83	
	89	ВР ¹
Эмбрионы быка: — стадия поздней морулы — ранней бластоцисты — поздней бластоцисты	43	ВР ²
	54	
	25—20	
Панкреатические клетки человека	80—85	ВР ³

Примечание. ВР¹ — 20,5% ДМСО; 15,5%-й ацетамид; 10%-й 1,2-пропандиол; 6%-й полиэтиленгликоль с М. н. кД; ВР² — 25%-й глицерин и 25%-й 1,2-пропандиол. ВР³ — модифицированный ВР¹, содержащий 4,5 ПЭГ и 0,3% бычьего сывороточного альбумина.

аннионного зарождения кристаллов сильно уменьшается, а склонность к переохлаждению, наоборот, увеличивается. Различные или даже один и те же биообъекты по-разному реагируют на процесс витрификации. Так, например, выживаемость яйцеклеток мыши после витрификации составляет 0 %, а эмбрионы этого же животного на стадии двух бластомеров выживают в 89 % случаев. Чаще всего используют традиционные витрифицирующие растворы, в состав которых входят 20,5%-й раствор ДМСО, 15,5%-й раствор ацетамида, 10%-й раствор 1,2-пропандиола и 6%-й ПЭГ с М. м. 8 кД. Однако витрифицированного состояния можно достичь путем применения отдельных криопротекторов в высоких концентрациях. Состав витрифицирующих защитных соединений может быть и другим, и их эффективность по отношению к тем или другим биообъектам выясняется экспериментальным путем.

При использовании этих витрифицирующих растворов можно получить довольно высокие результаты при замораживании эритроцитов, моноцитов, яйцеклеток хомяка, мыши, крысы, а также различных эмбрионов (табл. 7).

Фазовые диаграммы (диаграммы состояния)

В общем виде под фазовой диаграммой понимают геометрическое изображение равновесных состояний термодинамических систем при разных значениях параметров, определяющих эти состояния (температура, концентрация компонентов, напряженности электрических и магнитных полей, давление).

Диаграмма, связывающая температуру, давление и состав системы, называется диаграммой состояния. Если на диаграмме изображено состояние различных фаз системы, то она называется фазовой. В общем случае диаграмма состояния будет трехмерной, так как для изображения состава, давления и температуры надо иметь три перпендикулярные друг другу оси. Однако часто ограничиваются изображением состояния системы при постоянном давлении или постоянной температуре. Эти виды бинарных диаграмм являются двумерными, т. е. изображаются на плоскости.

Фазовая диаграмма различных состояний 1,2-пропандиола и глицерина в зависимости от температуры, отражает процессы кристаллизации, стеклования и расстеклования системы, рекристаллизации и плавления, а также соотношения и состав жидкой и твердой фаз в зависимости от соотношения компонентов раствора и температуры. Изучение фазовых диаграмм растворов криопротекторов, солевых растворов, и в частности их диаграмм плавления, важно для лучшего понимания механизмов криоповреждений и криозащиты клеток и тканей при воздействии низких температур.

Диаграмма плавления — это линия, отражающая температурную зависимость начала замерзания (плавления) раствора при изменении его концентрации. Диаграмма плавления выражает зависимость температур начала и конца равновесной кристаллизации от состава раствора.

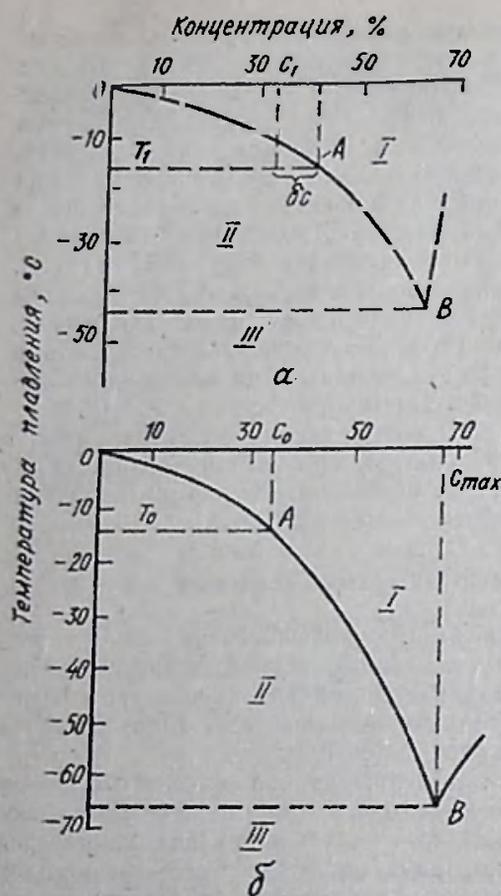


Рис. 17. Диаграмма плавления водного раствора глицерина (а) и ДМСО (б). Точка В соответствует эвтектической зоне, ниже которой раствор находится в твердом состоянии (III). В зоне I раствор находится в жидком состоянии, зоне II — кристаллы сосуществуют с жидким раствором криопротектора. Обозначения:

T_0 — исходная температура; T_1 — текущая температура; C_0 и C_1 — исходная и увеличивающаяся концентрация раствора; δC — пересыщение; α — точка, соответствующая жидкофазному состоянию

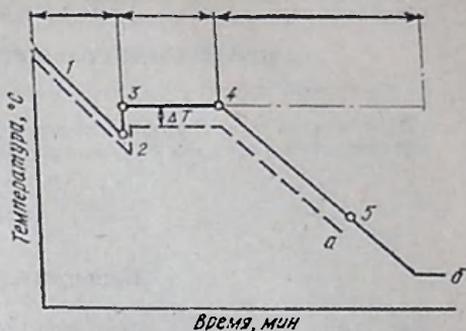
ся в зоне низких температур искривление линии ликвидуса для различных растворов неодинаково. Общей теории, позволяющей описать ход равновесной линии ликвидуса любой бинарной системы, в настоящее время не существует.

Типичная термограмма (т. е. зависимость температуры от времени) процесса охлаждения раствора или клеточной суспензии представлена на рис. 18. Почти горизонтальная площадка 3—4

Фазовые диаграммы растворов определенного вещества получают при определении точки плавления его раствора с различными концентрациями (рис. 17). Как видно, в концентрации 70% глицерин кристаллизуется при -45°C , а ДМСО в той же концентрации — при -70°C . С помощью фазовых диаграмм можно при каждой данной температуре не только оценить концентрацию раствора, влияющую на криоскопическую точку, но и высчитать количество образовавшегося льда, т. е. оценить вклад этих факторов в процесс криоконсервации биообъектов. При возрастании концентрации криопротекторов в системе до $\sim 10\text{--}30\%$ еще сохраняется линейная зависимость температуры замерзания раствора от концентрации. Дальнейшее повышение концентрации глицерина, сахарозы или ДМСО приводит к значительному понижению температуры замерзания раствора. Так, ДМСО в концентрации $\sim 75\%$ снижает точку кристаллизации раствора ниже -60°C , а раствор ПВП с м. м. 19900 в аналогичной концентрации сдвигает точку замерзания всего лишь на $-1,5^\circ\text{C}$. Наблюдающееся

Рис. 18. Типичная термограмма медленного замораживания клеточной суспензии:

a — теоретически рассчитанные данные; *б* — экспериментальные данные; 1—2 — первичное охлаждение системы; 2—3 — участок термограммы, соответствующий переохлаждению системы; 3—4 — участок выделения скрытой теплоты кристаллизации на движущейся границе раздела фаз лед — жидкий раствор; 4—5 — участок термограммы, соответствующий кристаллизации системы



на движущейся границе раздела фаз лед — жидкий раствор. В стационарном случае выделяющееся при кристаллизации тепло равно его убыли за счет отвода от границы раздела фаз через кристалл в хладагент. Участок термограммы соответствует переохлаждению системы до начала кристаллизации в ней. Процесс переохлаждения необходим для образования в системе кристаллических зародышей, которые могут превышать или не превышать критический размер. Само по себе переохлаждение до субнулевых температур без кристаллизации вне- и внутриклеточной воды не приводит к быстрому повреждению клеток. Излом в точке *B* на термограмме обусловлен выделением тепла при затвердевании областей, в которых концентрация раствора соответствует эвтектической точке. Чем выше исходная концентрация охлаждаемого раствора, тем больший его объем затвердевает в эвтектической точке и тем длиннее становится площадка на термограмме при эвтектической температуре.

Поэтому при замораживании взвеси клеток в растворе криопротекторов клетки по мере вымерзания воды будут концентрироваться в каналах между кристаллами льда и подвергаться воздействию повышающихся концентраций криопротектора. В связи с этим изучение диаграмм плавления растворов криопротекторов позволяет оценить состав и состояние среды, окружающей клетки, при различных температурах по мере их замораживания.

Глава 6

КРИОПРОТЕКТОРЫ И КРИОКОНСЕРВАНТЫ

Криопротекторы

Вещества, способные предотвращать развитие повреждений биологических объектов при их замораживании и последующем отогреве, называют криопротекторами. К эффективным криопротекторам относятся соединения, принадлежащие к разным классам химических соединений: спиртам (этиленгликоль, α -пропиленгликоль, глицерин), амидам (диметилацетамид), оксидам (диметилсульфоксид) и искусственным полимерам (поливинилпирролидон, оксипропилированный крахмал, полиэтиленгликоль) (табл. 8). Приведенный список не исчерпывает ни классов веществ, в которых могут встретиться эффективные криопротекторы, ни перечня криопротекторов в названных классах. Имеющаяся классификация А. Кэроу включает довольно большое число веществ (табл. 9), однако большинство из них оказались неэффективными криопротекторами.

По способности криозащитных соединений проникать внутрь клетки все известные криопротекторы, по предложению Лавлова (1954), разделяются на экзо-, эндоцеллюлярные (непроникающие и проникающие) и криопротекторы смешанного типа. К числу проникающих криопротекторов относятся прежде всего представители

Таблица 8. Основные классы органических соединений, испытанных в качестве криопротекторов

Спирт		Оксид	Аминокислота	Амид кислоты	Углевод	Белок	Полимерное соединение
Двоатомный	многоатомный						
Мета-нол-танол	Этиленгликоль	DMCO	α -Аланин	Формамид	Глюкоза	Альбумин	ПВН
	Диэтиленгликоль	Диметилсульфон	L-Валин	Метилформамид	Ксилитоза	Желатин	ПЭО
	Триэтиленгликоль	Пиридин-оксид	Серин	Ацетамид	Мальтоза	Желатин	Декстрин
	Пропиленгликоль			Метилацетамид	Рибоза		ГЭК
	Глицерин			Диметилацетамид	Рафиноза		
	Маннит			Пропиламид	Манноза		
	Сорбит			Мочевина ¹			
	Эритрит			Метилмочевина			
	¹ нозит			на			

Таблица 9. Характеристика криозащитного действия различных соединений

Соединение	Клетка или ткань
Ацетамин	Эритроциты, клетки почек человека в культуре ткани, бычья сперма, трипаносомы, ткань сердца эмбриона цыпленка
L-аланин	Костный мозг мыши
Альбумин	Эритроциты человека
Уксуснокислый аммоний	Сердце собаки
Хлороформ	Костный мозг мыши
Холлин	Эритроциты человека, костный мозг мыши
Декстрин	Эритроциты и культивированные клетки почек человека
Диэтиленгликоль	Эритроциты и культивированные почечные клетки
Диметилацетамид	Эритроциты, почечные клетки человека
Диметилформамид	Клетки почки человека
Диметилсульфон	Бычья кровь, эритроциты человека, лейкоциты человека, хлоропласты помидоров, культура почечных клеток, бычья сперма, роговина кролика и человека, матка морской свинки, сердце крысы
Диметилсульфо-кенид	Бычья кровь, эритроциты человека, лейкоциты человека, хлоропласты помидоров, культура почечных клеток, бычья сперма, роговина кролика и человека, матка морской свинки, сердце крысы
Эригроз	Эритроциты человека, костный мозг мышей
Этанол	Эритроциты, культура почечных клеток человека
Этиленгликоль	Эритроциты, культура почечных клеток человека, костный мозг мышей, кожа мышей и крыс
Формамид	Культура почечных клеток, эритроциты человека, ткань сердца эмбриона цыпленка
Глюкоза	Кровь быка, эритроциты человека, костный мозг мышей, сердечная ткань эмбриона цыпленка, культура почечных клеток человека, сперма быка, трипаносомы
Глицерин	Кровь быка, эритроциты человека, сперма быка, трипаносомы, лейкоциты, культура почечных клеток человека, костный мозг мышей, кроликов, человека, кожа мышей, крыс, роговина кролика, сердце хомяка и мышного эмбриона, почки собаки, митохондрии печени крыс
Глицин	Костный мозг мышей
Гидроксикрахмал	Эритроциты человека
Инозитол	Костный мозг мышей, культура почечных клеток человека
Лактоза	Кровь, эритроциты человека, костный мозг мышей
Хлористый магний	Кровь, сердце крысы
Сернистый магний	Сердце крысы, морской свинки, кролика; собаки
Мальтоза	Кровь человека
Маннитол	Костный мозг мышей, культура почечных клеток человека
Манноза	Культура почечных клеток человека
Метанол	Эритроциты человека, костный мозг мышей, сперма быка, трипаносомы, культура почечных клеток человека
Метилацетамид	Эритроциты человека
Метилформамид	» »
Метилмочевина	Ткань сердца эмбриона цыпленка
Моноацетин	Эритроциты, культура почечных клеток человека
Фенол	Культура почечных клеток человека
Полиэтиленгликоль	Эритроциты человека
Полноксипэтилен	» »
ПВФ	Эритроциты, костный мозг, хрящ человека
L-пролин	Костный мозг мышей

Соединение	Клетка или ткань
Пропионамид	Ткань сердца эмбриона цыпленка
Пропиленгликоль	Эритроциты, культура почечных клеток человека
Пиридиноксид	То же
Резорцинол	Культура почечных клеток человека
Рибитол	Костный мозг мышей
Рибоза	Культура почечных клеток человека
L-серия	Костный мозг мышей
Арсенид натрия	Костный мозг, эритроциты, культура почечных клеток человека, ткань сердца эмбриона цыпленка
Йодистый натрий	Костный мозг мышей
Нитрат натрия	То же
Сульфат натрия	" "
Сорбитол	Костный мозг мышей, культура почечных клеток человека
Сахароза	Кровь быка, кровь человека, эритроциты человека, костный мозг мышей, кожа крысы, сердце быка, трипаносомы
Триэтиленгликоль	Эритроциты человека
Мочевина	Эритроциты, культура почечных клеток человека, ткань сердца эмбриона цыпленка
L-валин	Костный мозг мышей
Ксилоза	Эритроциты человека, сперма, трипаносомы быка

одно- и многоатомных спиртов, оксиды, некоторые из низкомолекулярных сахаров (например, глюкоза). Криопротекторы типа амидов кислот, высокомолекулярных сахаров, белков, высокомолекулярных полиэтиленоксидов и гликолей, ПВП, ГЭК принадлежат к числу непроникающих соединений. Некоторые виды криопротекторов, например ПЭО, могут в своем составе содержать определенную долю мономерных фракций, которые проникают внутрь клетки, в то время как основная масса полимера остается во внеклеточной среде. Такого типа соединения могут быть причислены к криопротекторам смешанного типа.

Характерно, что для криопротекторов различной химической природы не существует единых границ молекулярной массы, так как криопротективная активность обнаруживается как у низкомолекулярных веществ (например, ДМСО, глицерин), так и у высокомолекулярных соединений (например, ГЭК, ПЭГ). Полимерные соединения с учетом данных о криозащитных, реологических свойствах и, особенно, токсичности имеют оптимальные пределы величины молекулярной массы: для ПЭО — 100—1500; для ПВП — 12 500—25 000; для ГЭК — 250 000—500 000.

Доблер (1966) разделяет криопротекторы на эффективные, слабоэффективные и соединения, не обладающие криопротективной активностью (табл. 10). Среди достаточно большого количества разнообразных химических соединений (см. табл. 8, 9) на практике чаще всего используют глицерин, 1,2-пропандиол, ДМСО, диметилацетамид, ПВП и некоторые виды ПЭГов (ПЭО). Этиленгликоль (м. м. 62) хотя и является активным криопротектором, хорошо

Таблица 10. Классификация криопротекторов по их эффективности

Характеристика криопротектора	Природа соединения
Эффективные криопротекторы для одного и более типов клеток	Полигидроксисоединения (гликоли, глицерин, амиды, моносахариды, ди- и трисахариды). ДМСО, пиридин, полимеры окиси этилена, ПВП, декстрин
Умеренные или слабоэффективные криопротекторы	Одноатомные спиртолы, карбоксильные и гидроксикислоты, глицеромоноацетат, мочевины, неорганические соли, альбумин, желатина и ее производные
Не обладающие свойствами криопротекторов	Фенолы, диметилсульфон, кетоны, пирролидон, бутиролактон, тетрагидрофуран, диоксан, неорганические соли

проникает в клетки, однако токсичен на организменном уровне. Диметилацетамид — криопротектор специфического действия, поскольку эффективен при криоконсервации только лейкоцитов и тромбоцитов.

Эффективный, проникающий внутрь криопротектор должен обладать следующими свойствами: быть нетоксичным, хорошо растворяться в воде и растворах электролитов, снижать количество вымораживаемой в виде чистого льда воды при каждой данной температуре и полностью предотвращать кристаллизацию воды из эвтектической смеси «криопротектор — вода». При этом он должен поддерживать в растворенном состоянии соли и белки вплоть до эвтектического перехода в аморфное состояние, т. е. его растворы должны иметь низкую эвтектическую температуру, чтобы сократить температурный интервал воздействия твердой фазы на клетку в процессе замораживания и отогрева. Однако в реальных условиях некоторые из криопротекторов, обладая низкой эвтектической температурой, не могут быть использованы из-за своей токсичности.

Выявлено, что наиболее низкие эвтектические температуры у растворов метанола и этанола, однако они оказывают денатурирующее действие на клетки уже в довольно малых концентрациях и поэтому не используются в качестве криопротектора (табл. 11).

Таблица 11. Эвтектические показатели растворов криопротекторов

Водный раствор криопротектора	М.м.	Эвтектическая температура, °С	Эвтектическая концентрация, %
Метанол	32	-138	77,0
Этанол	46	-125	92,5
Диметилформамид	73	-100	80,0
ДМСО	58	-66	70,0
Этиленгликоль	62	-63	76,0
Пропиленгликоль	76	-57	60,0
Глицерин	92	-46,5	66,7

Диметилформамид с эвтектической температурой -100°C обладает также достаточно выраженной токсичностью, а ДМСО не имеет особых преимуществ перед глицерином.

Достаточно низкие эвтектические температуры также у этилен- и пропиленгликоля, растворы которых в концентрации, близкой к эвтектической, переходят в аморфное состояние. Пропиленгликоль в силу очень низкой токсичности находит широкое применение в практике консервирования клеточных суспензий.

Общими свойствами криопротекторов является наличие в их структуре полярных молекул, способных взаимодействовать как с молекулами H_2O , металлами и солями, так и с компонентами мембран и биополимерами. Важным свойством криопротекторов является также их способность влиять на процессы кристаллизации, способствуя формированию мелкокристаллического льда, который не обладает сильными полями напряжения. Изменение структуры льда под влиянием криопротекторов снижает степень механического воздействия на цитоплазматические структуры и мембраны.

Поэтому вязкость криопротекторного раствора при низкой температуре должна быть высокой, чтобы при замораживании в микроканальцах, где концентрируются клетки, раствор переходил в аморфное состояние при относительно низких концентрациях криопротектора и солей. Непременным требованием к такого рода криопротекторам является их способность быстро проникать в клетку и легко удаляться из нее с тем, чтобы уменьшить осмотические эффекты при замораживании и отмывании криопротектора. В присутствии криопротектора вымораживание фракции воды из криозащитной среды протекает в широкой температурной зоне и завершается, когда концентрация невымерзшей воды достигает величины 20—30 %. При увеличении исходного (до замораживания) содержания криопротектора в среде связывание солей и других веществ увеличивается, что препятствует их концентрированию до критических, губительных для клетки величин. Следовательно, в присутствии криопротекторов соли либо вообще не концентрируются до повреждающих пределов, либо эти пределы достигаются в зоне температур, когда развитие повреждений протекает медленно.

По мере вымораживания воды из криозащитной среды растворы криопротекторов становятся гипертоническими, что вызывает обезвоживание клетки. В результате частичной дегидратации клетки концентрация внутриклеточных коллоидов повышается, что способствует переохлаждению внутриклеточной среды и ее частичному переходу в стеклообразное состояние, исключаящее образование достаточно крупных для повреждения клеток кристаллов льда.

Быстрое проникновение криопротектора в клетку в составе гипертонических криозащитных сред по мере вымораживания воды и обезвоживания клетки предупреждает возникновение на мембране повреждающих градиентов концентраций вне- и внутриклеточного раствора.

Хотя проникающие криопротекторы обеспечивают достаточно эффективную защиту биологических структур по сравнению с не-

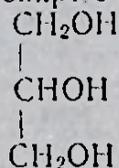
проникающими, они имеют недостаток в том отношении, что их необходимо удалять из замороженных клеток после их отогрева, поскольку при трансфузии клеток, содержащих внутри ДМСО или глицерин, возникают токсические поражения почек. В процессе удаления глицерина из клеток происходят дополнительные повреждения их мембран и внутриклеточных структур, в силу чего такие деглицинизированные клетки нуждаются в дополнительной обработке смесью биологически активных соединений (нуклеотиды, сахара), которые способны улучшить их структурно-функциональные свойства.

Проникающая способность криопротектора зависит не только от его молекулярной массы и температуры равновесия, но и от конкретного вида клеток, свойств и структуры плазматической мембраны. Например, глицерин довольно быстро проникает в эритроциты человека при 37 °С, и через 2 мин достигается равновесие. Эта величина для спермиев животных достигает 7 мин, а скорость проникновения глицерина в другие клетки может быть значительно меньшей. Так, в эритроциты быка глицерин практически не проникает. Температура достаточно выражено влияет на проникновение глицерина в клетки. Например, при 4 °С глицерин плохо проникает в панкреатические клетки, в то время как при 37 °С он легко переходит в цитоплазму этих клеток.

Экзоцеллюлярные криопротекторы (ПВП, ГЭК, ПЭГ, сахара) оказывают защитное действие благодаря способности вызывать частичную дегидратацию клетки и тем самым снижать возможность внутриклеточной кристаллизации. Действительно, действие непроникающих в клетку криопротекторов намного сложнее, и оно реализуется, очевидно, через определенные рецепторные и нон-транспортирующие макромолекулярные комплексы мембран, которые влияют на структурно-функциональное состояние белков цитоскелета. В результате осмотического сжатия клеток они частично дегидратируют и в таком состоянии способны выдерживать замораживание.

Защитные свойства глицерина. Впервые на криозащитные свойства глицерина при исследовании растительных объектов было обращено внимание в 1913 г. Н. А. Максимовым, а затем в 1937 г. А. Д. Берштейн, В. И. Петропавловский применили его для замораживания (до -21 °С) спермы ряда сельскохозяйственных животных и птиц. В 1946 г. Дж. Ростан продемонстрировал возможность хранения спермы лягушки в течение суток при -4...-6 °С в среде, содержащей 10—20 % глицерина, а в 1949 г. К. Полдж и О. Смит обнаружили, что глицерин обладает криозащитными свойствами при замораживании спермиев петуха.

Глицерин — многоатомный спирт с М. м. 92:



Благодаря наличию ОН-групп глицерин способен формировать водородные связи с молекулами воды и смешиваться с ней в любых соотношениях.

При замораживании чистый глицерин очень редко затвердевает, но иногда кристаллизуется в виде кристаллов ромбовидной формы. На кристаллизацию глицерина влияют вода либо другие примеси. Глицерин обладает высокой вязкостью, связанной с наличием в его молекуле гидроксильных групп, вследствие чего в его присутствии образуется пространственная сетка водородных связей, плотность которых в 3 раза больше, чем одноатомных спиртов. С повышением концентрации глицерина вязкость водно-глицериновой смеси увеличивается, при этом снижаются скорость движения молекул растворенного вещества и их кинетическая энергия, что приводит к снижению скорости физико-химических процессов в биологических объектах. При взаимодействии с водой глицерин разрушает ее льдоподобный каркас, однако при этом формирует гидратную оболочку вокруг молекул H_2O . Формирование такой оболочки способствует стабилизации гидратационных решеток белков за счет перехода молекул свободной воды в связанное состояние.

Температура замерзания водного раствора глицерина зависит от его концентрации: наиболее низкой температурой замерзания ($-46,4^{\circ}C$) обладает 66,7%-й раствор глицерина. Переход такой вязкой жидкости в витрифицированное состояние происходит при температуре ниже $-83^{\circ}C$. Витрификация растворов глицерина увеличивается с повышением концентрации его в среде замораживания. Важно, что в присутствии глицерина формируется мелкозернистый лед, который переходит в аморфное состояние (рис. 19). При мелкокристаллическом замерзании растворов центры кристаллизации хотя и очень многочисленны, но не способны к росту. По-

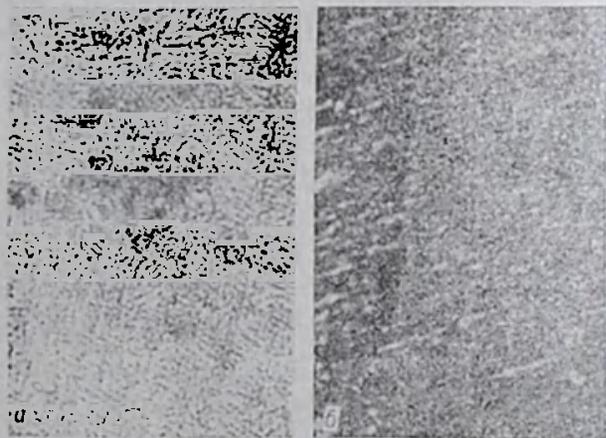


Рис. 19. Кристаллизация 0,15 М раствора NaCl в присутствии 30%-го раствора глицерина:
формирование мелкозернистого (а) и аморфного льда (б)

сколькx глицерин не кристаллизуется одновременно с водой, это препятствует образованию гиперконцентрированных солевых растворов, способных вызвать лизис клеток.

Существенно, что глицерин снижает интенсивность процессов кристаллизации и смещает их в зону более низких температур. При охлаждении физиологического раствора, содержащего 30 % глицерина, ниже -50°C в нем еще содержится доля жидкой фазы, которая полностью исчезает лишь при температуре -61°C .

К числу положительных эффектов глицерина следует отнести также его способность уменьшать размер кристалла льда, поскольку его охлаждение сопровождается сжатием объема, что способствует снижению давления водного и криогидратного льда. Свойство глицерина сжиматься при замерзании является существенным, так как превращение воды в лед не сопровождается увеличением его объема. Защитные свойства глицерина связаны также с его способностью поддерживать переохлажденное состояние клетки, поскольку его молекулы образуют стабильные водородные связи с H_2O . Тем самым он уменьшает количество H_2O , способной кристаллизоваться, и повышает долю воды, связанной с белками и другими биополимерами.

Под защитой глицерина криоконсервируют разнообразные биологические объекты: вирусы, микроорганизмы, клетки и ткани. Существует очень много комбинаций консервирующих сред, включающих глицерин, которые также широко применяются для замораживания биообъектов.

Различные клетки и ткани неодинаково реагируют на действие глицерина. Например, проницаемость плазматической мембраны при 0°C для глицерина у некоторых типов клеток очень снижена, и в этом случае глицерин действует уже как экзоцеллюлярный криопротектор. При обычных температурах ($22-37^{\circ}\text{C}$) глицерин легко проникает в клетки и, действуя как противосолевой буфер, защищает мембрану и внутриклеточные структуры от действия «эффектов раствора» и, кроме того, уравнивает осмотическое давление по обе стороны мембраны, т. е. предупреждает развитие осмотических градиентов на мембране. Криозащита с помощью глицерина эффективна еще и потому, что он формирует комплексы с солями и металлами, а также активными центрами ферментов, вызывая временную блокаду функциональной активности ряда ферментных систем в клетке. Торможение структурно-функциональной активности клеток при взаимодействии с глицирином либо другим криопротектором, которое приводит к подавлению метаболической активности клеток, в литературе получило название псевдотоксического эффекта. Этот «псевдотоксический» эффект полностью устраняется при удалении глицерина из клетки.

В медицинской практике глицерин применяется как препарат осмотического действия. Наибольшая переносимая доза глицерина при внутривенном введении составляет: человеку — 1—2 г/кг массы, собакам — 3—5, кроликам — 2—3 г/кг массы.

Для удаления глицерина из клеток используют разнообразные методы: диализ, отмывку гипертоническими растворами глюкозы и цитрата или растворами глицерина с уменьшающейся концентрацией, непрерывное отмывание и центрифугирование, разведение или осаждение с декстраном; агломерацию с неэлектролитами или дисагрегацию в солевых растворах. В процессе отмывки глицерина в клетках возникают дополнительные повреждения, которые устраняют с помощью различных реабилитационных средств.

Вместе с тем глицерин обладает всеми необходимыми достоинствами классического эндоцеллюлярного криопротектора. Это, во-первых, коллигативный способ действия; во-вторых, способность модифицировать структуру воды, стабилизировать мембрану и внутриклеточные структуры от повреждающего действия «эффектов раствора» и кристаллов льда.

В основе коллигативного способа действия лежит способность растворенного вещества понижать температуру замерзания, осмотическое давление температуры кипения и давление насыщенного пара растворителя над поверхностью раствора. При невысоких концентрациях указанные выше параметры изменяются пропорционально концентрации растворенного вещества независимо от его химического строения. Строго эти законы выполняются только для идеальных растворов.

Свойства реальных растворов приближаются к идеальным в том случае, когда концентрация растворенного вещества низкая. Общим в группе коллигативных свойств является понижение давления пара, а все остальные свойства вытекают из этого правила. Понижению давления пара раствора, содержащего летучее вещество, описывается законом Рауля:

$$\frac{P_0 - P}{P_0} = \frac{mM_1}{1000}$$

где P_0 — давление насыщенного пара чистого растворителя; P — давление насыщенного пара растворителя над поверхностью раствора; m — молярность растворенного вещества; M_1 — молекулярная масса растворителя.

Молярность раствора определяется как

$$m = \frac{W_2/M_2}{W_1/1000}$$

где W_1 — масса растворителя; W_2 — масса растворенного вещества; M_2 — молекулярная масса растворенного вещества.

В биологии особую роль играют эффекты растворителя, разобщенного с раствором полупроницаемой мембраной, т. е. перегородкой, которая проницаема для растворителя, но не проницаема для растворенного вещества. Этот процесс известен под названием осмоса и связан с возникновением осмотического давления на мембране. Величина осмотического давления описывается законом Вант-Гоффа:

$$r = \frac{cRT}{M}$$

где c — концентрация растворенного вещества, г/л; M — молекулярная масса растворенного вещества.

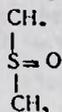
Действие криопротекторов связано с понижением температуры замерзания раствора. При небольших концентрациях криопротектора понижение температуры замерзания описывается соотношением

$$\Delta T_i = \frac{RT_{01}^2}{\Delta H_{пл.}} X_2$$

где T_{01} — температура плавления чистого растворителя; $\Delta H_{пл.}$ — мольная теплота плавления чистого растворителя; X_2 — мольная доля растворенного вещества.

Как видно из приведенных данных, коллигативное действие раствора обратно пропорционально молекулярной массе вещества. Из этого следует, что при равных массовых концентрациях эффективы понижения температуры замерзания или изменения осмотического давления будут меньше у высокомолекулярного вещества. Эти факты и положены в основу деления криопротекторов на вещества коллигативного и неколлигативного действия.

Диметилсульфоксид (DMCO , Me_2SO), отечественный препарат — димексид, относится к классу оксидов, с M . массой 78,13:



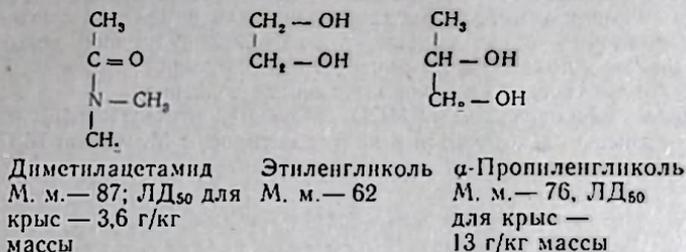
Поскольку DMCO в своем составе содержит функциональную группу $\text{S}=\text{O}-\text{CH}_3$, он обладает высокой способностью вступать в реакции с солями и оксидами фосфата, серы, формировать связи с глицерином, сахарозой, мочевиной, стеариновой кислотой и другими органическими соединениями. С водой образует устойчивые водородные связи, а с ионами — комплексные соединения, что влияет на активность окислительных реакций.

Повышенное сродство молекул DMCO с H_2O оказывает влияние на процесс зародышеобразования и роста кристаллов льда при замораживании. Повышение концентрации DMCO в жидкой фазе позволяет предупредить ее кристаллизацию вплоть до -80°C (см. рис. 18). Как видно, по мере увеличения содержания DMCO до 40 % сохраняется 80 % незамерзшей фазы при -80°C . Однако чаще на практике используют более низкие концентрации DMCO , так как это вещество в высоких концентрациях разрушает клетку. При содержании 10—15 % DMCO в среде замораживания происходит мелкочаечная кристаллизация, близкая по своей природе к аморфной.

Широко использовать DMCO в качестве криопротектора начали в 1959 г., когда Лавлок и Бишоп установили его защитную эффективность при замораживании спермиев. Сейчас под защитой этого криопротектора криоконсервируют разнообразные биологические объекты (клетки крови, костного мозга, спермин, микроорганизмы и простейшие, ткани и органы).

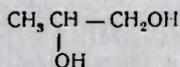
ДМСО широко применяется в медицине, и в частности в ортопедии и травматологии в виде очищенного фармакопейного препарата димексида. Летальная доза димексида — препарата, выпускаемого в нашей стране и разрешенного для клинического применения, составляет 2,5—3 г/кг массы. ДМСО лучше, чем глицерин, проникает в большинство биологических объектов. Этим обусловлено его широкое применение в качестве криопротектора для многих видов клеток и тканей, однако необходимо удалять из клеток перед их трансфузией.

В качестве криопротекторов используют растворы диметилацетамида, этиленгликоля и пропиленгликоля. Первое из этих веществ относится к классу амидов, два других — к классу спиртов. Структурные формулы, молекулярные массы и токсичность для организма этих веществ таковы:



Диметилацетамид применяется для низкотемпературного консервирования лейкоцитов и тромбоцитов и, в отличие от глицерина, обеспечивает лучшую сохранность замороженно-отогретых гранулоцитов. Этиленгликоль быстро проникает в клетки и в высоких концентрациях даже при 0 °С не приводит к повреждению определенных типов клеток (спермии, микроорганизмы). Эвтектическая точка водного раствора этиленгликоля составляет около —55 °С, т. е. он, как и глицерин, снижает токсическое действие «эффектов растворов» и способствует формированию аморфных кристаллов льда, не способных сильно повреждать клеточные структуры. Вместе с тем его практическое применение резко ограничивается из-за токсического действия на уровне организма.

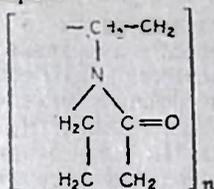
В связи с этим существенный интерес для криобиологов представляет двухатомный спирт 1,2-пропандиол или α-пропиленгликоль, М. м. 76,



Это соединение содержит функциональные группы —ОН и СН⁺₃. α-Пропиленгликоль как фармакопейный препарат применяют в качестве основы гидрофобных мазей и растворителя некоторых лекарственных средств. Этот гликоль обнаружен в печени, мозге крупного рогатого скота, яйцах морского ежа и в мышцах кролика, т. е. он является физиологическим метаболитом биохимических реакций. Биохимическое окисление 1,2-пропандиола идет двумя путями:

первый — распад до лактата через этап образования лактальдегида и метилглюкосяля, второй — окисление фосфорилированной формы гликоля через стадии образования ацетолфосфата, лактальдегидфосфата и лактальфосфата до лактата. Растворы 1,2-пропандиола обладают слабыми антиоксидантными и антибактериальными свойствами. Его токсичность гораздо ниже, чем глицерина, и при внутривенном введении ЛД₅₀ составляет 13 мг/кг для крыс и 6 мл/кг для кроликов. Этот спирт легко проникает в клетки, эффективно связывает воду, его водные растворы имеют низкую эвтектическую температуру. При замораживании проявляет свойства, присущие глицерину: связывает соли, воду, способствует формированию мелкозернистых кристаллов льда. 1,2-Пропандиол как криопротектор эффективен при консервации различных клеток и тканей. Так, его 7%-й раствор позволяет сохранять жизнеспособность спермиев быков, баранов и индюков на более высоком уровне, чем растворы ДМСО или глицерина. Эффективным 1,2-пропандиол оказался и для криоконсервирования эритроцитов человека, особенно в смеси с сахарозой.

Поливинилпирролидон (ПВП) относится к классу искусственных полимеров.



где n — степень полимеризации

Криопротекторная активность ПВП была открыта в 1962 г. М. Персидским и Рихардом, которые сообщили об успешном (85—95 % выживаемости) замораживании до -196°C клеток костного мозга под защитой этого вещества.

Растворы ПВП обладают высокими адсорбционными свойствами к воде и различным веществам, способностью комплексообразования по отношению к лекарственным препаратам, токсинам, красителям и солям. Поэтому ПВП в композиции с различными препаратами, особенно антибиотиками и гормонами, способствует их пролонгированному действию в организме. В медицинской практике препараты ПВП используют в качестве плазмозаменителя. Для этого применяют препараты со средним м. м. (12—40 кД), так как крупные молекулы ПВП плохо выводятся из организма. Молекулы ПВП представляют собой дифильные соединения, т. е. обладают гидрофильно-гидрофобными свойствами. В водных растворах молекулы этого соединения принимают хаотичную спиральную конфигурацию, что позволяет им гидратировать достаточное число молекул H_2O . Например, одна молекула ПВП гидратирует 3,3 ммоль H_2O . В силу хорошо развитых гидратационных свойств ПВП характер замораживания растворов изменяется — процесс кристаллизации смещается в более низкотемпературную область.

Такой низкотемпературный сдвиг кристаллизации, как видно из приведенных ниже данных, зависит от концентрации ПВП в среде замораживания.

Концентрация ПВП, % мас.	Точка замерзания, °С
5,0	-0,6
15,0	-1,0
30,8	-3,2
49,0	-15,0
60,5	Отсутствует

При быстром замораживании 50%-го раствора ПВП до -196°C в процессе оттаивания выявляется несколько структурных переходов (рис. 20). Первый связан с переходом из стекловидного состояния (T_c), второй — из девитрифицированного (T_d) и третий — с рекристаллизацией (T_p).

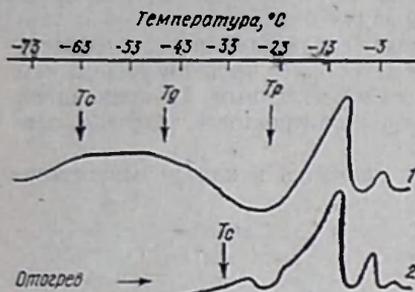


Рис. 20. Характер плавления 50%-го раствора ПВП после быстрого (1) и медленного (2) замораживания по данным дифференциально-сканирующей калориметрии:

T_c — стекловидное состояние; T_d — девитрифицированное состояние; T_p — зона рекристаллизации

При медленном замораживании растворов ПВП характер кривой при оттаивании не изменяется, за исключением перехода (T_p), происходящего при $-27...-33^{\circ}\text{C}$. Эти данные свидетельствуют о том, что процесс замораживания воды в присутствии ПВП сопровождается фазным изменением состояния молекул H_2O , формированием мелкозернистых шарикоподобных структур, которые обладают низкой устойчивостью и быстро трансформируются в аморфные структуры в зависимости от снижения

температуры. В связывании молекул H_2O важную роль играет степень полимеризации ПВП. Поскольку молекулы ПВП — хорошее комплексобразователи и способны предупреждать повреждающее действие гиперконцентрированных растворов солей в микроканальцах льда по мере вымораживания воды в лед, они оказывают защитный эффект на коллигативной основе. Вместе с тем криозащитный эффект ПВП связан с какими-то другими механизмами, которые пока не ясны. Часть молекул ПВП проникает внутрь клеток ретикулоэндотелиальной системы по типу пиноцитоза, где концентрируется по окружности мембраны. Они могут стимулировать функцию этих клеток, а также угнетать ее. С помощью ПВП получены вполне удовлетворительные результаты низкотемпературного консервирования культуральных клеток, некоторых штаммов микроорганизмов, клеток костного мозга. Хорошо переносят криоконсервацию с ПВП клетки китайского хомячка и эритроциты, если в среду добавляют глюкозу или альбумин. Механизм криозащитного действия ПВП связан с его коллигативными свойствами и способностью влиять на структуру воды, в результате

чего формируется аморфный лед. Растворы ПВП в довольно низкой концентрации в большей степени, чем другие крипротекторы (ПЭГ, ДМСО, сахароза), тормозят формирование кристаллов льда в системе вплоть до -20°C .

Полиэтиленоксиды, полиэтиленгликоли (ПЭО, ПЭГ) — искусственные полимерные соединения с химической формулой $\text{НОСН}_2 \times \text{X} (\text{СН}_2 - \text{СН}_2 - \text{O})_n \text{СН}_2\text{ОН}$, где n — степень полимеризации, варьирующая в широких масштабах. Низкомолекулярные ПЭГ и ПЭО с M . м. 300—6000 и их производные являются фармакопейными препаратами и применяются в качестве синтетической основы для мазей, таблеток, солиублизаторов и стабилизаторов суспензий и эмульсий.

Полиэтиленоксиды получают присоединением окиси этилена к этиленгликолю, поэтому продукт синтеза носит еще название ПЭГ. В процессе окисэтилирования этиленгликоля получают полидисперсную смесь полимеромологов различной молекулярной массы. При взаимодействии ПЭО с водой низкомолекулярные полимеры могут формировать одно- и двухфазные системы. При этом образуются либо непрерывная сеть водородных связей в системе H_2O — этиленгликоль, H_2O — ПЭО, либо межмолекулярные ассоциаты с быстрой скоростью распада. Важно, что с увеличением степени полимеризации ПЭО возрастает число молекул H_2O , присоединившихся к эфирным атомам O_2 , и повышается гидрофильность макромолекул. В силу этого гидратация 15%-го раствора ПЭО с M . м. 1500 в 10 раз выше гидратации ПЭО с M . м. 100 при бесконечном разведении. Каждое окисэтильное звено в ряду ПЭО с M . м. 100—6000 гидратирует по две, а концевые молекулы по две-три молекулы H_2O . Этим самым ПЭО способствует сохранению тетраэдрической координации молекул H_2O , т. е. стабилизирует пространственную структуру воды. Этот факт имеет важное криобиологическое значение, поскольку способность ПЭО стабилизировать молекулы H_2O может способствовать сохранению структуры биополимеров мембран в процессе замораживания — оттаивания, а также изменять характер кристаллизации водного раствора с образованием аморфного льда. Полиэтиленоксиды в растворе также хорошо связывают ионы и соли, повышают вязкость среды при охлаждении, что препятствует изменению ее рН и действию «эффекта раствора». Крипротекторная активность препаратов ПЭО различной M . м. проявляется при замораживании целого ряда биобъектов (табл. 12).

Обычно используют двухэтапное замораживание биобъектов под защитой 15%-х растворов ПЭО с последующим отогревом на водяной бане при $37-40^{\circ}\text{C}$. В последнее время разработан новый способ криоконсервации эритроцитов под защитой 15%-го раствора ПЭО с M . м. 1500, который включает предварительную обработку клеточной суспензии при 0°C и выдерживание при этой температуре для получения осмотически сжатых форм клеток, после чего суспензию быстро погружают в жидкий азот. Полимеромологи ПЭО, обладающие выраженными криозащитными свойствами, име-

Таблица 12. Крипротекторная активность ПЭО при замораживании некоторых биообъектов

Природа объекта	М.м.	Показатели жизнеспособности после замораживания — отогрева
Сывороточный альбумин	400	Сохранность структурных параметров
γ -иммуноглобулин	400	Сохранение иммунных свойств
Митохондрии печени крыс	400	Не влияет на состояние дыхания и окислительного фосфорилирования
Гемопэтическая эмбриональная ткань печени животных и человека	400	80—90 % жизнеспособных клеток
Клетки асцитной карциномы Эрлиха и Браун-Пирса	400	92 % жизнеспособных клеток, хорошая приживляемость
Клетки костного мозга человека и животных	400	80—90 % жизнеспособных клеток
Эритроциты человека и животных	1500	95—98 % жизнеспособных клеток, сохранение кислородтранспортных функций
Сперматозонды животных	400	80 % оплодотворяющей способности
Роговица человека и животных	400	Сохранность прозрачности при приживлении
Кожа человека	400	Сохранение приживляемости

ют низкую токсичность. По характеру своего взаимодействия с клетками ПЭО относятся к классу крипротекторов экзоцеллюлярного способа действия, за исключением низких фракций полигликолей.

Гидроксиэтилкрахмал (ГЭК) — соединение, получаемое в результате оксэтилирования водорастворимой фракции крахмала, представляет собой полидисперсную систему, охватывающую довольно широкий диапазон М. м. (250—500 кД). Растворы ГЭК так же, как и ПВП и ПЭО, формируют водородные связи с водой и стабилизируют ее решетку. При этом структурированность воды изменяется, и в процессе замораживания повышается способность ее молекул формировать аморфные кристаллы льда. Растворы ГЭК также оказывают стабилизирующее влияние на плазматическую мембрану клеток, однако механизм этого взаимодействия остается неисследованным. При охлаждении растворов ГЭК формируются мелкочастистые структуры концентрического характера, напоминающие структуры, возникающие при замораживании ПВП. Концентрированные растворы ГЭК как амфипатические соединения в воде формируют мицеллы и слои, похожие на жидкие кристаллы. ГЭК считается биологически инертным препаратом, поэтому его используют в качестве плазмозаменителя, гемостатического препарата или разделителя форменных элементов крови.

Крипротекторные свойства ГЭК были открыты в начале 70-х гг. (Д. Робсон, Витхерби), когда выяснилось, что этот полимер эффективен при замораживании клеток крови. Например, эритроциты обычно замораживают под защитой 14%-го раствора ГЭК с М. м. не более 60 000 и очень редко с М. м. 120 000, которые пред-

ставляют гетерогенную массу с преобладанием макромолекул с $M. m.$ 40 000. Растворы ГЭК в качестве криопротектора применяются также при криоконсервации других клеток животных и растений (клетки китайского хомячка, костного мозга экспериментальных животных), гранулоциты и лимфоциты крови, тромбоциты). Обнадеживающие результаты получены при замораживании гранулоцитов под защитой 4%-го ГЭК в смеси с 5%-м ДМСО. После отогрева замороженных клеток получено примерно 95 % морфологически сохраненных клеток. Аналогичные результаты получены при замораживании тромбоцитов человека в среде, содержащей 15—30%-й раствор ГЭК с $M. m.$ 65 000—80 000 и 20%-й раствор ДМСО. Вопрос о криопротекторных свойствах ГЭК окончательно не решен, так как результаты криоконсервирования клеток под защитой этого полимера весьма противоречивы. Поэтому необходимо дальнейшее изучение механизмов криповреждений и криозащиты клеток под влиянием ГЭК.

Существует целый ряд и других препаратов, обладающих криозащитными свойствами (см. табл. 9), однако их эффективность сомнительна и требует более детальных исследований. Хотя в таблицу веществ, обладающих криозащитными свойствами, введены и декстраны, однако эти *D*-глюкозные полисахариды проявляют более выраженные гемодинамические свойства как кровезаменители, чем криопротекторные. Единичные сообщения об эффективности декстранов как защитных веществ при криоконсервации эритроцитов и клеток костного мозга в дальнейшем не подтвердились. Поэтому декстраны следует скорее рассценивать как дополнительные вещества, присутствие которых в сложных криоконсервантах может явиться весьма целесообразным, поскольку они влияют на характер кристаллизации среды. В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины созданы криопротекторы на основе продуктов оксэтилирования спиртов. В частности, синтезированы оксэтилированные глицерины и оксэтилированные пентаэритриты с различной степенью полимеризации. Эти препараты действуют по типу экстрацеллюлярных криопротекторов и оказались эффективными при замораживании ядросодержащих клеток крови и костного мозга человека, животных. Однако целесообразность включения оксэтилированных глицеринов и пентаэритритов в криоконсерванты для различных объектов требует специальных исследований.

Стратегия и тактика исследований механизма действия криопротекторов находятся в прямой связи с изучением особенностей их взаимодействия с биомacroмолекулами и мембранами клеток, которые позволяют оценивать реальную эффективность того или иного соединения как криопротектора.

Взаимодействие криопротекторов с биомacroмолекулами и мембранами. При взаимодействии с изолированными белками, глицерин, формирующий прочные связи с водой, стабилизирует гидратную структуру вокруг белков, предупреждая этим самым возможность их криоденатурации в процессе замораживания. Структура

нативного глобулина и овальбумина в концентрированных растворах глицерина не нарушается, а, наоборот, даже несколько стабилизируется. При вымораживании свободной и частично связанной воды из биомолекул глицерин связывается с гидрофильными участками белков и формирует своего рода защитную оболочку вокруг белка или другого биополимера. Поскольку при замораживании дегидратация приводит к пространственному сближению макромолекул и модификации активных SH-групп, глицерин как осмотически деформирующий агент препятствует жесткой дегидратации молекул связанной воды белков и тем самым препятствует критическому сближению макромолекул. Очевидно, подобным действием на биомолекулы обладает и ДМСО.

Полимерные криопротекторы типа ПВП, ПЭО, ПЭГ, ГЭК и декстраны образуют с молекулами воды, входящими в координационную сферу макромолекулы, связи и этим самым значительно повышают вязкость микроокружения. При этом в водной среде происходит формирование мицеллярных структур, которые разворачиваются, и сольватация такой системы увеличивается, а вязкость жидкой фазы повышается. В силу этого, а также в результате непосредственного взаимодействия реакционноспособных групп белков и молекул связанной H_2O , структура биомолекул стабилизируется. Такое «замороженное» состояние биополимера в результате замены природы растворителя в вязкой среде приводит к изменению его функции. Если полимерные молекулы взаимодействуют с каталитическими белками, то они в присутствии криопротекторов не осуществляют своих функциональных назначений. По этой причине прекращается, например, ферментативная активность белков, локализованных в цитоплазме (в случае проникающего криопротектора) или на мембране, ингибируются деятельность ионотранспортирующих белков (например, $Na^+-K^+-Ca^{2+}$ -АТФаз), процессов синтеза ДНК, генерация и трансформация энергии в клетке. Поскольку кратковременное взаимодействие криопротекторов с биополимерами или мембранами носит «псевдотоксический» характер, то после их удаления структура и функция биополимеров восстанавливаются, т. е. оно носит вполне обратимый характер. Явление обратимого восстановления структурно-функционального состояния макромолекул, мембран и клеток после кратковременного экспонирования в эффективных растворах криопротекторов получило в научной криобиологической литературе название псевдотоксического эффекта криопротектора. В развитии и проявлении «псевдотоксического эффекта» важную роль играют природа криопротектора, его концентрация, время экспозиции с клеткой и температура. С повышением температуры и концентрации криопротектора увеличиваются шансы на скорейшее разрушение биообъекта. Если при температурах около $0^\circ C$ в сложных криоконсервантах, содержащих растворы глицерина или ДМСО, можно сохранять клетки 2—3 сут и более, а сложные органы — до суток, то при температурах $37^\circ C$ этот срок сокращается до минут или часов, так как при высоких температурах возникает выраженное токсическое дей-

ствие криопротекторов, вызывающее необратимые нарушения структуры и функциональной активности того или иного биобъекта.

Первичным барьером при взаимодействии криопротекторов с клеткой является ее плазматическая мембрана. Криопротекторы по-разному влияют на динамическую структуру мембран. Это зависит, во-первых, от природы криопротектора, его молекулярной массы и других физико-химических свойств, в частности способности (или неспособности) проникать внутрь клетки через плазматическую мембрану. Во-вторых, характер взаимодействия криопротектора с поверхностью клетки очень сильно зависит от состава эквивалентной среды, особенно температуры. Экспонирование клеток с криопротекторами при 0 °С вызывает иные реакции клеток, чем после экспонирования их при 22 или 37 °С. В-третьих, то или иное изменение взаимодействия криопротекторов с мембраной клетки зависит от природы клеток, их объема, формы и молекулярных характеристик поверхностной мембраны, в частности содержания в ней холестерина, насыщенных или ненасыщенных жирных кислот в составе липидного бислоя, состава гликокаликса и т. д. Такие криопротекторы, как ПЭГ с м. м. 300, 400, 600 и 2000, ДМСО, глицерин, этилен- и пропиленгликоли и их производные (диэтиленгликоль и дипропиленгликоль), в концентрациях 1—5 % независимо от их гидрофобности оказывают слабое влияние на текучесть мембраны клеток вблизи ее поверхности, хотя в определенной степени тормозят динамику полярных областей липидного бислоя. Это связано с частичной дегидратацией гидрофобной области мембраны либо за счет части связанной воды органическими растворителями. Если концентрацию указанных выше криопротекторов увеличивать в суспензии клеток до 15 %, то гетерогенность липидного бислоя резко возрастает за счет появления более текучих микрообластей. При дальнейшем повышении в среде концентрации криопротекторов могут нарушаться барьерные свойства плазматических мембран для ионов, мелких и средних биомолекул, например аминокислот, АТФ.

Направленность действия криопротекторов на мембраны клеток во многом определяется соотношением полярных и гидрофобных групп в их структуре. При этом молекулы криопротекторов могут встраиваться в область полярных головок липидного бислоя, вызывая эффект дегидратации, либо влиять на структуру связанной фракции воды мембраны. Это означает, что криопротекторы могут практически изменять упаковку фосфолипидов в бислое, вызывая сжатие молекул липидов, находящихся в жидкокристаллическом состоянии, или уменьшение плотности упаковки, если молекулы криопротекторов внедряются в гидрофобный слой мембраны.

Влияние криопротекторов на низкотемпературные переходы в мембранных белках и липидах зависит от их проникающей способности. При добавлении к клеткам проникающего криопротектора 1,2-пропандиола торможение подвижности водно-белковой поверхности мембраны становится на 5 °С ниже, чем при обычных условиях. При замораживании белков в присутствии проникающих

криопротекторов фазовые переходы в гидрофобных областях растянуты в достаточно широкой температурной зоне — от 10 до -35°C . Непроницающие в клетки ПЭГ с м. м. 1500 и 2000 также уменьшают температурозависимое структурирование гидрофобных полостей белков и увеличивают их конформационную жесткость, что связано с изменением температуры структурного перехода внешней воды мембран. Разрыхление гидрофобных областей белков под влиянием ПЭГ-2000 приводит к снижению температуры белок-липидных переходов в мембранах эритроцитов человека примерно на 10°C .

В присутствии ПЭГ изменяется также структурное состояние липидов бислоя. При замораживании эритроцитов кластеризация липидов в бислое выявляется уже при -8°C , а кристаллизация цитозоля — при -28°C . При добавлении растворов ПЭГ к суспензии эритроцитов структурно-фазовые переходы липидов сдвигаются в сторону более низких температур, т. е. они поддерживают текучесть мембран в зоне низких температур и снижают микровязкость липидного бислоя.

В процессе взаимодействия ПЭГ с мембраной происходит формирование сольватной оболочки из молекул криопротектора, которая влияет на процесс дегидратации клетки при охлаждении. Способность криопротекторов сохранять жидкокристаллическую структуру липидного бислоя мембран клеток при низких температурах играет определенную роль в предотвращении развития температурно-осмотического шока клеток при охлаждении и замораживании.

Чем более выражены гидрофобные свойства криопротекторов, тем эффективней они сглаживают фазовые перестройки липидов мембран, происходящие в диапазоне температур $37-0^{\circ}\text{C}$. Непроницающие внутрь клетки криопротекторы, например ПЭГ с М. м. 1500, 20, оказывают влияние на состояние белков цитозоля, а также цитоскелета клеток опосредованно, через процесс дегидратации клетки. Такое трансмембранное действие непроницающих криопротекторов связано с их дегидратирующей способностью и свойством влиять на нонтранспортирующие системы. Под влиянием непроницающих внутрь клетки полиэтиленгликолей происходит модификация липидного бислоя плазматических мембран клеток в ламелярные или полицилиндрические структуры, которые могут изменять их барьерные свойства. Поэтому роль молекул H_2O , модифицированных криопротектором, в инициировании перестройки липидов и белков достаточно велика. Исследования, проведенные с помощью ^2H -ЯМР, показывают (табл. 13), что с молекулами фосфатидилхолина максимально может связаться $\sim 45\%$ мас. H_2O , причем установление равновесия в системе достигается в течение 7—8 дней.

Молекулы криопротекторов в меньшей степени, чем воды, связываются с фосфолипидом, и время равновесия при сольватации липида криопротектором составляет около месяца.

Криопротекторы при взаимодействии с молекулами фосфолипидов нарушают их бислоюную упаковку, образуют мелкие агрегаты с измененной геометрией — так называемые зигзагообразные зоны,

которые хорошо обнаруживаются методами дифракции нейтронов, ^{31}P -ЯМР и криографией.

Этиленгликоль, ДФМ и ДМСО при взаимодействии с дипальмитоилфосфатидилхолином сдвигают температуру фазового перехода липида в сторону более высоких температур и увеличивают энтальпию перехода. Это в определенной мере связано со степенью сольватации фосфолипида и с более плотной его упаковкой по сравнению с водной дисперсией. Нейтронно-графические исследования показывают, что при сольватации фосфатидилхолина этиленгликолем и ДМСО наблюдаются существенное уменьшение толщины бислоя и сокращение расстояния между бислоями, однако при этом молекулярная и сегментарная подвижность фосфолипидов значительно не изменяется. Таким образом, криопротекторы могут взаимодействовать с полярной областью мембранных липидов, изменяя физические свойства компонентов мембран таким образом, чтобы обеспечить их стабильность в отсутствие воды. Если препараты фосфатидилхолина лиофилизировать в присутствии глицерина, этиленгликоля, ДМФ или ДМСО, то в высушенных липидах в виде вязкой массы остается соответственно при $\sim 95\%$ (глицерин), ~ 56 (этиленгликоль), ~ 1 (ДФМ) и $\sim 1\%$ (ДМСО) молекул криопротекторов, что может быть достаточным для сохранения структуры бислоя.

Проникающие внутрь криопротекторы существенно влияют на внешнюю и внутреннюю поверхности мембран клеток, экранируя заряды липидов и белков, что предохраняет клетки или липосомы от слияния даже в присутствии Ca^{2+} . Например, при добавлении $0,1 \text{ M}$ растворов этиленгликоля и глицерина к суспензии липосом или клеток практически полностью подавляется взаимодействие липидных бислоев мембран на первой стадии слияния, когда происходит только агрегация везикул (но не их слияние), несмотря на присутствие в среде $10\text{--}20 \text{ mM}$ Ca^{2+} . Растворы ДМСО обладают менее выраженным агрегационным действием, а сахароза, наоборот, резко активизирует процессы агрегации липосом (табл. 14), приготовленных из смеси фосфатидилхолин-кардиолипидов в соотношении $2:1$ (M/M).

Из табл. 14 видно, что наиболее выраженный ингибирующий эффект на все этапы процесса слияния оказывают глицерин в концентрации $0,01\text{--}0,05 \text{ M}$ и этиленгликоль в концентрации $0,01 \text{ M}$. Растворы ДМСО так же, как и сахароза, в повышающихся концентрациях, наоборот, способствуют агрегации липосом.

Механизмы взаимодействия криопротекторов с искусственными

Таблица 13. Количество молекул (M) криопротекторов (Кр), способных связаться с молекулами фосфатидилхолина (ФХ) при 4°C

Природа криопротектора	Количество связанного криопротектора	
	$M_{\text{Кр}}/M_{\text{ФХ}}$	Масса
Вода (контроль)	19,0	$\sim 45,0$
Этиленгликоль	1,85	$\sim 15,0$
Диметилформамид	0,85	$\sim 8,0$
Диметилсульфоксид	0,15	$\sim 1,5$

Таблица 14. Изменение оптической плотности липосом, приготовленных из смеси фосфатидилхолин — кардиолипин, в присутствии 30 мМ Ca^{2+} под действием различных криопротекторов

Концентрация криопротектора, М	Природа криопротектора			
	Глицерин	Этиленгликоль	ДМСО	Сахароза
0,01	0,007	0,027	0,055	0,144
0,05	0,007	0,080	0,085	0,069
0,10	0,048	0,048	0,065	0,135

Примечание. Контролем являлись величины оптических плотностей, полученных при добавлении 30 мМ Ca^{2+} без криопротекторов.

и природными мембранами до конца не изучены. Многие вопросы, касающиеся характера и природы молекулярных перестроек белков и липидов мембран, остаются неясными. В частности, отсутствуют данные о влиянии криопротекторов на состояние гликокаликса поверхности клетки, на белки цитоскелета и различные системы внутриклеточной сигнализации. Сравнительно мало данных о характере взаимодействия криопротекторов с ядерным материалом клетки и об участии их в изменении экспрессии генов в условиях осмотически-температурного стресса.

Криоконсерванты

Криоконсервантами следует считать многокомпонентные системы, включающие в свой состав криопротекторы и различные полифункциональные соединения, присутствие которых направлено на изменение характера кристаллизации, усиление коллигативных свойств криопротектора, смягчение его «псевдотоксического действия» и поддержание структурно-функциональных параметров биообъектов. Поэтому в состав криоконсерванта часто входят различные мембранные стабилизаторы, антиоксиданты и антиокислители, соли органических и неорганических кислот, активаторы метаболизма и соединения, активирующие процессы восстановления. Такие гетерогенные смеси часто готовят на основе существующих стандартных сбалансированных сред (Рингера, Дюльбекко, среды 199, Альсвеера, Рингер-Локка, Коллиза, Хенкса, Игла и др.) для урегулирования осмотических и других процессов, способствующих сохранению структурно-функциональных свойств плазматических мембран клеток.

Состав консервантов весьма variabelен, поскольку различные по своей природе клетки по-разному переносят замораживание в такого рода сложных средах. Например, клетки крови и костного мозга обычно эквilibрируют в консерванте типа ЦОЛИПК 11₄, содержащем, кроме 15%-го глицерина, маннит, раствор $NaCl$ ЭДТА- Na_2 . В состав подобного рода консервантов часто вводят сахара: глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу или рафинозу и их комбинации. Обязательным требованием при создании консервантов является их гипертоничность, так как такие растворы хорошо

и быстро уравнивают осмотическое давление, особенно после диффузии глицерина внутрь клетки. Сахара являются соединениями, регулирующими осмотические и метаболические процессы в клетках, способствуя тем самым более эффективной репарации нарушенных структур клеток крови в цикле замораживания — отогрева. В состав консервантов часто вводят предшественников нуклеиновых кислот (инозит, аденин) в комбинации с фосфатами и глюкозой, которые служат веществами, также способствующими активации восстановительных процессов. Комплексные среды, активирующие процессы восстановления поврежденных мембранных и метаболических систем клетки после замораживания — отогрева, получили название реставрирующих (табл. 15). Для усиления репарации замороженных эритроцитов после удаления из них глицерина применяли несколько типов реставрирующих растворов ПИГФ и его модификации. Их эффективность примерно одинакова, но в зависимости от вида клеток используют тот или иной раствор, который выбирают экспериментальным путем. Для целей консервации крови используют консерванты, в которые могут входить АТФ (80 мг), витамин Е (200 мг), инозин (400 мг) и глутатион (200 мг). При криоконсервации репродуктивных клеток рыб в состав консервантов входят: 12,5—10% -й раствор ДМСО, цитрат натрия, фруктоза, бикарбонат натрия, сернистый магний, NaCl, KCl, CaCl₂, соли фосфата, аминокислоты, лецитин и маннитол. Здесь возмож-

Таблица 15. Состав реставрирующих растворов для восстановления деконсервированных клеток крови

Состав раствора	Наименование реставрирующих растворов, мкм			
	ПИГФ	ПИГФА	ПИГФА с повышенным рН	ИГФА
Раствор А				
Пируват	50,0	50,0	50,0	—
Инозин	50,0	50,0	50,0	50,0
Глюкоза	100,0	100,0	100,0	100,0
Фосфат неорганический	50,0	50,0	50,0	50,0
Метиленовый голубой	—	—	—	1,0
Аденин	—	5,0	5,0	5,0
NaCl	9,0	9,0	9,0	9,0
pH	7,2	7,2	7,8—8,0	7,2
мосм/кг	650,0	650,0	650,0	600,0
Раствор В				
Пируват	—	100,0	100,0	100
Инозин	—	100,0	100,0	100,0
Глюкоза	—	100,0	100,0	—
Фосфат неорганический	—	200,0	200,0	200,0
Аденин	—	5,0	5,0	5,0
NaCl	—	9,0	5,0	9,0
pH	—	7,2	7,2	7,2
мосм/кг	—	850,0	650,0	450,0

ны различные комбинации веществ в зависимости от вида спермы рыб. В отдельных случаях в состав консерванта вводят вместо ДМСО этиленгликоль или 1,2-пропандиол.

Половые продукты сельскохозяйственных животных чаще всего замораживают также с использованием сложных суспендирующих растворов, в состав которых входят 5--10%-е растворы глицерина и ДМСО в качестве криопротекторов. Отличительной чертой этих криоконсервантов является то, что в их состав включается эмульсия желтка куриного яйца, которая в случае консервирования спермы рыб является неэффективной. Например, типичный консервант для разбавления спермы быков и барана содержит глюкозу, цитрат калия и натрия, фруктозу, гликокол, желток куриного яйца, антиоксидант, желатин, глицерин. Для тех или иных видов спермиев эффективным криопротектором может оказаться этиленгликоль или 1,2-пропандиол в комбинации с эмбриональной сывороткой. Сперму птиц консервируют цитратным раствором, который содержит глутамат натрия, лимонную кислоту и молоко пастеризованное, а для улучшения оплодотворяющей способности — калиевую соль гиадуриновой кислоты и 8—12%-й раствор этиленгликоля.

Для криоконсервации эмбрионов человека и животных чаще всего используют забуферную фосфатно-солевым раствором среду Дюльбекко, в которую вводят натрий-пируват, глюкозу, сывороточный альбумин, антибиотики и чаще всего 1,0—1,5 М раствор ДМСО либо реже глицерин.

Существуют консерванты для замораживания микроорганизмов: одни из них — более простые, другие — более сложные. Например, культуры *Saccharomyces Cerevisial* и *Str. tenebroris* лучше замораживать в сложных консервантах, содержащих 10%-й ПВП, 5%-й глицерин, ДМСО и глюкозу, либо в консерванте с лактозой (5 %) глицерином (10 %). Для осуществления лиофилизации *E. Coli* используют криоконсервант, в состав которого входят полипептон, экстракт дрожжей, NaCl, калий-фосфатный буфер, глутамат натрия.

При криоконсервации тканей (роговица, кожа, хрящи, кусочки эндокринных желез) при выборе криоконсерванта особенно актуальным является способность того или другого компонента проникать через плотную строму в клетку. Поэтому в случае криоконсервации тканей консерванты обычно содержат вещества, хорошо проникающие вглубь. Например, для замораживания роговицы в консервант на основе раствора Хенкса включают ДМСО или ПЭО с М. м. 400, забуференные аутологичной сывороткой. Хорошие результаты можно получить при эквilibрации роговицы в консерванте, содержащем глутатион — бикарбонатный раствор Рингера, альбумин, ДМСО и сахарозу (либо другой осмолитик) как осмотически активное соединение.

Для гипотермического хранения органов (сердца, почки, печени) в настоящее время разработаны довольно сложные консерванты и перфузаты. Например, для гипотермической консервации почек были предложены так называемые консерванты эндо- и экст-

рацеллюлярного способов действия (растворы С₁, С₂, С₃, С₄, С₅ Коллинза), которые обеспечивают жизнеспособность органа до 24—28 ч. Эти консерванты представляют собой сбалансированные солевые растворы, в которые дополнительно вводят гепарин, глюкозу, солянокислый лидокаин, феноксибензамин и альбумин. На основе этих растворов были предложены различные модифицированные варианты сред (например, растворы Сакса), которые предусматривают дополнительное введение веществ, продлевающих время переживания тканей при гипоксии (хлорпромазин, глюкокортикоиды, ингибиторы метаболизма типа аллопуринола и персантина, тразилол, фурасемид, папаверин). Существуют перфузионные консерванты, которые представляют собой коллоидные смеси, содержащие ПВП (в концентрации 1—12 %) и 30%-е растворы декстранов с М. м. 70—115 кД. Для гипотермического хранения почек П. Бельцером в 1968 г. разработан также перфузионный консервант, известный как криопресипитированная плазма. В его состав включены 12,5%-й раствор ДМСО, изопротеринол, гепарин, сернистый магний, флуоросерилаланин, метилпреднизолон. В дальнейшем этот консервант был видоизменен за счет выделения из цельного плазменного криопресипитата белковой фракции — плазманата, которая лишена γ -глобулина и очищена от посторонних примесей. Перфузат, приготовленный на основе плазманата, содержит дополнительные компоненты: инсулин, антибиотики, соли магния, гепарин, маннитол. Консерванты для гипотермического хранения других органов (сердце, печень) составлены по такому же принципу, как и перфузаты для консервации почек, но с некоторыми модификациями, учитывающими специфику структуры и функции органа. В последнее время П. Бельцером предложены новые прописи консервирующих растворов для гипотермической перфузии органов — так называемые *UW-G* и *UW-d*.

Для консервирования различных биологических объектов использовали разнообразные по природе и составу криоконсерванты, содержащие как криопротекторы, так и другие мембранотропные вещества, биокатионы, метаболиты и ингибиторы метаболизма, позволяющие улучшать состояние физиологических и метаболических систем клеток, подвергнутых замораживанию и отогреву.

Глава 7

КРИБИОХИМИЯ ФЕРМЕНТОВ И ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ

В клетке белки составляют не менее 50 % ее сухой массы и разделяются на простые, которые при гидролизе распадаются на аминокислоты, и сложные, дающие при гидролизе не только аминокислоты, но и другие органические продукты, называемые обычно простетическими группами белка. К их числу могут быть отнесены нуклео-, липо-, глико-, фосфо-, гемо-, флаво- и металлопротенды, которые содержат в качестве простетических групп РНК, фосфолипиды, гексозамины, фосфатные группировки, железопорфирины, флавиноклеотиды и различные виды микроэлементов в активных центрах. Молекулярные массы белков колеблются от 5000 до 1000 кД и выше.

В зависимости от конформационного состояния белки разделяются на фибриллярные, глобулярные и промежуточные. Первые являются достаточно устойчивыми, малорастворимы в воде и в разбавленных солевых растворах, вторые — легко растворимые и достаточно лабильные биополимеры. К числу глобулярных белков относятся почти все известные ферменты, антитела, гормоны и белки-транспортёры. Промежуточные белки структурой напоминают фибриллярные, но хорошо растворимы в воде и солевых растворах (например, миозин, фибриноген).

По структурно-пространственной конструкции в белках различают первичную структуру, которая отображает последовательность ковалентносвязанных аминокислотных остатков в полипептидной цепи; и вторичную, т. е. вытянутую или спиральную конформацию первичной структуры. Белки могут иметь третичную структуру, под которой подразумевается способ укладки полипептидной цепи, формирующей плотноупакованную структуру типа глобулярных белков. Следовательно, все типы ферментов и биологически активных соединений имеют как минимум третичную структуру. Термин «четвертичная структура» отображает более сложный способ расположения в пространстве отдельных полипептидных цепей в белке, которые не связаны между собой ковалентными связями и удерживаются за счет слабых взаимодействий (водородных, гидрофобных, электростатических, ван дер Ваальсовых сил). Такая пространственная структура полипептидных цепей придает высокую динамичность и функциональную подвижность белкам, которые выполняют каталитические, гормональные либо

другие функции в клетках и тканях. В силу указанного строения белки с четвертичной структурой обладают неустойчивостью к различного рода экзогенным воздействиям, способным изменять их микроокружение либо конформационное состояние полипептидных цепей в глобуле. К числу таких воздействий относятся температура, различные виды химических модификаторов типа криопротекторов, понижующее и другие виды излучений. Различают также белки с пятиричной структурой, подразумевая при этом расположение белка с четвертичной структурой в липидном бислое мембраны, например ион-транспортные белки, встроенные в мембрану, где липидное микроокружение является дополнительной надстройкой к их структуре и может регулировать их функциональное состояние наподобие простетических группировок.

Если белки в своем составе содержат более одной полипептидной цепи, то они называются олигомерными, а цепи, входящие в их состав — протомерами. Обычно протомеры в составе белков удерживаются при помощи слабых взаимодействий и могут легко диссоциировать при изменении тоничности среды и pH. Часто пользуются термином «субъединицы» того или иного глобулярного белка для обозначения функционально активной его части. Например, гемоглобин диссоциирует при разбавлении на две субъединицы, каждая из которых состоит из одной полипептидной цепи.

Подавляющая часть перечисленных выше белков, имеющих глобулярную структуру, функционирует в достаточно узкой области pH, тоничности среды и температуры. При переходе в критические области этих параметров в белках происходят структурно-функциональные изменения, известные как состояние денатурации. В этом состоянии многие глобулярные белки теряют свои свойства растворимости и способность осуществлять те или иные биологические функции (катализ, гормональная активность и т. д.). Подавляющее число глобулярных белков денатурирует при температурах выше 50—60 °С, а в некоторых случаях — при 10—12 °С. Процесс денатурации характеризуется разворачиванием полипептидных цепей из состояния клубка в состояние беспорядочных петель, нитей и микроклубков, хотя первичная структура белка при этом не претерпевает изменений. Существенно, что денатурация белковой глобулы может носить чаще всего характер обратимого процесса, если действие экзогенного воздействия не выходит за пределы критического, при котором разрушаются первичная и вторичная структуры. В процессе ренатурации каталитическая и другие специфические функции белка в этих случаях могут полностью восстанавливаться. Однако самопроизвольная ренатурация белков протекает по-разному, поскольку белки по своему строению весьма вариабельны. Например, такие олигомерные белки, как гемоглобин или аллостерические ферменты, способны к самосборке, другие, более сложные ферментные комплексы, ассоциируют довольно медленно.

Функциональное разнообразие белков весьма велико. Самую большую и наиболее важную по своему биологическому значению группу белков образуют ферменты, которых в природе насчитывает-

ся более тысячи. Каждый фермент катализирует определенный тип биохимической реакции. Каталитические белки, как правило, содержат каталитический центр, а некоторые также аллостерический центр, который несет регуляторные функции. Большую группу составляют так называемые структурные белки, которые являются каркасом для построения тканей (например, коллаген, эластин), биологических мембран, сократительных и транспортных систем (актин, спектрин, сывороточный альбумин, гемоглобин).

К белкам особого вида можно отнести также антитела или иммуноглобулины с M_n свыше 150 кД, которые участвуют в иммунных реакциях организма и имеют на четырех полипептидных цепях два центра для связывания антигена. Ряд глобулярных белков-ферментов может существовать в виде нескольких молекулярных форм, которые локализуются внутри одной и той же клетки. Такие множественные формы фермента называют изоферментами. Например, фермент лактатдегидрогеназа в тканях крыс существует в виде пяти изоферментов, которые катализируют одну и ту же реакцию. Они довольно четко различаются по величинам M_n для своих субстратов. Указанные выше пять изоферментов соответствуют пяти различным комбинациям двух различных типов полипептидных цепей, названных М- и Н-цепями. М-изофермент, содержащийся в мышечной ткани, сконструирован из четырех идентичных М-цепей, и его обозначают M_4 . Н-изофермент, содержащийся в миокарде, состоит из аналогичных четырех цепей, и его обозначают как N_4 . Остальные три изофермента представляют собой комбинации М- и Н-цепей. При смешивании М- и Н-цепей происходит самосборка ЛДГ с восстановлением ее специфической функции. Ряд ферментных и структурных белков существует в клетках в виде большого числа изоформ, представляющих собой комбинации различных субъединиц, синтез которых регулируется определенными генетическими локусами.

Влияние низких температур на изолированные ферменты

Температура оказывает существенное влияние на структуру и функцию ферментов. Действие отрицательных температур на ферменты носит сложный характер, так как при медленных скоростях замораживания белки подвергаются действию «эффектов раствора», а при быстром — действию кристаллов льда. Свойства белков, особенно с четвертичной структурой, могут измениться уже при охлаждении до 4 °С, поскольку при этих температурах изменяются некоторые физико-химические свойства воды, например ее плотность, которая поддерживает нативную конформацию белковой глобулы. Изменение свойств воды при 4 °С оказывает влияние на характер меж- и внутримолекулярных взаимодействий активных группировок биополимера, что изменяет его структурно-функциональные параметры. В общих чертах характер этих изменений заключается в повышении жесткости полипептидных цепей белка и

пространственном сближении его функциональных группировок. Возможно, с этим связано явление ингибирования функции и повышения стабилизации структуры каталитических белков при температурах вблизи 0°C. Так, например, для РНКазы максимальная стабильность возникает около 0°C либо даже чуть ниже, а для химотрипсина — около -12°C (рис. 21, 22). Относительно простые белки, имеющие устойчивую вторичную структуру (например, рибонуклеаза, трипсин, химотрипсин, пепсин), достаточно хорошо переносят быстрое замораживание вплоть до -196°C в соответствующих буферных растворах без значительной потери специфических функций. Это происходит потому, что белковые молекулы рибонуклеазы стабилизируются за счет S—S-сшивок полипептидной цепи.

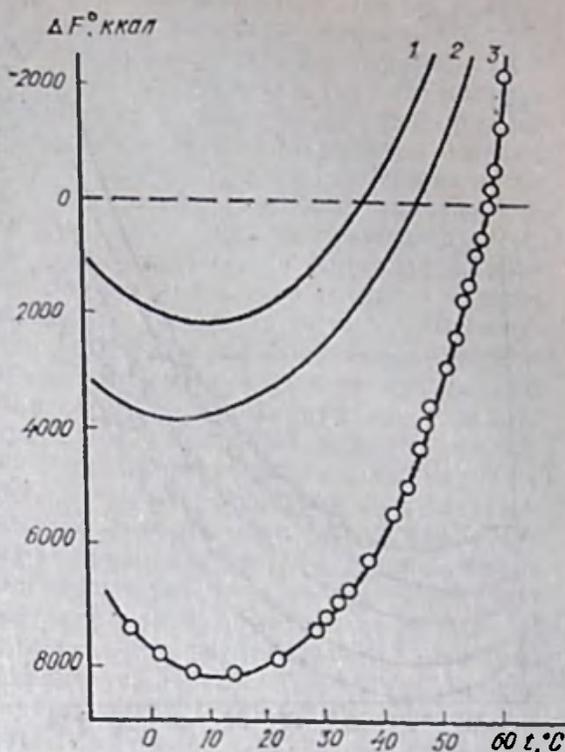


Рис. 21. Зависимость свободной энергии (ΔF°) денатурации рибонуклеаз химотрипсиногена от температуры при pH 1,0 и 0,1 M NaCl- (1); 2,0 и 0,01 M NaCl- (2); 3,0 и 0,00M NaCl- (3)

Однако при многократном замораживании — оттаивании и медленном отогреве выявляется определенная степень инактивации трипсина (табл. 16). После быстрого замораживания такие гидролитические ферменты сока поджелудочной железы, как липаза, амилаза и трипсин, хорошо и длительно сохраняются при температурах -20...-25°C под защитой глицерина.

Таблица 16. Активность растворимого трипсина поджелудочного сока после быстрого замораживания (300—400°C/мин) до -196°C и различных режимов отогрева, ед. Кунитца

Условия отогрева	Однократно	Пятикратно
Быстрое замораживание и быстрый отогрев при 37°C	0,783±0,012	0,514±0,020
Быстрое замораживание и медленный отогрев при 22°C	0,798±0,010	0,169±0,013

Примечание. Активность нативного трипсина в контроле составляла 0,796±0,021 ед.

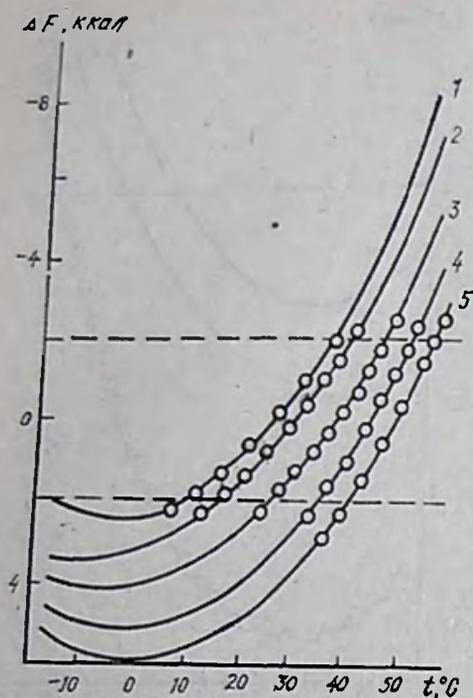


Рис. 22. Зависимость свободной энергии (ΔF°) денатурации химотрипсिनогена от температуры при рН 1,13 (1); 2,10 (2); 2,5 (3); 2,77 (4) и 3,25 (5). Пунктиром обозначена область малых экспериментальных ошибок

При замораживании сложных белков с четвертичной или пятиричной структурой характер криоповреждений изменяется. При замораживании белка с четвертичной структурой — лактатдегидрогеназы, которая катализирует терминальный этап гликолиза, до -25°C в 1 М растворе NaCl происходит диссоциация фермента на субъединицы. Однако после быстрого отогрева осуществляется спонтанная рекомбинация с образованием гибридных изоферментов. Такие внутримолекулярные перестройки фермента лучше всего выявляются при медленных или многократных режимах замораживания до -30 или -70°C , когда «эффект раствора» проявляет свое максимальное повреждающее действие на биомолекулу. Вместе с тем явление гибридизации изоферментных форм не происходит, если ЛДГ замораживать

очень быстро до -196°C , а также при замораживании в обессоленном растворе.

Существенным механизмом, лежащим в основе низкотемпературного повреждения белков с четвертичной структурой, является изменение таких химических параметров замороженной среды, как снижение рН, дегидратация биомолекулы, изменение тоничности среды, резкое концентрирование солей в эвтектической зоне. Хотя для дестабилизации белков с четвертичной структурой уже достаточно изменения одного показателя — рН, однако формирующийся в микрофазах закристаллизованной матрицы концентрированный солевой раствор является более чем достаточным фактором для распада белка на субъединицы. Растворы солей в концентрированном виде оказывают разрушающее действие на молекулы связанной воды, поддерживающие нативную конформацию белков, а также вызывают деполаризацию заряженных аминокислотных группировок, что также способствует утрате нативного состояния глобулярной структуры белка и разворачиванию его полипептидных цепей.

Явление потери структурно-функционального состояния нативной белковой молекулы под влиянием холода и «эффекта раствора» в криобиологии известно как криоденатурация белков, и оно отличается от высокотемпературной денатурации тем, что использование криопротекторов позволяет предотвратить процессы потери свойств биомакромолекул при охлаждении. При замораживании белков с четвертичной структурой обычно происходит распад их на изоферменты, которые *in vivo* или *in vitro* способны рекомбинировать. Процесс низкотемпературной гибридизации изоферментов сопровождается частичным снижением активности фермента, причем степень инактивации зависит от ионного состава среды, в которой проводят замораживание — отогрев. При этом потеря активности фермента связана с инактивацией в основном М-субъединицы, в то время как Н-полипептидные цепи остаются малозмененными. Это связано с наличием в составе Н-субъединицы прочно связанных молекул никотинамидадениннуклеотида, который придает стабильность полипептидной цепи. При медленном замораживании до -25°C такого фермента с четвертичной структурой, как каталаза, также наблюдается распад ее на субъединицы. Аналогичные процессы наблюдаются при замораживании ряда дегидрогеназ, например глутамат- и алкогольдегидрогеназы и некоторых видов полимераз (ядрышковая РНК-полимераза). Достаточно активным повреждающим белки фактором является дегидратация полипептидных цепей, поскольку при этом разрушается структура молекул прочно связанной воды, поддерживающей конформационное состояние белка. В результате этого нативная структура глобулы нарушается, и возрастает степень межмолекулярных контактов как внутри полипептидных цепей, так и между отдельными цепями. Согласно гипотезе Дж. Левитта, в условиях стерического сближения биомолекул создаются условия для быстрого окисления SH-групп до S—S-связей, т. е. происходит потеря специфических свойств каталитического белка. Значение низкотемпературной дегидратации белка как одного из существенных факторов повреждения его структуры и свойств хорошо проявляется при исследовании актомиозина и его фракций.

Криочувствительность ферментов в составе мембран и клеток

Каталитические и структурные белки, встроенные в мембрану, находятся в липидном микроокружении, которое является стабилизатором и регулятором их функции. Следовательно, активность ферментов в составе мембран будет в значительной степени зависеть как от структурной целостности активного и аллостерического центра глобулы, так и от физического состояния фосфолипидов, окружающего белок. Липиды, тесно примыкающие к белку, образуют так называемый слой аннулярных липидов, которые содержат большое число насыщенных жирных кислот, фазовые переходы которых из жидкокристаллического состояния в гель-фазу проис-

ходят уже при температурах, близких к 0°C . При переходе липидов в гель-состояние липидзависимый трансмембранный белок изменяет свою конформацию, в результате чего его функциональная активность снижается либо полностью прекращается. При температурах $0-4^{\circ}\text{C}$ в результате изменения физического состояния доменов аннулярных липидов формируются каналы утечки ионов, в том числе и K^+ , которые регулируют важнейшие метаболические процессы в клетке. Поскольку мембраны внутриклеточных органелл, например митохондрий, содержат в своем составе холестерин, при температурах $0-4^{\circ}\text{C}$ происходит фазовое разделение липидов, и это приводит к протонной проницаемости внутренней мембраны органелл и, как следствие, к полному торможению функции ферментов, участвующих в процессах дыхания и окислительного фосфорилирования. Если фазовое разделение липидов осуществляется в мембранах лизосом, то наблюдается массивный выход из органелл кислых гидролаз, которые оказывают «латентное» разрушающее действие на каталитические и структурные белки цитоплазмы.

Поскольку при замораживании происходят фазовые переходы и латеральное разделение основной массы фосфолипидов, создаются условия для непосредственного воздействия «эффекта раствора» на мембранные белки, так как при фазовом разделении липидов белки «выдавливаются» из липидного бислоя. Поэтому низкотемпературное повреждение ион-транспортирующих либо рецепторных белков плазматических мембран, мембран саркоплазматического ретикулума, ферментных комплексов мембран митохондрий (например, α -кетоглутаратдегидрогеназа, цитохром-С-редуктаза) особенно сильно возрастает при температурах фазовых переходов липидов. Повреждение мембрановстроенных ферментов особенно усиливается при медленном замораживании до -25°C , поскольку в диапазоне этих температур в каналах льда существуют жидкие микрофазы, в которых находятся гиперконцентрированные растворы солей, изменены тоничность и рН. Все это создает предпосылки для усиления свободнорадикальных процессов ПОЛ в мембранах. Процессы ПОЛ клеток, которые сопровождаются накоплением в мембране конечных (МДА, эпоксиды) и промежуточных продуктов ПОЛ, оказывающих токсическое действие на функции белков. При углублении процессов гидролиза аннулярных липидов может нарушаться конформационное состояние трансмембранных белков. Табл. 17 показывает, что при охлаждении эритроцитов кишечника крысы до 4°C или после медленного замораживания до -20°C $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ азы, локализованные в щеточной каемке или плазматической мембране, плохо переносят охлаждение до 0°C в течение двух недель, но достаточно термоустойчивы при замораживании до -20°C . Функция этих белков в составе других мембранных препаратов (митохондрии, микросомы) нарушается при охлаждении как до 0°C , так и более низких температур. Это различие связано с тем, что в мембранных липидах щеточной каемки и мембранах других препаратов содержится различное количество насы-

Таблица 17. Активность $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -зависимых АТФаз энтероцитов при различных видах охлаждения, % общей активности

Исследуемый препарат	Охлаждение до 4°C		Замораживание до -20°C	
	2-е сут	15-е сут	2-е сут	15-е сут
Щеточная каемка	82,0	19,5	76,0	55,0
Митохондрии	1,5	92,0	14,0	12,0
Микросомы	12,0	84,0	32,0	79,0
Плазматическая мембрана	78	43,0	82,2	85,6

щенных и полиненасыщенных жирных кислот, которые претерпевают фазовые переходы и разделение липидов при различных температурах. Особенно плохо переносят АТФазы медленные режимы замораживания, когда реализуется повреждающее действие «эффектов раствора». Если энтероциты замораживать быстро со скоростью $300-400^\circ\text{C}/\text{мин}$, то существенного снижения активности нон-транспортирующих ферментов не происходит. Однако реакция различных по своей природе мембраносвязанных АТФаз на замораживание не однозначна. В случае медленного замораживания энтероцитов, гепатоцитов или эритроцитов наблюдается ингибирование функции нон-транспортирующих АТФаз, а при замораживании мембран СПР, наоборот, наблюдается активация Ca^{2+} -АТФазы. Однако эта активация является кажущейся, так как Ca^{2+} пассивно элиминируется из цитоплазмы через дефекты липидного бислоя плазматической мембраны и активирует активный центр фермента. В целом механизм холодового разобщения гидролиза АТФ и транспорта Ca^{2+} внутрь везикул СПР можно представить в виде определен-

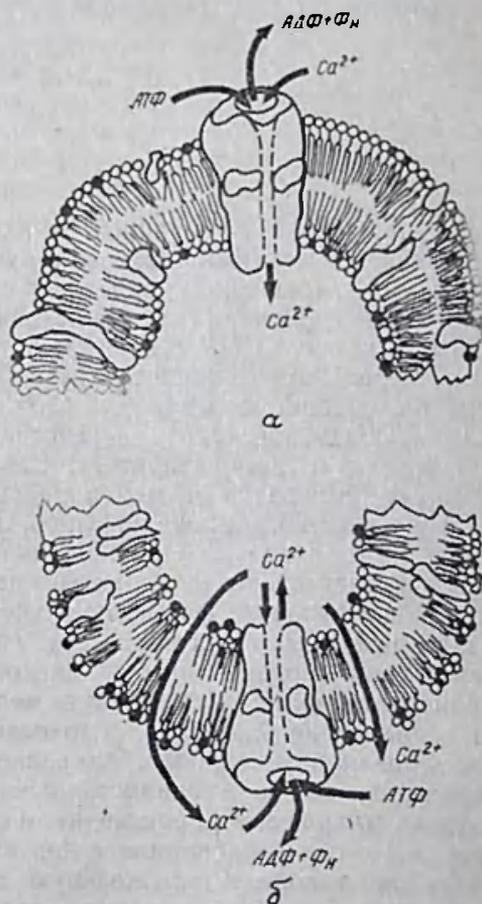


Рис. 23. Предполагаемая схема низкотемпературной активации Ca^{2+} -АТФ:

а — функционирование переносчика в физиологических условиях; б — после замораживания-отогрева

Таблица 18. Состояние активности различных ферментов после хранения при -20°C на протяжении трех месяцев

Состояние активности фермента			
Увеличение активности	Преходящее увеличение активности	Без существенных изменений	Уменьшение активности
Лактатдегидрогеназа печени, сердца и скелетной мышцы; малатдегидрогеназа печени; малик-фермент почки; пируваткиназа сердца	Глицеринкиназа; глицериндегидрогеназа; фосфофруктокиназа; глюкозо-6-фосфатаза из печени; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа почек	β -Оксибутиратдегидрогеназа; фосфоенолпируваткарбоксилаза; глутатионредуктаза из печени; сукцинат-цитохром- <i>c</i> -редуктаза из печени и мышцы; глюкозо-6-фосфатаза почки и фосфофруктокиназа мышцы	Цитохромоксидредуктаза; НАДН — цитохром- <i>c</i> -редуктаза, цитоплазматическая β -глицерофосфатгидрогеназа; фруктоза-1,6-дифосфатаза; β -глицерофосфат-дегидрогеназа; глутаминназа; аспаратамино-трансфераза, ацил-КоА-синтетаза; глутатионпероксидаза; глутатат-с-гидрогеназа

ных нарушений мембранной функции (рис. 23). В результате температурозависимых фазово-структурных переходов липидов и усиления перекисного окисления липидов барьерные свойства мембраны нарушаются, происходит утечка транспортируемого Ca^{2+} из везикул СПР как через систему активного транспорта, так и посредством пассивной диффузии через трансмембранные дефекты. Выходящий из микросом Ca^{2+} реактивирует активный центр Ca^{2+} -АТФазы, поскольку переносчик обладает высокой чувствительностью к иону-активатору. Следовательно, действие отрицательных температур на мембрановстроенные ферменты проявляется либо в их ингибировании, либо, наоборот, в активации, как это происходит после замораживания — отогрева СПР. Достаточно ясное представление о характере действия низких температур на мембраносвязанные ферменты может быть получено при исследовании латентных свойств лизосом, которые являются весьма чувствительными органеллами к низкотемпературным воздействиям. Если лизосомы из печени крысы медленно охлаждать до -196°C , то в диапазоне $0...-30^{\circ}\text{C}$ возрастает неседиментируемая активность различных гидролаз. Это свидетельствует о том, что при температурах, когда в закристаллизованной матрице сохраняются жидкие микрофазы, происходит нарушение проницаемости мембран через сформированные в них каналы, размер которых достаточен для выхода в окружающую среду кислых гидролитических ферментов. Подобные закономерности можно выявить, если медленно замораживать клетки до температуры $-25-30^{\circ}\text{C}$. В этих случаях в результате нарушения барьерных свойств мембраны из цитоплазмы элиминируют различные белки и ферменты. После замораживания клеток печени, почек, сердца или скелетной мышцы

до -20°C активность различных ферментов изменяется по-разному. Из табл. 18, в которой приведено 4 группы изменений активности ферментов, видно, что их реакция на низкотемпературное воздействие различна и четкой закономерности, связанной с природой, структурой каталитического белка или ткани, из которой они выделены, не выявляется. Остается неясным, почему, например, такой фермент с четвертичной структурой, как сукцинат-цитохром-с-редуктаза из печени и мышцы, не изменяет своих свойств после замораживания, а подобный ему по структуре белок цитохромоксид-редуктаза резко снижает свою активность после замораживания тех же тканей и в тех же температурных условиях.

После замораживания миокарда животных до -196°C под защитой ДМСО или глицерина активность щелочной фосфатазы резко подавляется, а креатининфосфокиназы не нарушается. Аналогичная картина выявляется при исследовании ферментов энергетического обмена после замораживания эритроцитов до -196°C под защитой полимерного криопротектора-гидрооксэтилкрахмала. В этом случае одни ферменты инактивируются, а другие сохраняют свою функцию. Остается пока не вполне ясным, с чем связаны эти различия в криочувствительности ферментов — с замораживанием клеток или тканей. Это может быть связано как с различиями в микроокружении белков в цитоплазме, так и с изоферментным составом белков, которые по-разному реагируют на низкотемпературное воздействие.

Тот факт, что клетки или ткани при замораживании теряют маркерные белки, в настоящее время широко используется в диагностических целях для определения топографии и глубины их низкотемпературного повреждения. Такие данные могут быть получены, например, для биохимической диагностики состояния клеточных суспензий после их замораживания, гипотермического хранения тканей или после перфузии органов. По характеру вышедших из клеток или тканей маркерных ферментов можно в определенной мере судить о глубине и обширности их криоповреждения.

Глава 8

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Структура, функции и модели мембран

Плазматические мембраны клеток являются чувствительными структурами к действию пониженных температур и различных осмотически активных веществ (криопротекторы, растворы солей). Биомембраны в составе живых клеток и тканей выполняют ряд важнейших функций (табл. 19).

Таблица 19. Основные функции биомембран

Природа мембран	Биологическая роль
Плазматические	Регулируют барьерные свойства мембран, электрическую возбудимость, иммунный ответ, инициируют прием, переработку и реализацию экзогенных и эндогенных сигналов. Служат местом прикрепления белков цитоскелета, которые регулируют форму и объем клеток
Эндоплазматические	Гладкие мембраны содержат ферментативные системы детоксикации ядов и токсинов, осуществляют синтез фосфолипидов и стероидов; шероховатые мембраны участвуют в эндоплазматическом синтезе белков на рибосомах
Лизосомальные	Гидролитические ферменты осуществляют деградацию белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот; обеспечивают фаго- и эндоцитоз
Аппарата Гольджи	Участвуют в хранении секретлируемых белков и биологически активных соединений
Микросомальные	Формируют детоксикационную цепь окисления ксенобиотиков
Митохондриальные	Генерируют макроэрги, а также трансформируют жирные кислоты, углеводы и аминокислоты
Ядерные	Осуществляют компартиментализацию хроматина, регулируют скорость поступления РНК в цитоплазму

Основные системы трансформации и аккумуляции энергии, регуляции обмена веществ, транспорта ионов и веществ локализованы в мембранах. Генерация нервного импульса, окислительное фосфорилирование, обезвреживание ядов и токсинов, сокращение и расслабление мышечного волокна, транспорт веществ и ионов, аккумуляция световой энергии при фотосинтезе, поглощение света сетчаткой, синтез белков и нуклеиновых кислот — вот некоторые метабо-

лические и физиологические процессы, протекающие с участием биологических мембран. Несмотря на разнородность выполняемых функций, биомембраны построены по единому принципу: их основу составляет непрерывный биомолекулярный липидный слой, в который погружены белки либо их комплексы. Способность мембран выполнять различные функции обусловлена их компартиментализацией различных участков цитоплазмы и ядра клеток, в которых локализованы различные специфические белки. Другая функция, свойственная также всем мембранам, — это организация нескольких ферментов в единый ферментный ансамбль, например формирование сложных цепей транспорта электронов в митохондриях и микросомах. Однако наиболее четко выражена функция мембран клеток в процессах переноса веществ, т. е. наличие систем сопряжения переноса ионов через мембрану с другими энергетическими системами, в основе которых лежит асимметричное строение мембран. К числу таких систем могут быть отнесены системы сопряжения переноса электронов и ионов; переноса ионов с появлением потенциала на мембране и переноса ионов с гидролизом или синтезом АТФ.

Благодаря использованию современных физико-химических методов исследования (ЭПР-спин-меченых меток и зондов, ЯМР высокого разрешения, сканирующей микрокалориметрии, рентгенодифракции под малыми углами, просвечивающей и растровой электронной микроскопии) в последнее время обнаружены тонкие функциональные и молекулярные процессы, протекающие на поверхности и в толще самой мембраны, выяснены зависимости функциональных процессов от степени гидратированности мембран, фазового состояния липидной матрицы, динамики белков и их микроокружения.

Многие структурные и функциональные проявления свойств мембран *in situ* и *in vitro* зависят от температуры, pH и тоничности среды. Эти факторы способны изменять свойства и состояние мембран, поскольку их составные компоненты ассоциированы главным

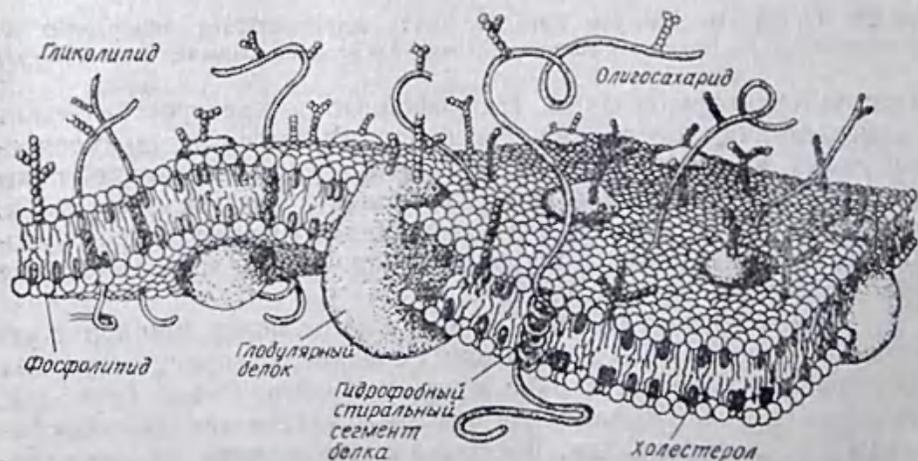


Рис. 24. Схема плазматической мембраны

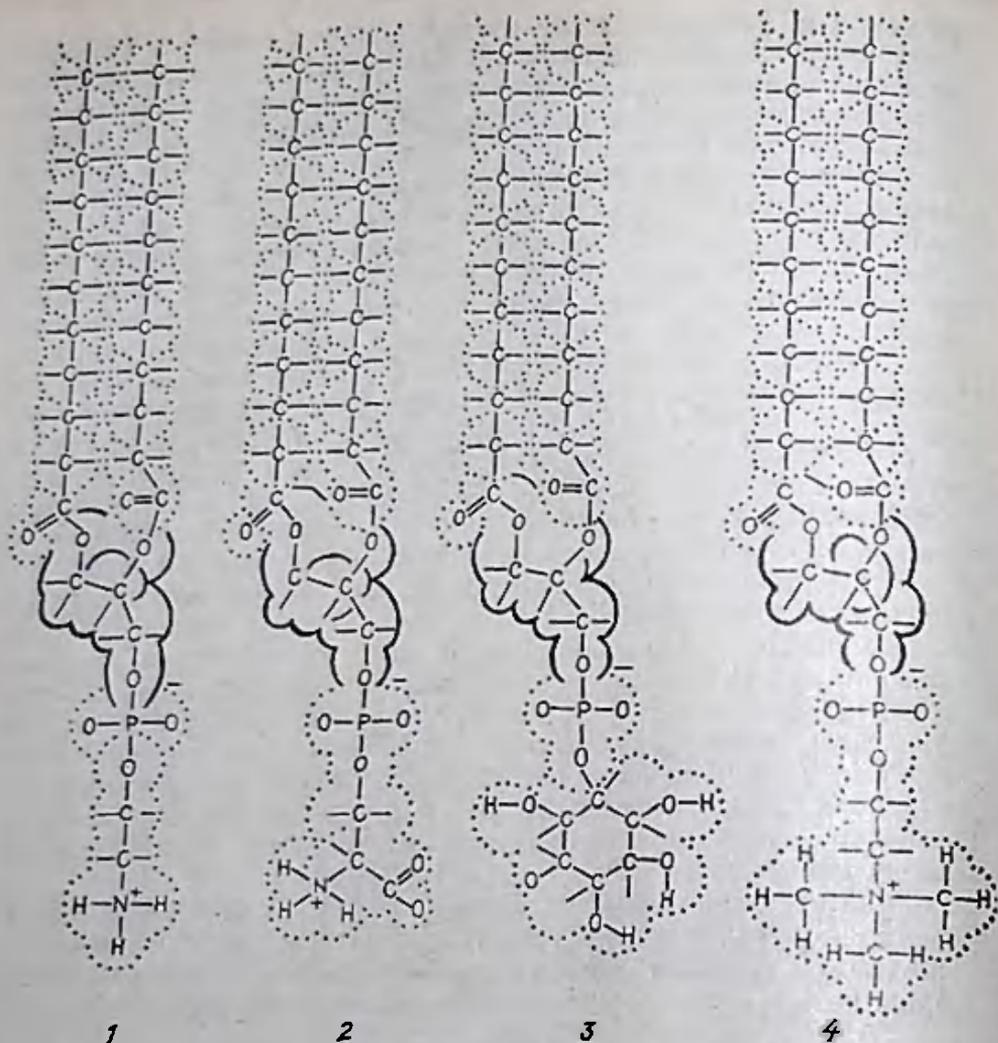
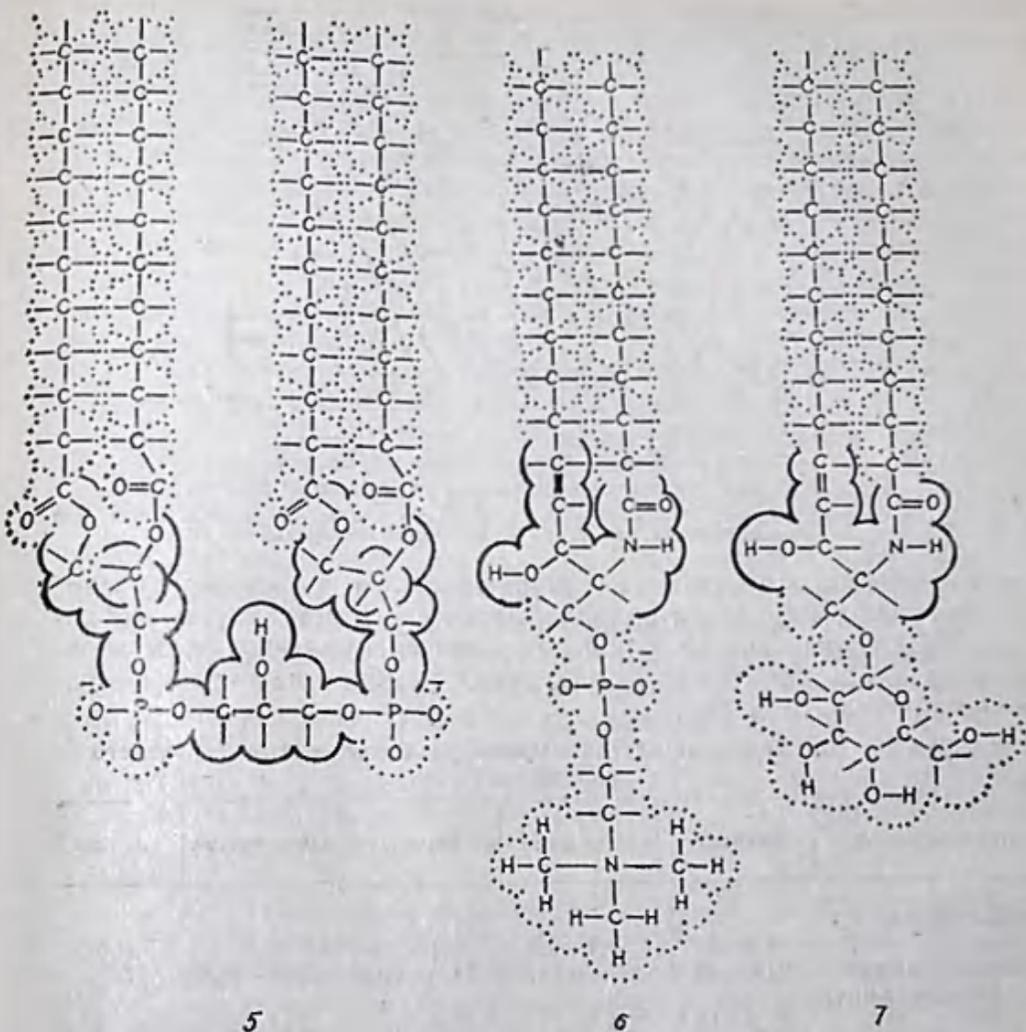


Рис. 25. Химические формулы наиболее часто встречающихся мембранных ли-
 1 — фосфатидилэтаноламин; 2 — фосфатидилсерин; 3 — фосфатидилинозит; 4 — фосфатидил

образом слабыми связями (гидрофобные и электростатические взаимодействия, водородные связи, ван-дер-ваальсовы и кулоновские силы), которые легко нарушаются при изменении ионной силы раствора, концентрации водородных ионов и температуры среды. Отрицательные температуры в мембранах вызывают более глубокие фазовые изменения и нарушения барьерных свойств, которые приводят к разрушению клетки.

Мембраны состоят главным образом из белков и липидов, а углеводные и другие виды комплексных соединений, присутствующих в мембране, находятся в виде минорных компонентов (рис. 24). В мембранах локализованы три основных класса липидов: фосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит и сфингофосфолипиды), гликолипиды



липидов:
 холин; 5 — кардиолипин; 6 — сфингомиелин; 7 — цереброзид

(цереброзиды, сульфатиды и ганглиозиды) (рис. 25). Цереброзиды являются производными церамида, углеводная часть которых состоит из моно- или олигосахаридов. Большое количество гликолипидов сосредоточено в составе мембраны эритроцитов. В мембранах могут содержаться плазмалогены, дифосфатидилглицериды (например, кардиолипин), диольные фосфолипиды, которые вместо глицерина содержат этиленгликоль или пропандиол. Стеронды мембран у животных представлены главным образом холестерином, а в грибах — эргостерином. Принципиальная схема структурной организации липидного бислоя представлена на рис. 26.

Липиды мембран содержат насыщенные и полиненасыщенные жирные кислоты разнообразной природы. Чаще всего это пальмитиновые, олеиновые, линолевые и стеариновые кислоты. Сборка

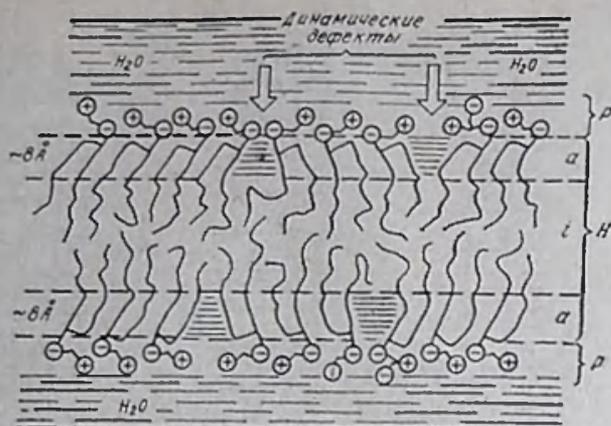


Рис. 26. Схема структурной организации липидного бислоя:

P — области полярных групп; *H* — область углеводородных цепей; *a* — упорядоченная, или «анизотропная», область; *i* — «изотропная» область

синтезированных в цитоплазме жирных кислот происходит на мембранах митохондрий или эндоплазматического ретикулула, а образование двойных связей — под влиянием специальных ферментов-десатураз. Липидный состав различных мембран варьирует достаточно широко (табл. 20).

Таблица 20. Липидный состав мембран различных клеток (% общего количества)

Природа липида	Эритроциты	Микросомы	Мнолиб	Митохондрии	<i>E. Coli</i>
Фосфатидная кислота	1,0—1,5	0,1—0,0	0,1—0,5	0,0	0,0
Фосфатидилхолин	23,0—19,0	59,0—64,0	11,0—10,0	39,0—48,0	0,0
Фосфатидилэтаноламин	20,0—18,0	15,0—17,0	20,0—14,0	27,0—28,0	65,0—95,0
Фосфатидилглицерин	0,0	1,0—2,0	0,0	1,0—0,0	1,0—0,0
Фосфатидилинозитол	2,0—1,0	9,0—11,0	1,0—0,0	7,0—8,0	0,0
Фосфатидилсерин	11,0—8,5	0,0	7,0—8,5	0,5—0,0	0,0
Кардиолипин	0,0	0,0	0,0	22,5—11,0	12,0
Сфингомиелин	19,0—17,5	0,0	8,5—6,0	0,0	0,0
Гликолипиды	12,0—10,0	0,0	26,0—28,0	0,0	0,0
Холестерин	24,0—25,0	6,0	25,0—26,0	3,0—5,0	0,0
Цереброзид	0,0	0,0	21,0—18,0	0,0	0,0
Цереброзидсульфат	0,0	0,0	3,0—4,0	0,0	0,0
Церамид	0,0	0,0	1,0—2,0	0,0	0,0
Неидентифицированные	2,0—3,0	1,0—0,5	12,0—13,0	0,0	0,0

Как видно, цереброзиды и церамид присутствуют только в миелиновых мембранах, а сфингомиелин и гликолипиды отсутствуют в микросомальных и митохондриальных мембранах. Бактериаль-

ные мембраны *E. Coli* содержат главным образом три класса липидов: фосфатидилэтаноламин, в меньшем количестве кардиолипин и очень мало фосфатидилглицеринов.

Состав жирных кислот по степени их насыщенности в различных мембранах широко варьирует. Устойчивость плазматических мембран клеток к воздействию низких и высоких температур, сдвигов pH и радиации обусловлена рядом факторов: разветвленностью и составом фосфолипидов, степенью их ассоциации с белками цитоскелета и гликопротеинов, локализованных в гликокаликсе, содержанием холестерина и т. д. Например, мембраны митохондрий животных или *E. Coli*, содержащие низкий процент холестерина, малоустойчивы к воздействию указанных выше экстремальных факторов. Наоборот, мембраны эритроцитов и *Halobacterium* достаточно устойчивы к действию неблагоприятных факторов среды, так как мембраны первых обогащены холестерином и гликопептидами, а вторых — разветвленными дифитанил-фосфатидил-глицерин-липидами, которые очень сильно повышают плотность упаковки липидов и тем самым придают повышенную устойчивость мембранам к действию экстремальных температур, кислот, щелочей, pH. У некоторых видов пойкилотермных животных в процессе адаптации к холоду изменяется жирнокислотный состав мембран таким образом, что в них начинают преобладать молекулы с полиненасыщенными связями, что поддерживает липидный бислой в жидкокристаллическом состоянии при температурах до 0 °С. Существует так называемая гипотеза адаптационной роли мембранных липидов, согласно которой возможность быстрой перестройки липидного бислоя мембран клеток в экстремальных условиях лежит в основе существования пойкилотермных животных при низких температурах.

Холестерин, локализованный в составе фосфолипидов мембран, участвует в обмене веществ и выполняет роль своеобразного пластификатора бислоя, регулирует упаковку и контролирует динамичность липидных молекул (подвижность, вращение, латеральную диффузию).

Важной особенностью мембран является асимметрия липидного бислоя, обусловленная различной природой включенных в монослой молекул липида. Существование асимметрии бислоя является важным фактором, регулирующим степень кривизны внешней мембраны, степени формирования в ней складок (кишков) и везикуляции мембраны. В нативных мембранах бислой фосфолипидов обладает двумя важными свойствами: высокой степенью упорядоченности и текучести, под которой понимают способность отдельных молекул фосфолипидов передвигаться вдоль своего слоя (латеральная диффузия), вращаться вокруг своей оси (ротационная подвижность) и переходить из одного монослоя в другой (феномен флипп-флопа). Фосфолипиды обладают достаточно выраженным полиморфизмом. В зависимости от температуры или степени гидратации липидной системы жирнокислотные цепи фосфолипидов могут быть упакованы по-разному. Так, в липидном бислое могут существовать

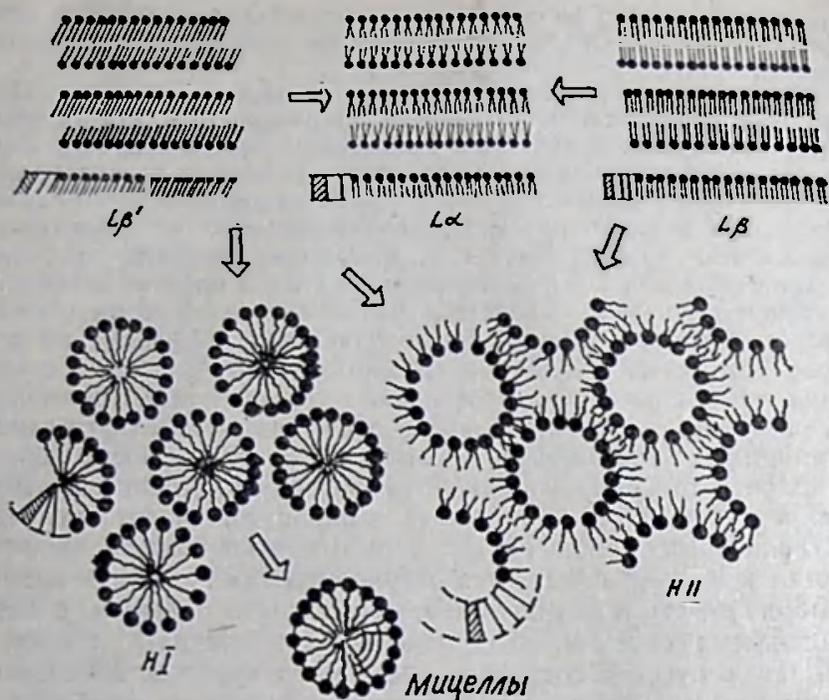


Рис. 27. Схема ламеллярных (L) и гексагональных (H) спектических мезофаз (поперечное сечение)

несколько типов ламеллярных структур, гексагональные или кубические фазы двух или трех типов (рис. 27). При низких температурах жирнокислотные цепи фосфолипидов претерпевают фазово-структурные превращения из жидкокристаллического состояния в гель-фазу, при которых жирнокислотные радикалы принимают состояние транс-изомеров, а при повышении температуры — транс-гош-изомерное состояние, которое характеризуется увеличением подвижности жирнокислотных радикалов. Фазово-структурный переход из состояния гель — жидкий кристалл сопровождается существенным уменьшением толщины и увеличением объема мембраны, а также скачкообразным повышением подвижности углеводородных атомов.

Мембранные белки представлены тремя основными классами: интегральные, пронизывающие толщину мембраны, периферические, локализованные на внешней или внутренней (цитоплазматической) поверхности, и промежуточные, т. е. белки, которые погружены в один из липидных монослоев. Многие интегральные белки мембран окружены аннуляриями (связанными, иммобилизованными) липидами, которые влияют на конформационное состояние и пространственную конфигурацию белка. Аннуляриные липиды, непосредственно примыкающие к интегральным белкам, отличаются очень низкой подвижностью, так как содержат много насыщенных

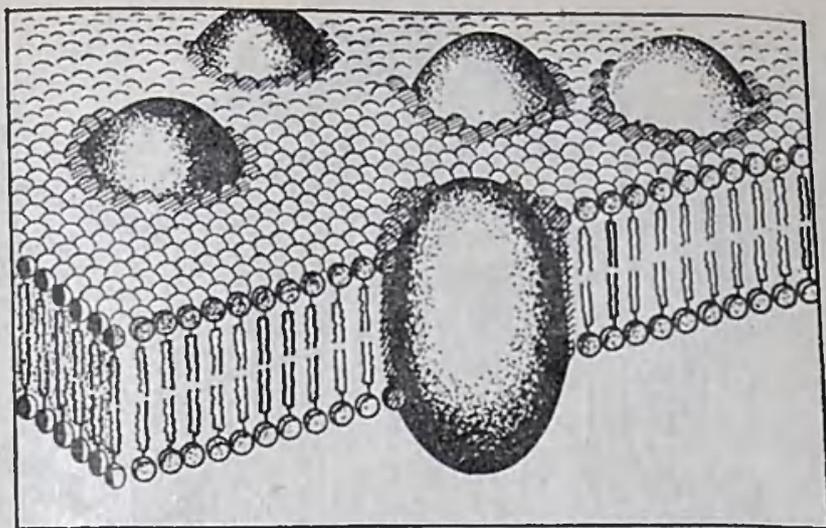


Рис. 28. Расположение аннуляриных липидов вокруг интегральных белков плазматической мембраны

жирнокислотных цепей (рис. 28). Поэтому липиды, окружающие, например, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазу, претерпевают фазовые переходы из жидкокристаллического состояния в гель-фазу в температурной области до 0°C . В мембране находятся также белки, аннуляриные липиды которых содержат, наоборот, большее количество ненасыщенных жирных кислот в цис-конфигурации, что обуславливает более низкую температуру фазового перехода из жидкокристаллического состояния в гель-фазу. Поэтому энергия конформационных переходов белков в мембране во многом зависит от микровязкости аннуляриных липидов.

Периферические белки либо представляют собой маркерные ферменты мембран, либо формируют белковый цитоскелет (микрофиламенты, микротрубочки), который регулирует форму и объем клеток, их динамику и метаболизм. Такого рода белки, содержащие в своем составе сократительный белок актин или тубулин, способны изменять толщину и другие геометрические параметры мембран. Период обновления белков в составе мембраны составляет от 2 до 5 дней.

Периферические белки в мембране связаны с одним из монослоев липидной матрицы и регулируют таким образом ее способность к эластической деформации, что способствует лучшему функционированию мембранных макромолекулярных комплексов (рецепторы, нонтранспортные системы и т. д.). Периферические белки, взаимодействующие с одним из липидных монослоев, влияют на уровень кривизны мембраны, т. е. способствуют сжатию одного монослоя и расширению другого.

Например, в эритроцитах периферические белки примембранного слоя (спектрин, актин, белок полосы 4.1 и др.) образуют ионные

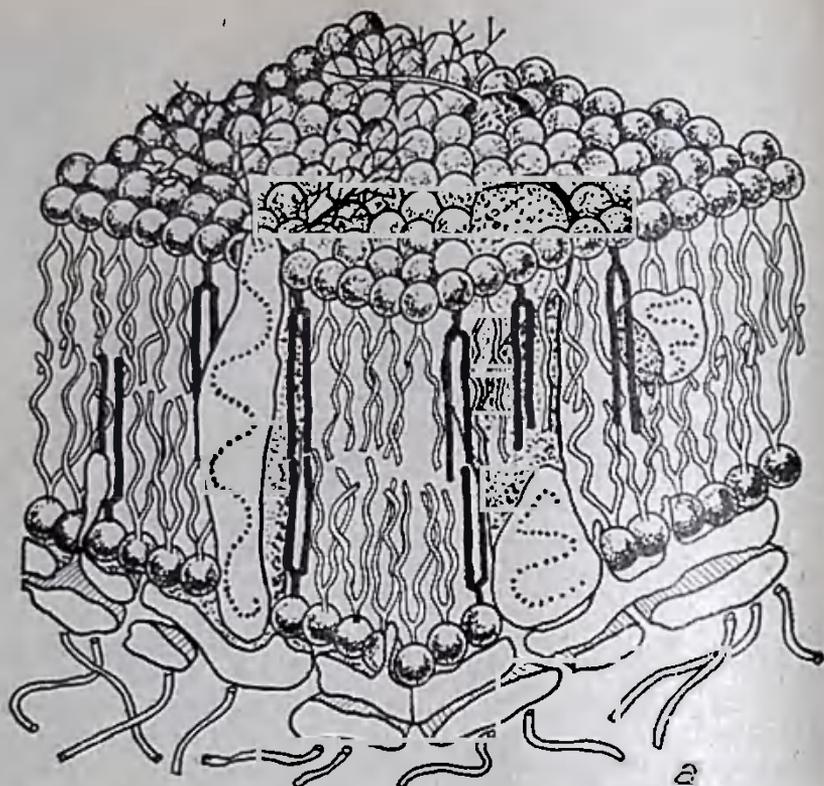
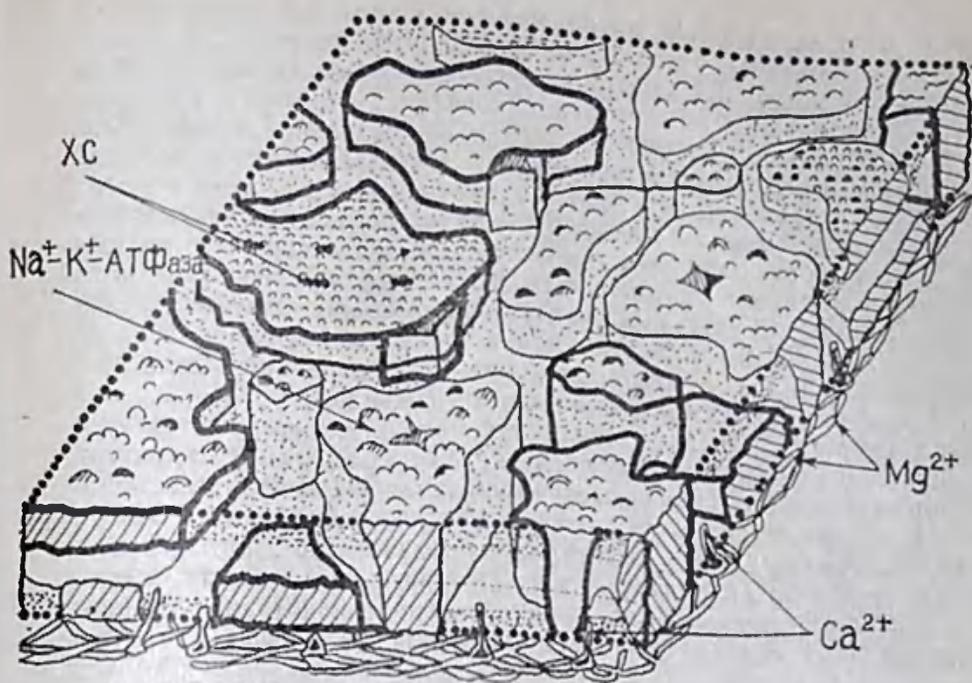


Рис. 29. Молекулярная организация плазматической мембраны

связи с фосфолипидными молекулами бислоя и специальными якорными белками, формируя сложную трехмерную фибриллярную сеть, которая модулирует вязкоупругие и барьерные свойства клеточной мембраны.

Такая сеть в нативных клетках находится в несколько напряженном состоянии и регулируется уровнем АТФ, температурой, величиной внутриклеточного рН, а также активностью протеаз и кальмодулина, контролирующего соотношение в клетке Ca^{2+} . Температурно-осмотическое воздействие нарушает ионное равновесие и фонд АТФ в клетках, что вызывает соответствующую реакцию со стороны белков цитоскелета.

Углеводные компоненты мембран в самостоятельном виде в составе мембран не обнаруживаются, а входят в состав белков, формируя гликопротеины и протеогликаны, или липидов (гликолипиды). Углеводно-белковые комплексы мембран в суммарном виде называются гликоконъюгатами и обычно располагаются на внешней поверхности мембраны. К числу типичных гликоконъюгатов относятся, например, антигенные детерминанты групп крови (гликофорин эритроцитов). Гликопротеины мембран участвуют в механизме адгезии клеток и способствуют формированию многоклеточ-



δ

клеток по Зингеру—Никольсону (а) и Уайту (б)

ных ассоциатов. Основными белками, регулирующими эти свойства клеток, являются лектины (например, коפקоваллин А), обладающие высокой способностью к связыванию углеводов.

Структурные модели. Несмотря на разнообразие функций мембран, их основу во всех случаях составляет биомолекулярный липидный слой с расположенными на его поверхности или в толще белками. Слой белка и слой липида связаны между собой полярными группами, а углеводородные радикалы жирных кислот обращены внутрь мембраны и взаимодействуют гидрофобно. Наиболее популярная и достаточно хорошо обоснованная модель мембраны (рис. 29), представляет собой трехслойную структуру. На ее внешней стороне расположены белки, белково-углеводные и белково-липидные комплексы, образующие гликокаликс, т. е. своеобразное молекулярное сито, участвующее в регуляции транспорта веществ, межклеточных контактов и иммунных реакций. На внутренней поверхности мембран закреплены белки цитоскелета, которые обеспечивают динамику клетки и поддержание ее формы и объема. Модель мембраны, описанная Зингером и Никольсоном, постулирует, что клеточная мембрана представляет собой асимметричную конструкцию из липид-белковых мозаичных комплексов, в которой липи-

ды служат двухмерным матриксом для белковых и других макромолекул, например гликолипидов, гликопротеинов. Белки, погруженные в липидный матрикс, регулируют селективный обмен веществ с внешней и внутренней средами, формируя полярные трансмембранные нонтранспортирующие каналы, специфические рецепторы и сложные системы транспорта метаболитов и источников энергии. Подвижность белков в мембране сильно зависит от их природы, молекулярной массы, а также микровязкости аннулярных липидов. Гидрофобные участки белков обычно внедрены в жирнокислотные радикалы липидов, а гидрофильные обращены в водную среду (рис. 30). Белки и их комплексы способны передвигаться в липидном бислое в горизонтальном и вертикальном направлениях. Молекулы липидов в мембране являются высокодинамическими структурами и находятся в постоянном движении.

Жидкокристаллическая мозаичная модель биомембран предусматривает существование определенного баланса между структурной организацией белков и состоянием жидких мембранных липидов. Мембранные белки для осуществления своих функций могут свободно передвигаться и вращаться в пределах липидного матрикса, т. е. мембрана рассматривается как высокодинамическая структура, физико-химическое состояние которой во многом зависит от температуры, рН и тоничности среды (рис. 30).

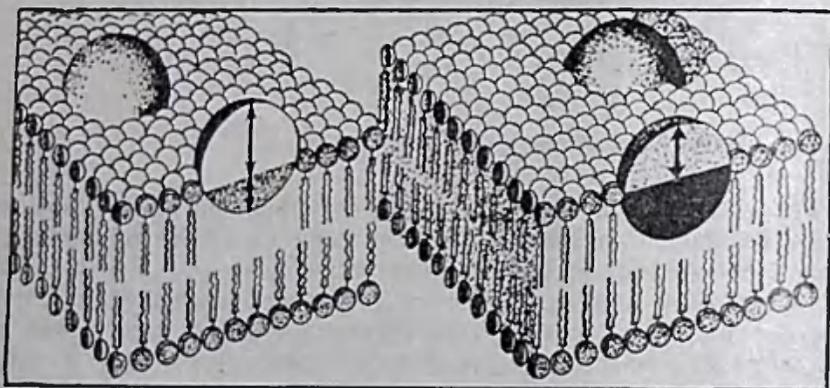


Рис. 30. Схема вертикальной транслокации белковых молекул в липидном бислое при температурно-осмотическом воздействии

Стабильность мембран обусловлена межмолекулярным взаимодействием ее компонентов, которые ассоциированы главным образом за счет слабых связей. Основными типами взаимодействия в мембране являются гидрофобные, формирующиеся между неполярными группами липидов, характер и сила которых зависят от длины (размеров) жирнокислотных радикалов и наличия ненасыщенных двойных связей. В присутствии ненасыщенных и сильно разветвленных липидов в мембране сила гидрофобных взаимодействий ослабевает, поскольку силы Ван-дер-Ваальса снижаются.

Водородные связи имеют большое значение в ассоциации компонентов мембран, причем определенные участки в липидах и бел-

ках способны акцептировать или отдавать H^+ , образуя водородные мостики. Электростатические (ионные) взаимодействия играют важную роль в связывании основных белков с кислыми фосфолипидами.

Например, спектрин эритроцитов, ассоциированный с фосфатидилсеринном с помощью Ca^{2+} -мостиков, при сдвиге рН или ионного равновесия внутри клетки может открепляться от якорных белков плазматической мембраны. При изменении структуры липида белок может претерпевать конформационные переходы, т. е. природа липидного окружения и его фазовое состояние (бислой, ламеллы, инвертированные мицеллы) влияют на транслокацию белков в мембране и их функцию.

Джейн и Уайт выдвинули гипотезу так называемой дискретно-платформенной модели мембраны, суть которой состоит в том, что в жидкокристаллическом липидном бислое расположены не отдельные молекулы белков, как это предусматривалось в модели Зингера—Никольсона, а ряд относительно стабильных мелко- или крупномасштабных доменов, которые состоят из разнородных по своему составу белков или их комплексов, включая холестерин и другие компоненты (рис. 30, б). Указанные выше домены могут свободно передвигаться в жидкокристаллическом поле липидов по поверхности, а также в вертикальном направлении, т. е. способны погружаться в толщу мембраны. При этом упорядоченные агрегированные белковые домены разделены полями относительно жидких липидов и могут пронизывать липидный бислой на всю глубину либо локализоваться в одном из монослоев. Хотя размер, форма, время существования, а также подвижность и скорость обмена молекул в пределах упорядоченных белковых доменов точно не определены, важно то, что они могут быть организованы в двумерную плотноупакованную решетку с близкими или эквивалентными единицами, тогда как в разупорядоченных областях эти единицы организованы более или менее случайно.

В различных мембранах клеток отношение площадей, занимаемых белковыми и липидными доменами, довольно широко варьирует. Так, в миелине оно составляет 0,43, а в эритроцитарных, печеночных, митохондриальных мембранах — 2,50. В бактериальных мембранах оно значительно выше (4,80). Предполагают, что участки между плотноупакованными доменами и разупорядоченными зонами жидкокристаллических липидов, формирующие междоменные границы, обладают высокой механической устойчивостью и могут подвергаться деформациям до определенной величины, не нарушая целостности мембраны. Однако при критическом температурно-осмотическом воздействии в этих участках может произойти нарушение непрерывности липидного матрикса в результате формирования в нем сквозных трансмембранных дефектов. Как в плотноупакованных доменах, так и в разупорядоченных зонах липидов существуют дефекты структуры (точечные разрывы, дислокации, субструктурные фазы), которые, по сути, являются трансмембранными каналами, через которые осуществляется облегченный транс-

порт веществ. Такие дефекты могут возникать в результате компрессии, натяжения, действия высокой или низкой температуры, а также осмотически- или иммуноактивных веществ. Таким образом, согласно данной модели, изначально исходная структура мембраны клетки представляется дефектной, поскольку в ней существуют неоднородные липидные монослои, характеризующиеся неодинаковой вязкостью в различных зонах липидного бислоя. Одни из них содержат чистые липиды, а другие — агрегаты, состоящие из липид-белковых, белок-белковых комплексов, которые, передвигаясь по мембране, образуют пузырьки, складки, бляшки и другие виды деформаций, обнаруживаемые с помощью электронной микроскопии. Время, скорость передвижения и размеры сосуществования плотноупакованных и разупорядоченных зон зависят от температуры и pH, которые, как известно, изменяют свои величины в процессе низкотемпературного воздействия и цикла криоконсервирования. В целом эти процессы контролируются текучестью липидной фазы и ее агрегатным состоянием. Перераспределение агрегированных доменов в липидном бислое, связанное с воздействием экстремальных температур, может изменить проницаемость мембраны, транспорт через нее и ряд других параметров, влияющих на жизнеспособность клетки. Модель мембраны со смешанным матриксом, формирующим различные по своей плотности домены, предусматривает, что они отличаются подвижностью в разнородных по своей упорядоченности областях липидов, которые граничат с плотноупакованными участками бислоев, находящихся в состоянии геля. Следовательно, мембрана представляется как нерегулярная замкнутая система, в которой расположен липидный матрикс из смеси различных фаз. Такой гетерогенный матрикс более стабилен при перепадах температур, давления, стрессах и осмотических напряжениях по сравнению с чистыми фазами, содержащими исключительно твердые или жидкие молекулы. Дискретно-платформенная модель мембраны предусматривает существование бислоевого липидного матрикса, в котором смешаны различные липидные фазы, как находящиеся в жидкокристаллическом состоянии, так и твердые домены с включенными белковыми или липид-белковыми агрегатами, избирательно регулирующими процессы транспорта веществ, адгезию, агрегацию, слияние и трансформацию клеток. Платформенная модель мембраны наиболее близка к реальной природной структуре, поскольку существование специфически упакованных белковых и белок-липидных платформ в липидном бислое хорошо согласуется с многообразием функциональных ответов мембраны на внешние воздействия.

Модификация мембранных белков

При замораживании происходят два типа структурных изменений белков в мембранах: миграция в плоскости липидного бислоя и агрегация в белковые домены. При этом возможны вертикальная

транслокация и другие виды перемещения белков, зависящие от фазово-структурного состояния липидной матрицы (см. рис. 30). При завершении кристаллизации липидов происходит сильное латеральное сжатие бислоя, в результате чего поверхностные и частично погруженные белки «выдавливаются» в липидный матрикс. Процесс агрегации белков зависит от латерального разделения липидов в мембране, а их сегрегация — от характера поперечной асимметрии липидов. Например, при охлаждении лимфоцитов в мембранах наблюдается «вымораживание» белков из одного монослоя в другой перпендикулярно плоскости мембраны.

Важным фактором, обуславливающим вертикальную или горизонтальную транслокацию белков, является асимметричное распределение холестерина, который ограничивает латеральную диффузию белков и фазовое разделение липидов. Асимметричное «вымораживание» белков всегда предпочтительнее происходит в мембранах, которые истощены по холестерину, например в митохондриях. Наоборот, в эритроцитах, мембрана которых обогащена холестерином, миграция белков не так выражена. В наружной мембране митохондрий, истощенной по холестерину, латеральная агрегация белков начинается при 8°C и становится максимальной при -6°C , в то время как во внутренней мембране, содержащей небольшой процент холестерина, эти процессы начинаются лишь при -8°C и завершаются при -13°C .

В природных мембранах существуют механизмы, предотвращающие белковую агрегацию и тем самым защищающие эти структуры от повреждающего действия низкотемпературных факторов, например «эффедов раствора». Так, например, в мембранах *Halo-bacterium* содержится большое количество разветвленных жирных кислот (фитанильные и бифитанильные соединения), которые при фазовом переходе образуют плотную решетку, предотвращающую выдавливание белков из липидного бислоя при отрицательных температурах. Принципиально различают несколько типов организации мембранных белков (рис. 31), которые могут по-разному повреждаться при охлаждении, замораживании и отогреве: белки, погруженные в липидный бислой, как, например, бактериородопсин (рис. 32), будут с большей вероятностью сохранять свои специфические свойства при замораживании, чем белки, гидрофильная часть которых экспонирована во внешнюю среду, где она будет подвергаться действию «эффедов раствора» и кристаллов льда.

Белковые агрегаты, «выдавленные» в наружный монослой, наиболее уязвимы для действия таких повреждающих факторов, как высокая осмотическая активность среды, pH и дегидратация.

Некоторые интегральные и периферические белки мембран играют важную роль в сохранении структурно-функционального состояния клеток после охлаждения, замораживания и отогрева. К числу таких макромолекулярных комплексов следует прежде всего отнести аденилатциклазную систему, нонтранспортирующие белки и белковый цитоскелет, которые регулируют устойчивость клеток к воздействию охлаждения и замораживания.

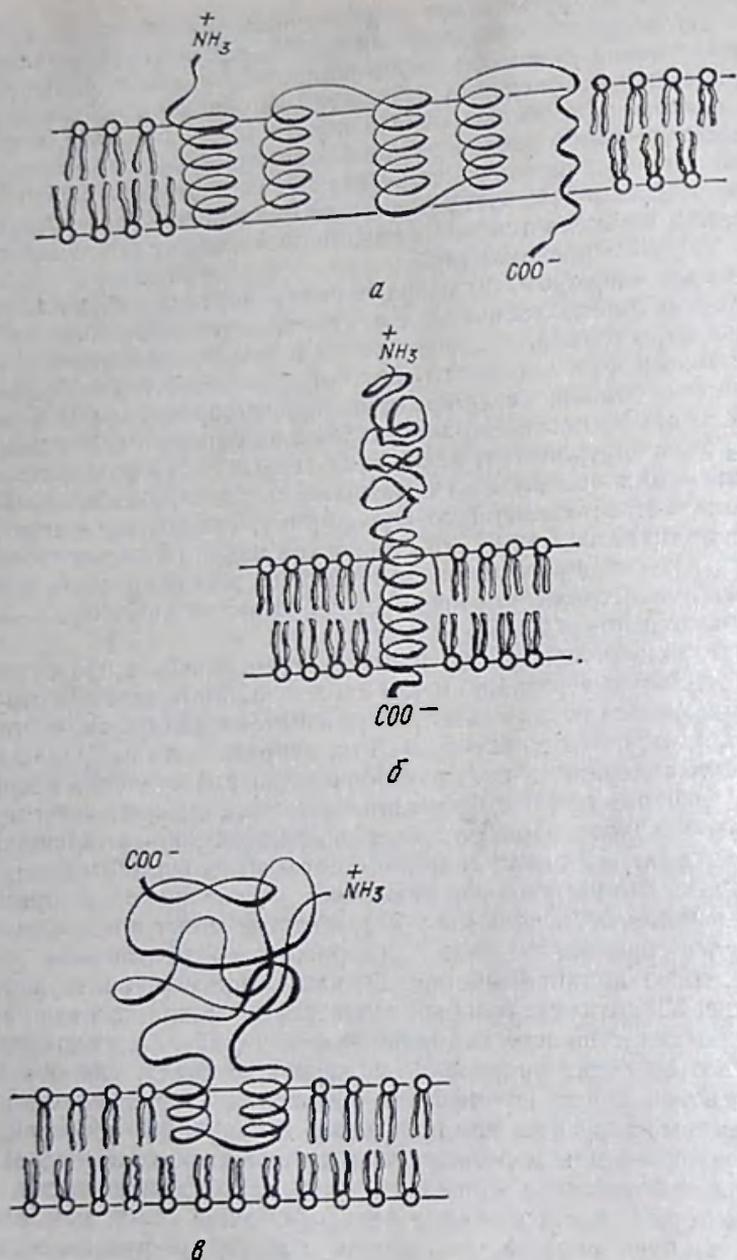


Рис. 31. Различные типы организации мембранных белков:

a — белок почти полностью погружен в мембрану и его полипептидная цепь перескает мембрану несколько раз, образуя α -спиральные колонки; *б* — сравнительно небольшая гидрофобная часть белка погружена в мембрану пересекая всю ее толщину; *в* — гидрофобный «якорь» белка проникает только на расстоянии фосфолипидного монослоя

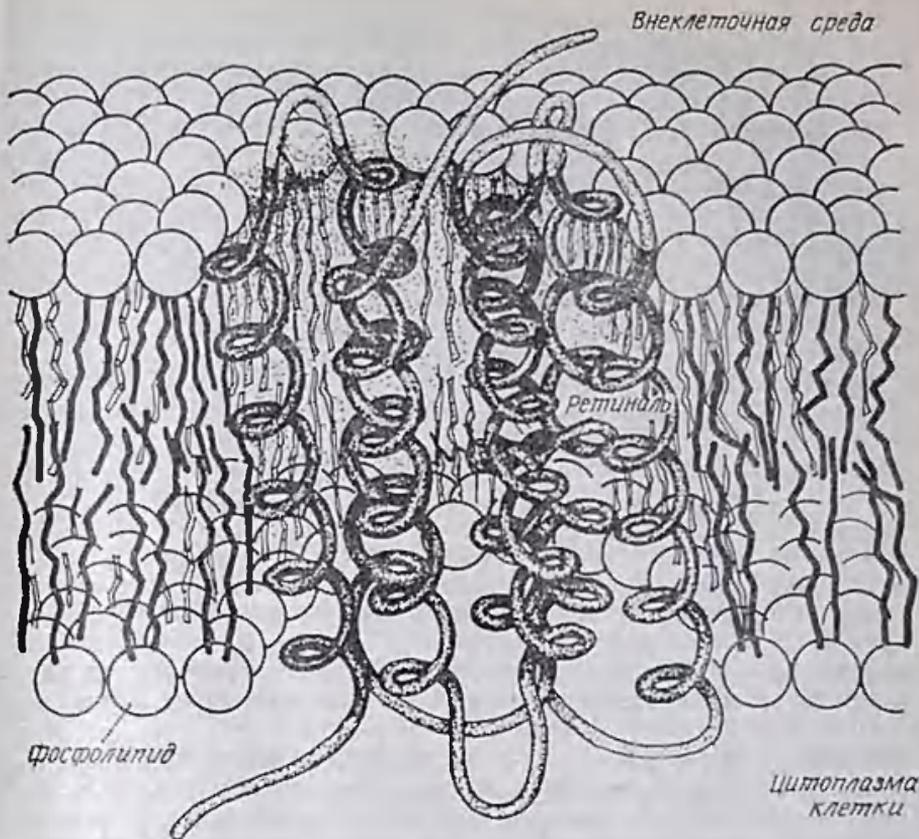


Рис. 32. Молекулярная организация глобулярного мембранного белка бактериородопсина некоторых соленюбивых бактерий

Низкотемпературное повреждение аденилатциклазной системы. Аденилатциклазная система представляет собой сложный рецепторный белок, осуществляющий реализацию молекулярного механизма передачи сигналов в клетку. В результате такого взаимодействия в системе сигнальная молекула — мембранный рецептор в клетке возникает каскад метаболических превращений, который меняет ее физиологические свойства. Рецепторная роль данной сигнальной системы обусловлена ее высокой способностью генерировать вторичные мессенджеры информации — циклический аденозин и гуанозин — монофосфат, которые влияют на активность внутриклеточных ферментов, стимулируют стероидогенез, липолиз, образование кетоновых тел. (рис. 33). Видно, что рецепторный белок, реагирующий с экзогенным сигналом, локализован на поверхности плазматической мембраны, а другие белки, встроенные в липидный бислой, пронизывают мембрану на всю толщину. цАМФ является регулятором внутриклеточных реакций всех видов клеток животных и прокариотов. Это циклическое соединение син-

нуклеотидилсвязывающего белка, локализованного на внутренней стороне плазматической мембраны, можно думать, что замораживание вызывает повреждение регуляторной субъединицы аденилатциклазной системы, хотя функциональное сопряжение гуанилнуклеотидилсвязывающего белка с каталитической субъединицей при этом не нарушается.

Таким образом, составные субъединицы белков аденилатциклазной системы плазматических мембран клеток по-разному реагируют на воздействие низких температур. Очевидно, в данном случае каталитическая субъединица аденилатциклазы менее чувствительна к действию отрицательных температур, чем фторрегуляторный участок гуанилнуклеотидилсвязывающего белка.

Понятно, что при медленных скоростях замораживания, когда возрастает время экспонирования клеток в гиперконцентрированных солевых системах с измененной тоничностью и рН, создаются весьма благоприятные условия для диссоциации белков аденилатциклазной системы, нарушения конформации и функционирования активных центров. Оказывается, что при экспонировании клеток в 5 М растворе NaCl, т. е. в зоне эвтектики, происходит полное снижение фтор- и изопротеренолстимулируемой аденилатциклазной активности.

Низкотемпературные нарушения белковых переносчиков. Существует несколько способов преодоления мембранного барьера (рис. 34). Это, во-первых, так называемая облегченная диффузия веществ, являющаяся самым простым и неспецифическим механизмом переноса. Этот механизм используют молекулы H_2O , газа и другие гидрофобные вещества, легко растворяющиеся в неполярных органических жидкостях. Скорость диффузии различных молекул через липидный бислой определяется разницей концентрации транспортируемого вещества по обе стороны мембраны, их способ-

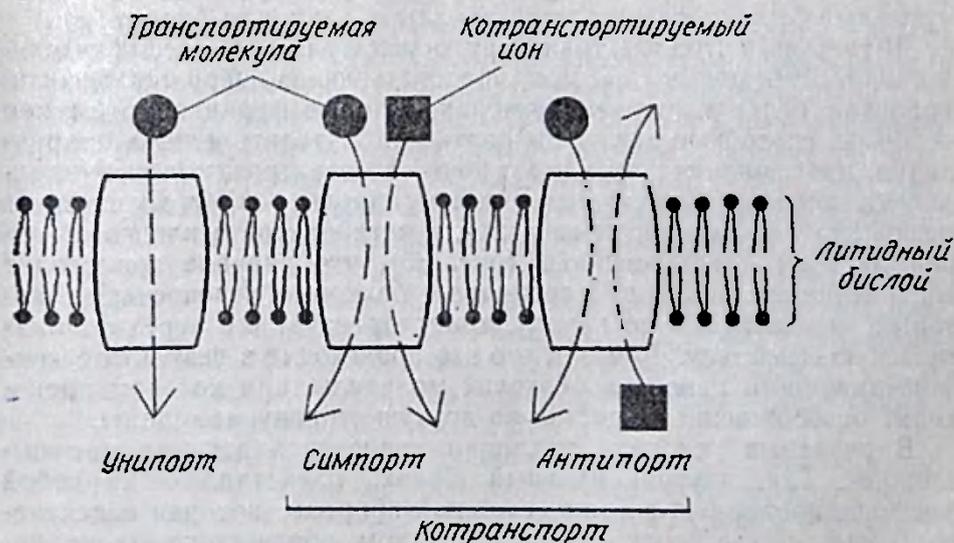


Рис. 34. Классификация способов переноса через мембрану

ностью растворяться в липидах и разностью электрических потенциалов. Согласно структуре доменной модели мембраны, на границах жидких и твердых доменов возникают динамические трансмембранные дефекты, которые могут служить местами выхода и входа ионов и молекул. Диаметр таких дефектов в плазматической мембране эритроцита может достигать 0,7—0,8 нм, и их количество не превышает 0,06 % всей его поверхности. Ионы по сравнению, например, с водой обладают меньшей проникающей способностью через плазматическую мембрану. У большинства клеток плазматическая мембрана, как правило, более проницаема для катионов, чем анионов. Исключением являются эритроциты, где анионы почти в миллион раз быстрее проникают внутрь цитоплазмы, чем катионы. Разница в скорости диффузии через мембрану между анионами и катионами во многом зависит от характера и величины электрического заряда, способности ее формировать динамические трансмембранные дефекты. Если заряд трансмембранного дефекта отрицательный, то это уменьшает его эффективный диаметр для анионов и в то же время не влияет на диффузию катионов.

Химический потенциал жидкой среды, в которой эквilibрируют клетки перед замораживанием, влияет на диффузию веществ через плазматические мембраны. Этот процесс тесно связан с другим — изменением формы и объема клеток. Прибавление солей, различных сахаров или других криопротективных веществ вызывает повышение осмолярности среды, что влияет на трансмембранный процесс ионов и малых биомолекул.

Во-вторых, пассивный транспорт веществ, т. е. процесс их передвижения по градиенту концентраций, не требующий затрат энергии. Пассивный транспорт веществ в отличие от диффузии достаточно специфичный и более быстрый, что достигается функционированием белков-переносчиков, которые представляют собой интегральные белки, формирующие каналы в липидном бислое.

В-третьих, активный транспорт, осуществляемый специфическими системами ионных насосов, представляющих собой также интегральные белки клеточных мембран, которые функционируют как АТФазы, способные аккумулировать или выделять ионы в направлении, противоположном направлению их электрохимического градиента, используя при этом энергию гидролиза АТФ. Существует несколько моделей переноса ионов и метаболитов в клетки. В одной из схем предполагается (рис. 35), что вначале происходит соединение проникающего вещества с белковым переносчиком, который, передвигаясь по каналу, транспортирует его через плазматическую мембрану. Думают, что это происходит в результате конформационного поворота белковой молекулы, при котором происходит освобождение вещества по другую сторону мембраны.

В реальных условиях механизм транспорта веществ намного сложнее. Так, внутриканальный белок, представляющий собой фосфорилированную систему сложной природы, которая селективно связывается с переносимым веществом, образует комплекс, который движется через мембрану и освобождает ион или другое

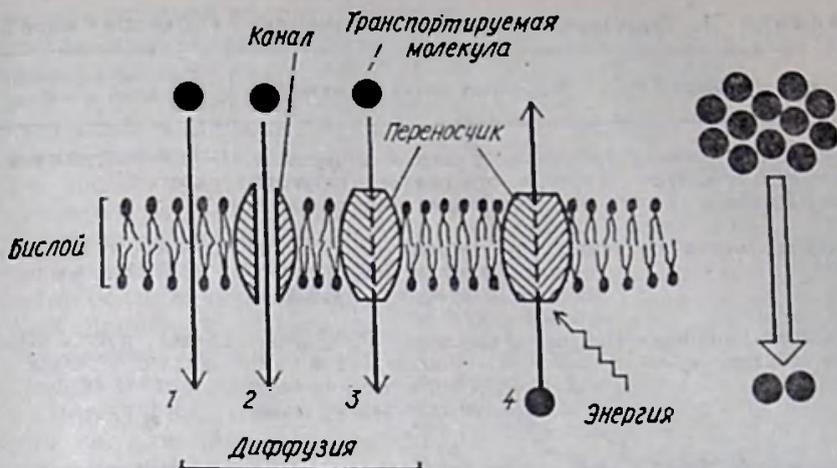


Рис. 35. Виды активного и пассивного транспорта веществ через мембрану:
 1, 2 — простая диффузия через бислой и канал; 3 — облегченная диффузия; 4 — активный транспорт; 1—3 в совокупности отражают пассивный транспорт

вещество на внутренней поверхности с одновременным отщеплением фосфора. Все белковые транспортирующие системы мембран, как и другие интегральные белки, иммобилизованы в плоскости аннулярными липидами, а их активные центры расположены на внешней и внутренней поверхности мембраны.

Большинство ионных насосов электрогенны, т. е. переносят не только вещество, но и электрический заряд через мембрану, создавая мембранный потенциал. В целом существующие в мембране нонтранспортные белки работают по принципу унпорта, симпорта и антипорта (см. рис. 34).

Нарушение пассивного транспорта веществ. Трансмембранный перенос ионов нарушается как при охлаждении, так и при замораживании. Эквilibрация клеток в растворах криопротекторов сопровождается развитием феномена «псевдокрического» действия этих соединений, степень выраженности которого зависит от температуры. При 0°C они менее выражены, чем при 37°C . Учитывая специфику действия криопротекторов на мембрану клеток (особенно непроницающих соединений), всегда можно обнаружить потерю ионов клеткой, особенно выраженной при увеличении времени экспонирования клеток при температуре $37-22^{\circ}\text{C}$. После удаления криопротектора проницаемость мембраны для ионов становится генерализованным явлением. Если клетка при этом теряет K^+ , то это достаточно для ее гибели, так как этот ион регулирует важнейшие метаболические функции (табл. 21).

Охлаждение клеток до 0°C также сопровождается нарушением транспорта ионов, поскольку происходят фазово-структурные переходы либо в основной массе липидов, либо в микродоменах аннулярных липидов, где формируются ТМД, служащие каналами для элиминации и входа ионов в цитоплазму.

Таблица 21. Структурно-функциональные изменения в клетке при утечке K^+

Клеточная функция K^+	Последствия утечки K^+ из клетки	Характер нарушения метаболизма
Регуляция объема клетки и субклеточных органелл	Набухание и разрыв ее органелл, потеря содержимого цитоплазмы, активация лизосомальных гидролаз	Общий метаболизм клетки
Дыхание митохондрий	Ингибирование процесса дыхания и окислительного фосфорилирования, нарушение протонной проводимости	Биоэнергетика клетки, синтез макроэргов
Транспорт аминокислот, сахаров и ионов	Нарушение биосинтеза РНК, функции РНК — полимеразы и аминоацил-РНК-синтетазы, потеря стабильности полисомного комплекса	Синтез нуклеиновых кислот и белков

Более глубокие изменения барьерных свойств мембран клеток происходят после замораживания. В мембранах эритроцитов аномально высокая проницаемость для K^+ и Na^+ возникает уже при замораживании до $-4...-7^\circ C$. Вместе с тем замораживание реконструированных мембран телей эритроцитов, которые не содержат периферических мембранных белков, не нарушает барьерные свойства мембран для этих ионов и сахарозы даже при замораживании до $-16^\circ C$.

Резкое увеличение проницаемости мембран для ионов и малых молекул при замораживании до $-16^\circ C$ происходит лишь при увеличении времени их экспозиции, когда вымораживается основная масса объемной воды, т. е. в период формирования высокогипертоничных растворов солей в жидких микрофазах канальцев льда. Способность выдерживать действие высоких концентраций солей и низких температур реконструированных мембран объясняется отсутствием в них основной доли белков цитоскелета. Это свидетельствует о том, что важным фактором, приводящим к нарушению барьерной функции мембраны и утечке ионов, является белковый мембранный скелет. Повышенная ионная проницаемость плазматических мембран при замораживании нативных клеток до $-7^\circ C$ или реконструированных мембран до $-16^\circ C$ в условиях действия гипертонических растворов носит еще обратимый характер. Если клетку замораживать до более низких температур, то нарушения барьерных свойств мембран происходят для ионов, малых, средних и крупных молекул. При температурах порядка $-19...-30^\circ C$, когда завершается полное вымораживание свободной воды в жидких микрофазах канальцев льда, барьерные свойства нативных и реконструированных мембран резко снижаются и из внутреннего пространства интенсивно вытекают такие крупные молекулы, как сахароза и гемоглобин (рис. 36). Следовательно, при этих температурах в мембране формируются различные по своему диаметру микро- и макродефекты. В механизме утечки ионов и биомолекул через плазматическую мембрану большую роль играет температу-

ра, при которой происходит полное вымерзание свободной воды, завершаются фазово-структурные переходы липидов и модифицируются белки мембранного скелета. Из рис. 37 видно, что при температурах $-18 \dots -20^\circ\text{C}$ выявляются изломы на графиках температурной зависимости параметра 2А-диксилстеариновой кислоты, встроенной в мембраны, свидетельствующие о фазово-структурных перестройках липидов при этих температурах. Интенсивность и характер нарушения барьерных свойств плазматических мембран очень сильно зависят от скорости охлаждения и замораживания, природы и концентрации криозащитных веществ, характера отогрева пробы и свойств самого объекта.

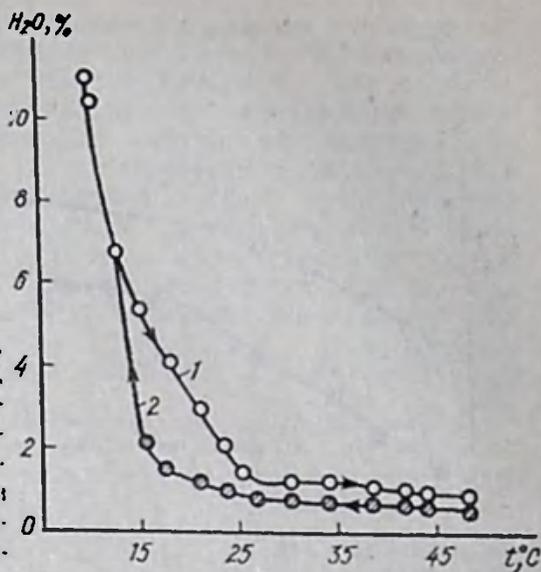


Рис. 36. Вымерзание (1) и оттаивание (2) воды в нуклеолизате замороженных — отогрета суспензии реставрированных телей эритроцитов. Среда замораживания: 150 КСI (мМ), 4 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, скорость замораживания 1—2 °С/мин

При адекватных условиях криоконсервации нарушения проницаемости плазматической мембраны не столь выражены, и замороженные клетки после их отогрева могут восстановить свои барьерные свойства. В противоположных случаях мембраны теряют способность к восстановлению барьерной функции, и из цитоплазмы начинают элиминировать различные ионы, метаболиты (АТФ, нуклеотиды), ферментные и другие белки.

Выход указанных выше веществ из клеток в процессе криоконсервирования указывает не только на тяжесть и распространенность повреждения плазматической мембраны, но и на топологию разрушения тех или иных внутриклеточных органелл. Например, выход цитоплазматических ферментов энергетического обмена (гексокиназа, фосфоорилаза и др.) из клеток при их замораживании, происходящий в температурном диапазоне до -30°C , свидетельствует о нарушении биоэнергетических систем клетки, а выход в цитоплазму кислых гидролаз — о разрушении лизосом. После медленно замораживания вышедшие ферменты с четвертичной структурой подвергаются более выраженным изменениям, чем другие виды белков. Если из клеток в супернатант выходят маркерные ферменты лизосом, митохондрий, микросом или ядра, то это свидетельствует о развитии криоповреждений. По характеру выхода тех или иных белков из цитоплазмы можно судить о степени повреждения плазматической мембраны и диаметре ТМД.

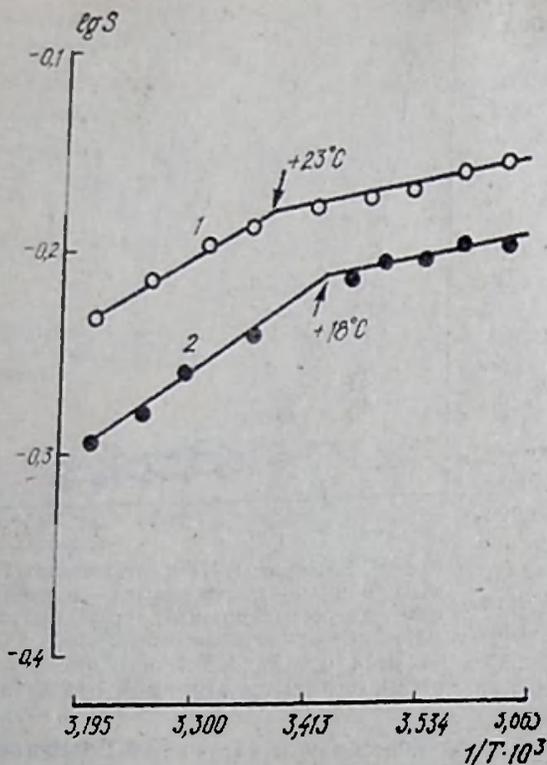


Рис. 37. Изменение фактора упорядоченности жирнокислотных цепей фосфолипидов мембран саркоплазматического ретикулума, меченных спиновым зондом при охлаждении до 0 °С:

1 — в составе мембранных везикул; 2 — препарат изолированной Ca^{2+} -АТФазы

ного либо множества ТМД, через которые выходят биомолекулы большого размера, ведущие к лизису клетки.

Необходимо учитывать, что формирование ТМД в зависимости от температуры очень широко варьирует в зависимости от природы мембраны, содержания в ней холестерина и состава среды замораживания.

Пассивный транспорт веществ в клетке нарушается в основном в интервале температур 0...—25 °С, когда в замороженной системе сосуществуют жидкие микрофазы и кристаллы льда. В диапазоне этих температур полностью подавляется активный транспорт веществ, поскольку процессы кристаллизации и «эффекты раствора» сильно нарушают структуру липидов, вичинальной воды и белков.

Нарушение активного транспорта веществ. Нарушение активного транспорта при охлаждении и замораживании — отогреве также зависит от природы мембран и вида клеток, скорости охлаждения и состава среды.

Принципиально различают три степени нарушения проницаемости мембран при низкотемпературном воздействии:

— первая — в диапазоне температур от 0 до —5 °С — характеризуется нарушением полной проницаемости мембран, при которой формируются главным образом ТМД с диаметром, соизмеримым с радиусом иона;

— вторая — в диапазоне температур от —5 до —10 °С — характеризуется нарушением проницаемости для метаболитов и биомолекул с малым и средним радиусами;

— третья — в диапазоне от —10 до —30 °С — характеризуется формированием одного круп-

Охлаждение до 0 °С и эквilibрация в растворах электролитов криопротекторов оказывают тормозящее влияние на активность нонтранспортующих белков мембран клеток, так как холод и молекулы защитного вещества оказывают непосредственное действие на структуру белковой молекулы либо на состояние аннулярных липидов. Функционирование нонпереносящих белков зависит от микровязкости аннулярных липидов, которые при понижении температуры до 0 °С подвергаются фазово-структурным превращениям, что ведет к изменению конформационного состояния белка. Именно фазово-структурные переходы аннулярных липидов чаще всего являются одной из причин торможения функции Na⁺—K⁺-АТФазы клеток при температурах, близких к 0 °С. Как видно из табл. 22, температура начала и завершения фазово-структурного

Таблица 22. Температура фазовых переходов аннулярных липидов при охлаждении различных АТФаз

Фермент	Температура перехода, °С	
	Начало	Завершение
Ca ²⁺ -АТФаза саркоплазматического ретикулума	30	0
Сукцинатоксидаза митохондрий печени крыс	25	0
АТФаза микросом	20	0
почки ягненка		
почки кролика	10	0
мозга крысы	35	14

перехода липидов большинства АТФаз находится в широком температурном диапазоне — от 30 до 0 °С. Начало фазово-структурного перехода аннулярных и других липидов мембран определяется с помощью графиков Арреннуса, отображающих зависимость ферментативной активности АТФаз от температуры. При понижении температуры на графиках обычно выявляется изгиб прямой, свидетельствующий о структурно-функциональном изменении микроокружения или непосредственного состояния белкового переносчика. При температурах порядка 10—0 °С изменение активности мембраносвязанных АТФаз, как правило, обратимо, если время экспонирования мембран при этих температурах не превышает 6—12 ч., а среда, в которой хранят биоматериал, хорошо сбалансирована. Более длительное экспонирование клеток при 0 °С может привести к необратимой инактивации белка-переносчика, поскольку в мембране развивается комплекс процессов, характерных для гипоксического синдрома (перекисное окисление липидов, дисбаланс энергии и биосинтетических процессов).

При замораживании клеток до —25 °С, когда происходят фазово-структурные превращения основной массы липидов и их латеральное разделение, в плазматической мембране усиливаются процессы гидролиза фосфолипидов в результате перекисного окисления липидов и активации внутримембранных фосфолипаз. Продукты этих реакций (альдегиды, активные радикалы, лизолецитины,

Т а б л и ц а 23. Влияние скоростей замораживания на функциональную активность Са-транспортующей системы мембран СПР

Исследуемый параметр	Контроль	Скорость замораживания до -196 °С, °С/мин	
		1-2	300-400
Скорость гидролиза АТФ (мкмоль Р _{ii} /мг б. ка./мин)	1,46±0,12	2,10±0,14	1,65±0,08
Скорость аккумуляции Са ²⁺ (мкмоль Са ²⁺ мг белка/мин)	2,65±0,19	1,42±0,12	2,14±0,19
Коэффициент эффективности Са ²⁺ /АТФ	1,80	0,68	0,82

лизосомальные и др.) оказывают денатурирующее влияние на нон-транспортующие белки, белки — переносчики метаболитов. При замораживании происходят два типа повреждения активных АТФаз: во-первых, конформационные, связанные с фазовым разделением липидов, и, во-вторых, денатурационные изменения белков.

Криповреждения нонтранспортующих белков мембран зависят от скорости охлаждения, замораживания, состава защитной среды и природы клеток.

При медленном замораживании мембранных везикул, полученных из СПР красных мышц кролика, основные функциональные показатели Са²⁺-АТФазы нарушаются в большей степени, чем после быстрого охлаждения (табл. 23). Это происходит потому, что при медленном охлаждении реализует свое действие комплекс повреждающих факторов, известных в литературе как «эффект раствора». При этом экспонирование белкового переносчика в гиперконцентрированных растворах солей с измененным рН, особенно в зоне эвтектики NaCl, оказывает разрушающее лиотропное действие на липидные и белковые элементы мембраны, в результате чего изменяются параметры микровязкости липидного окружения интеркалированного в мембрану ионного переносчика и его конформационное состояние. Однако если при этом измерить константу Михаэлиса (K_M) фермента для АТФ, то оказывается, что после отогрева медленно замороженных везикул сродство Са-АТФазы к АТФ практически не изменяется, т. е. непосредственно активный центр белка, связывающий АТФ, не претерпевает выраженных нарушений. Вместе с тем после замораживания — отогрева чувствительность Са-АТФазы к внешнему Са²⁺ повышается, что свидетельствует о повреждении сродства белкового переносчика к Са²⁺. Если построить график зависимости гидролиза АТФ Са-АТФазой в координатах Аррениуса, то обнаруживается излом в области 23 °С, что соответствует дальнейшему расширению фазового перехода липидов мембран, охлажденных до 0 °С (рис. 38). Если рассчитать с помощью этого графика энергию активации (E_a) гидролиза АТФ Са-АТФазой, то в области выше точки излома после замораживания она увеличивается почти вдвое, что связано прежде всего с изменением физико-химического состояния липидного окружения фермента и характера белок-липидных взаимодействий.

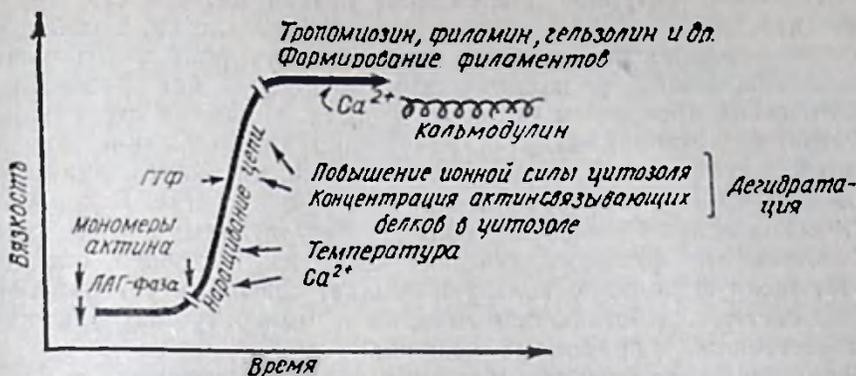


Рис. 38. Схема полимеризации актина. Обозначены факторы и условия, способствующие полимеризации белка

Следовательно, при снижении температуры до 0°C и после замораживания — отогрева активный центр белка для связывания АТФ не подвергается особым изменениям, в то время как центр, связывающий Ca^{2+} , изменяет характер своего функционирования.

Известно, что способность мембранных АТФаз к связыванию ионов очень сильно зависит от рН среды, тоничности среды и температуры. Например, K^{+} или Ca^{2+} лучше связываются с мембраной при низких или очень высоких значениях рН. При этом скорость связывания ионов белковым переносчиком при охлаждении до -4°C через сутки снижается на 60 %, а сразу после замораживания до -20 или -80°C — на 40 %. При удлинении сроков хранения размороженных материалов мембрана практически теряет способность связывать ионы.

Механизм разобщения гидролиза АТФ и транспорта ионов АТФазой внутрь клеток в процессе низкотемпературного воздействия можно представить в виде следующей схемы. В результате изменения физического состояния основной массы липидов, окружающих фермент, формируются трансмембранные дефекты, через которые происходит утечка транспортируемого иона из клеток как через систему активного транспорта, так и посредством пассивной диффузии (см. рис. 24). Выходящий из цитоплазмы ион реактивирует соответствующий центр белков и благодаря более высокой чувствительности переносчика к иону-активатору значительно повышает активность фермента. Однако, несмотря на это, скорость аккумуляции ионов значительно уменьшается за счет последующего быстрого выхода запасаемых ионов из клеток в результате нарушения барьерных параметров мембран.

Детальные механизмы криповреждений белков-переносчиков на молекулярном уровне очень малознучены, поэтому приведенные выше данные могут являться общей схемой холодовых повреждений систем активного транспорта ионов через плазматические мембраны клеток.

Низкотемпературное повреждение белков цитоскелета. Белковый цитоскелет, регулирующий форму и объем клетки, а также состояние поверхности мембраны, играет важную роль в сохранении таких важнейших физиологических процессов, как реализация генетической программы развития и роста, динамика структурной интеграции метаболизма, пространственное расположение молекулярных и субклеточных компонентов клетки, цитокинез, динамика хромосом и биотрансформация энергии АТФ в клетке. В криобиологическом аспекте выяснение роли тех регуляторных систем, которые влияют на физико-химические свойства белкового скелета, играет важную роль, поскольку позволяет повышать устойчивость живых систем к действию осмотических и температурных факторов в искусственных и природных условиях.

Регуляция структурного состояния белков цитоскелета в клетках находится под контролем различных макромолекулярных комплексов, локализованных в мембранных структурах клеток (например, нонные переносчики, аденилатциклаза, инозитолфосфатидный цикл), а также внутриклеточных системах, влияющих на агрегатное состояние актина и тубулина (например, актинсвязывающие и актинфрагментирующие минорные белки цитозоля). При температурном и/или гиперосмотическом воздействии на клетку функция указанных выше регуляторных систем, модулирующих структурное состояние белков цитоскелета, изменяется.

Известно, что агрегатное и структурное состояние белков цитоскелета влияет на степень их ассоциации с якорными белками мембраны и, таким образом, поддерживает вязко-эластические свойства мембраны и устойчивость клетки к действию экстремальных влияний, в том числе и низких температур. Поэтому изучение особенностей модификации систем, которые влияют на состояние белков цитоскелета и цитозоля, имеет важное значение для разработки теории и практики холодовой адаптации и холодоустойчивости клеток.

Три системы филаментов цитоскелетной системы в клетках различаются как по химическому составу, так и по своей ультраструктуре. Наиболее тонкие нити, представленные активными микрофиламентами, имеющими диаметр примерно 6 нм и состоящими из актина — глобулярного σ -белка, находятся в цитоплазме в моноили полимерной форме. Вторая система — микротрубочки диаметром 22 нм — состоят из белка тубулина.

Микротрубочки содержат специфический димерный белок α - и β -тубулин с М. м. ~ 50 кД, а также связывающие и фрагментирующие минорные белки. Сборка микротрубочек из молекул тубулина подобна сборке актиновых филаментов. Сборка тубулина и его полимеризация *in vitro* происходят спонтанно при температуре 37 °С и в присутствии ГТФ, а также оптимальных концентрациях Ca^{2+} и Mg^{2+} . Микротрубочки так же, как и актиновые микрофиламенты, представляют собой высоколабильные структуры, чувствительные к воздействию низких температур, рН, повышенным кон-

центрациям Ca^{2+} и различным антимитотическим агентам — колхицину, винбластину, цитохалазинам, фаллондинам и др.

Полимерное состояние актина и тубулина зависит также от природы и характера их взаимодействия с минорными цитоплазматическими белками. Например, значительная доля неполимеризованного актина в лимфоцитах и тромбоцитах связана с белком профилином, который формирует легко диссоциирующий комплекс, не способный к самосборке в полимерную цепь. Поэтому в клетке часть актина находится в растворенном состоянии. Полимеризация актина происходит поэтапно: короткая лаг-фаза, затем наращивание цепи и, наконец, формирование филаментов (см. рис. 38). На этот процесс сильное влияние оказывают различные факторы — минорные полипептиды, кальмодулин, ионная сила цитозоля, температура и концентрация ионизированного Ca^{2+} в цитоплазме.

Третий вид филаментов диаметром 7—11 нм представлен так называемыми промежуточными филаментами, которые различаются в клетках разных типов. Поскольку сеть микрофиламентов прикрепляют к плазматической мембране, она влияет также на свойства клеточной поверхности.

Криповреждения периферических белков клеток, играющих важную роль в поддержании их формы, внутренней архитектоники и двигательной способности, лучше всего изучены на эритроцитах, где они представлены спектрин-актиновой сетью. Состояние актин-спектриновых белков при мембранного скелета имеет большое значение в стабильности (или нестабильности) клеток в процессе их охлаждения и замораживания — отогрева.

Компоненты белкового скелета спектрин и актин весьма чувствительны к сдвигу pH и температуры, и для них характерны температурно-зависимые переходы между различными олигомерными формами. Наблюдаемый при 15 °C в эритроцитах фазовый переход связан с изменением состояния периферических мембранных белков, которые ассоциированы с мембранными липидами. При низких значениях pH (4,5—5,0) и высокой тоничности среды формируются гетеродимеры актина и поперечные сшивки мембранных белков в результате окисления их SH-групп. На структурное состояние белков цитоскелета оказывает влияние степень их гидратированности: снижение содержания H_2O приводит к полимеризации актина и образованию крупных олигомеров и, возможно, гексамеров. Спектрин соединен как с интегральными белками мембраны, так и с липидами, которые возрастают при повышении температуры и снижаются при охлаждении. Основным якорным белком для спектрина является анкирин (белок полосы 2.1), который в олигомерном состоянии связывает спектрин с цитоплазматическим доменом «пермеаформного комплекса», т. е. анионтранспортирующим белком полосы 3. Белки полосы 3, 2.1 и 4.1 относятся к числу прочно связанных с мембраной и после удаления спектрина и актина остаются в мембране.

Структурная перестройка белков цитоскелета может быть индуцирована частичной дегидратацией клетки, т. е. в результате добав-

ления в среду осмотически активных соединений (соли, крипротекторы, сахара). Под влиянием непроникающих крипротекторов, охлаждения и замораживания в клетках происходит перераспределение различных фракций белков цитоскелета, которые участвуют в непосредственном прикреплении к внутренней поверхности мембраны. Крипротектор это влияние на белки цитоскелета оказывает в результате частичной дегидратации клетки, что приводит к полимеризации актина и образованию более прочных связей с мембраной. Характер модификации белков цитоскелета клеток под влиянием крипротектора и замораживания — отогрева можно адекватно оценить, используя белоксшивающие реагенты, в частности диамида, поскольку известно, что этот бифункциональный реагент обладает способностью образовывать дисульфидные мостики между SH-группами белков, находящимися на определенном расстоянии друг от друга. В результате этого при окислении SH-групп белков возникают агрегатные белковые комплексы, которые проявляются на электрофореграммах в виде фракции высокомолекулярных белков на старте геля. Замораживание — отогрев клеток приводит к образованию агрегированных форм белков, поскольку в процессе замораживания — отогрева происходит нарушение пространственной структуры части белков цитоскелета и при этом появляются доступные для диамида SH-группы, что и приводит к образованию S—S-сшивок между белками.

При частичной дегидратации клеток, вызванной действием непроникающих крипротекторов либо внешним кристаллом льда при медленном замораживании, наблюдается изменение процессов фосфорилирования — дефосфорилирования мембранных белков, что существенно влияет на прочность их ассоциативных связей с плазматической мембраной. Увеличение или уменьшение степени фосфорилирования спектрина под воздействием частичной дегидратации при низкой температуре отражает особенности структурной модификации спектрина и изменение активности протеникиназ в этих условиях. Известно, что при 0 °C энергетически более выгодной является олигомерная структура актина. Уровень фосфорилирования гексамерных и больших олигомерных форм спектрина более чем в 2 раза превышает уровень фосфорилирования димеров и тетрамеров. Изменение уровня фосфорилирования белков цитоскелета в условиях частичной дегидратации клеток, связанное с изменением активности протеникиназ, которые катализируют перенос фосфата АТФ на активные группировки белков, регулируется уровнем $[Ca^{2+}]$, кальмодулином и диацилглицерином, т. е. вторичными мессенджерами, возникающими в клетке в результате активации инозитолфосфатидного цикла.

Структурные изменения белков цитоскелета, а также липид-белковых доменов мембраны, возникшие в процессе холодового и осмотического воздействий на клетки, носят достаточно сложный характер ответа, в котором существенную роль играют системы регуляции пассивного транспорта, протеникиназ и вторичных мессенджеров. Механизмы включения и функционирования указанных

систем регуляции во многом остаются неясными. Температура и уровень гидратированности оказывают выраженное влияние на прочность белковых ансамблей и устойчивость их к действию низких температур.

Сохранение барьерной устойчивости мембраны, которая контролируется белковым цитоскелетом, является процессом, зависящим от комбинации и силы температурно-осмотических факторов, выступающих в роли механизма направленной регуляции состояния (стабильности или нестабильности) клетки. Поэтому в практическом отношении следует выполнять определенные принципы для предотвращения осмотического или температурного шока клетки. Таким принципом может быть частичная дегидратация клетки на этапе, предшествующем замораживанию.

Модификация липидов мембран

Фазовые переходы липидов. В водной среде структуры, образуемые фосфолипидами, ведут себя как жидкие кристаллы, которые характеризуются лиотропным (зависимость от гидратации) и термотропным (зависимость структуры от температуры) мезоморфизмом.

При физиологических температурах, величинах pH и тоничности среды липидный слой мембран представляет собой высокодинамичную систему, молекулы которой совершают разнообразные движения: вращение вокруг C=C-связей, перемещение в плоскости бислоя, изгибы, повороты и перескоки с одного монослоя в другой (явление флип-флоп). По данным ЯМР-спектроскопии, полученным при изучении темпов вращения липидных молекул в области C=C-связей, жирнокислотные цепи липидных молекул изгибаются и ациллируют с очень высокой скоростью. При поворотах вокруг единичных C=C-связей в липидных молекулах возникают конформационные изменения типа транс- или гошизомеризации либо формируются складки липидных молекул — кинки. При охлаждении, замораживании, когда изменяются pH и ионная сила растворов, структура липидов трансформируется в основном за счет фазово-структурных переходов.

Под низкотемпературным фазово-структурным переходом липидов подразумевают процесс изменения конфигурационного (выпрямление жирнокислотных хвостов) и агрегатного состояний углеводородных цепей жирнокислотных радикалов липидов, т. е. модификацию из жидкокристаллического состояния в гель-фазу (рис. 39). Фазовые переходы липидов происходят также при повышенных температурах. Величина как низко-, так и высокотемпературных переходов зависит от содержания воды в системе, холестерина и ионов.

В области фазового перехода происходит несколько одновременных процессов: возрастает подвижность (при повышенной T_m) или возникает торможение (при низких T_m) полярных групп липидов, увеличиваются или подавляются вращательная подвижность

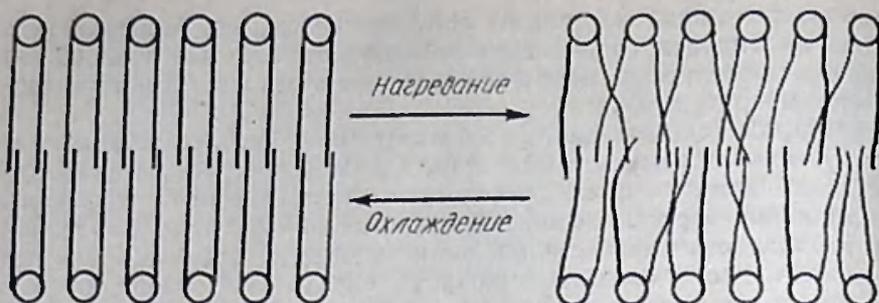


Рис. 39. Схема фазового перехода фосфолипидного бислоя от упорядоченного кристаллического состояния к жидкому при изменении температуры

C=C-связей и скорость латеральной диффузии. Следствием этих изменений являются два важных обстоятельства: изменение геометрических размеров бислоя, которое объясняется латеральным сжатием площади, занимаемой каждой молекулой фосфолипида, изменением гидрофобного объема мембраны и плотности молекулярной упаковки липидов, а также их микровязкости.

При охлаждении клеток, истощенных по холестерину, до 0 °C фазово-структурные переходы липидов из жидкокристаллического в гель-состояние и их латеральное разделение охватывают весь липидный бислой. При охлаждении клеток, мембраны которых обогащены холестерином, до 0 °C структурные изменения охватывают главным образом микродомены аннулярных липидов, которые содержат в основном насыщенные жирные кислоты. Переход этих липидов в твердое состояние может сопровождаться формированием трансаннулярных каналов, которые являются местами утечки ионов.

При замораживании структурно-фазовые превращения липидов охватывают мембрану в целом. При этом в состоянии гель-фазы молекулы липидов упорядочены, и их жирнокислотные радикалы более плотно упакованы по сравнению с жидкокристаллической фазой, в которой молекулы располагаются хаотичнее. В результате этого объем, занятый их жирнокислотными хвостами, в этих участках снижается в большей степени, чем в области липидных головок.

В области фазового перехода липидных молекул более упорядоченные области мембраны сосуществуют с разупорядоченными (жидкими), что ведет к фазовому разделению липидов. В этих условиях для мембраны облегчено формирование различного рода дефектов, что способствует стерическому сближению белковых молекул, встраиванию новых веществ, повышению ее проницаемости для ионов и метаболитов.

Фазово-структурные изменения липидов могут рассматриваться как процессы, инициирующие первичные повреждения мембран в отличие от вторичных (латентных) повреждений, которые развиваются после замораживания — отогрева через определенный промежуток времени.

Процесс фазового перехода приводит к образованию весьма жесткой мембранной структуры, пластичность которой отличается от состояния липидов мембраны при физиологических температурах, углеводородные цепи которой находятся в жидкокристаллическом состоянии. На модельных системах показано, что в фазе геля длинные оси жирнокислотных цепей наклонены на $\sim 30^\circ$ к плоскости бислоя.

На температуру фазово-структурного перехода липидов влияют следующие факторы:

— степень ненасыщенности жирнокислотных цепей, их длина и химическая природа головок липидов. Температура перехода липидов из жидкокристаллического состояния в гель-фазу неодинакова для различных липидов и понижается при увеличении длины и насыщенности жирнокислотной цепи. Так, например, фосфолипиды, в состав которых входит арахидоновая кислота, имеющая четыре ненасыщенные двойные связи, подвергаются структурно-фазовому переходу из жидкого в твердое состояние при температурах около -50°C ;

— интегральные и периферические белки мембраны: в их присутствии температура перехода снижается;

— степень гидратации головок липидов и белков, концентрация холестерина: в мембранах с высоким содержанием холестерина фазово-структурные переходы липидов происходят в области умеренно низких, а в некоторых типах клеток в области отрицательных температур (например, *Halobacterium*). Наоборот, в мембранах, истощенных по холестерину, фазово-структурные переходы липидов происходят, как правило, в области положительных температур.

Фосфолипиды с насыщенными жирными кислотами подвергаются фазово-структурным переходам при более высоких температурах, чем фосфолипиды с ненасыщенными жирными радикалами. Поскольку нативная мембрана содержит смесь различных фосфолипидов, находящихся как в жидком, так и в твердом состоянии, их фазово-структурные переходы происходят обычно в размытом температурном интервале.

В нативных мембранах, содержащих смешанные бислои, при низких температурах формируются разнородные домены (кластеры) различной величины, количество которых в определенных участках бислоя может быть до нескольких сотен. Например, методом ЯМР-спектроскопии и криофрактографии показано, что в бислоях диолеиллецитина при 30°C кластеры отсутствуют, а при охлаждении от 0°C до -22°C их количество резко возрастает. Состав, размер таких доменов и время их релаксации зависят от природы липидов, скорости охлаждения и конечной температуры замораживания мембран. Важно, что после охлаждения молекулярная плотность внутри кластера выше, чем в менее организованных областях, что влияет на характер липид-белковых взаимодействий, активность мембраносвязанных ферментов и степень репарации ТМД мембран после их отогрева.

Процессы фазово-структурных переходов липидов существенно различаются в плазматических мембранах клеток и мембранах субклеточных органелл (митохондрии, лизосомы). Это различие связано с различной концентрацией холестерина в липидном бислое. Как правило, липиды плазматических мембран клеток, обогащенные холестерином, претерпевают фазово-структурные превращения в весьма размытой низкотемпературной зоне. Липидный бислой мембран внутриклеточных органелл, содержащий меньше холестерина, наоборот, подвергается фазово-структурным переходам при положительных температурах. Например, в липидах плазматических мембран таких клеток, как эритроциты, тимоциты, лимфоциты, обогащенных холестерином, фазово-структурные переходы при низких температурах иногда не обнаруживаются при использовании традиционных методов биофизического исследования (ЯМР, ДСК, ЭПР-спин меток и зондов). Для этого требуются более чувствительные методы — комбинационное рассеивание или малоугловая дифракция рентгеновских лучей. Это связано с тем, что холестерин сильно влияет на упаковку липидов. Поэтому в мембранах эритроцитов жидкокристаллическое состояние липидов может сохраняться даже при температуре -20°C .

Липидный матрикс мембран весьма чувствителен к действию «эффекта раствора», и в частности к сдвигу pH и тоничности среды. Например, мембраны из фосфатидилсерина становятся более жесткими при снижении pH до 2,5, и фазовый переход происходит при 26°C , а не при 21°C . При увеличении pH до 7,4 температура фазового перехода этого фосфолипида, наоборот, снижается до 0°C . Такая зависимость связана с процессами протонирования карбоксильных групп фосфолипидов, которые при увеличении pH сохраняют свою структурную упорядоченность в плоскости бислоя. Напротив, при низких значениях pH происходит более интенсивное фазовое разделение липидов, индуцированное высокой концентрацией протонов в среде. Сдвиги в значениях pH также влияют на состояние интегральных и особенно периферических белков мембраны. Например, сдвиг pH может способствовать более облегченной солиubilизации спектрина из эритроцитов, что влияет на стабильность мембраны в целом. Аналогичным образом действуют соли: например, при повышении молярности NaCl до 3 М динамика жирнокислотных радикалов фосфолипидов очень сильно подавляется.

Фазово-структурные переходы липидов в мембранах существенно влияют на клеточные функции, поскольку при этом изменяется проницаемость мембран для ионов и метаболитов, характер взаимодействия гормонов с рецепторами, активируются процессы биохимической модификации липидов и латентные повреждения внутриклеточных структур.

Фазово-структурные переходы липидов играют важную роль в развитии первичных и вторичных повреждений клеток и тканей при их замораживании — отогреве.

Биологическое значение физико-химического превращения липидов очень хорошо проявляется при изучении влияния температуры на изменение функции мембрановстроенных ферментов, которые окружены аннулярными липидами, содержащими меньше или большее число ненасыщенных углеводородных связей. Такие различия выявляются при исследовании характера кривых Аррениуса у гомо- и пойкилотермных животных. В соответствии с законом Аррениуса, скорость метаболических процессов экспоненциально понижается с уменьшением температуры. В этом случае логарифм скорости метаболических процессов как функция обратной температуры представляет собой прямую линию. Однако у гомеотермных животных и у теплолюбивых растений при 0°C на кривой Аррениуса всегда выявляются изломы при понижении температуры, что свидетельствует о фазовом структурном переходе липидов мембран из жидкокристаллического в твердое гель-образное состояние. Этот процесс практически определяет температурную границу, ниже которой растения и животные не могут нормально функционировать, поскольку фазово-структурный переход липидов в мембране сильно изменяет функцию мембрановстроенных ферментов в результате изменения их конформационного состояния.

У пойкилотермных животных или холодоустойчивых растений фазово-структурные переходы липидов мембран клеток при 0°C не происходят, в результате чего мембрановстроенные белки сохраняют свою функциональную активность при этих температурах. Это связано с тем, что в составе мембран клеток этих пойкилотермных животных содержится повышенное количество ненасыщенных жирных кислот, фазово-структурные переходы которых обычно сдвинуты в сторону более низких температур. Фазово-структурные переходы липидов влияют на величину энергии активации многих ферментов. Например, энергия активации митохондриальной сукцинатоксидазы гепатоцитов крыс до фазово-структурного перехода (22—23°C) составляет 4,2 ккал/моль, а ниже перехода — 16,5 ккал/моль.

Фазовые переходы липидов ведут к развитию таких процессов, как латеральное разделение (сепарация) и кластеризация липидов, а также агрегация белков. Физиологическое значение фазовых переходов липидов довольно высокое. Они влияют на барьерные свойства мембран, передачу нервного импульса, закрытие — открытие комплекса ядер каналов, что блокирует ядерно-цитоплазматический транспорт РНК.

Латеральное разделение липидов. С фазово-структурными переходами липидов мембран тесно связан другой процесс — их латеральное разделение в плоскости бислоя.

Характерной особенностью мембран является различный состав липидов в наружном и внутреннем монослоях. Такое асимметричное распределение липидов обеспечивает мембране высокую пластичность на изгиб и растяжение. Механизмом, обеспечивающим асимметрию липидного бислоя, являются различия в строении липидов и составе ионной среды по обе стороны мембраны, а также

активность ферментов липидного обмена (система обмена холестерина, метилазы и т. д.) и липидпереносящих белков. В силу такого асимметричного строения липидный бислой мембран клеток характеризуется различной текучестью его монослоев, температурами фазово-структурных переходов и разделения фосфолипидных молекул.

В сложных многокомпонентных смесях фосфолипидов, имеющих разные температуры переходов, в мембране находится как жидкая, так и гель-фаза. В этом случае липидные фазы отделяются друг от друга, и происходит их латеральное разделение в плоскости бислоя. Поскольку состав внешнего и внутреннего липидных монослоев мембран неодинаков, их фазово-структурные переходы начинаются и завершаются неодновременно. Так, например, во внешней мембране митохондрий переход происходит при температуре 9—10 °С, а в внутренней — при —8...—12 °С. Фазово-структурное разделение липидов в мембранах при охлаждении приводит к образованию микродефектов в структуре бислоя на границах твердой и жидкой фаз, вследствие чего нарушается барьерная функция мембран. При латеральном разделении мембранных липидов белки мембран могут аномально агрегировать, что ведет к нарушению функционирования мембраносвязанных ферментов.

Фазовое разделение липидов при охлаждении мембран обусловлено латеральным движением липидов в плоскости бислоя, в результате чего образуются зоны, содержащие одинаковые молекулы липидов (гомогенные зоны), либо зоны, которые включают различные липиды (гетерогенные зоны). При фазовом разделении липидов происходит их раздельная кристаллизация, что ведет к формированию дискретных зон с различным составом гель-фазы. Такая возможность появляется в связи с тем, что в состоянии геля определенная часть липидов не способна смешиваться друг с другом, что вполне возможно в жидкокристаллической фазе.

В криобиологическом аспекте важно то, что липидные домены, находящиеся в различном фазовом состоянии, имеют неодинаковую плотность, особенно на межфазных границах, что способствует значительному латеральному сжатию этих участков мембраны в состоянии геля и формированию в ней ТМД (рис. 40).

При быстром замораживании клеток латеральное разделение липидных фаз не успевает произойти, и в этих условиях формируется липидный гель без его разделения. При медленном замораживании, наоборот, имеются временные и материальные основы для формирования в мембранах нескольких липидных фаз, границы между которыми являются наиболее вероятными зонами формирования ТМД, что существенно повышает проницаемость мембраны для ионов и биомолекул.

Участки с нарушенной структурой на границе между дискретными и жидкими доменами, сосуществующими в бислое, являются также зонами репарации ТМД в цикле замораживания — отогрева.

Роль гидратации в структурной стабильности мембран. Структурно-фазовые изменения липидного бислоя при охлаждении и за-

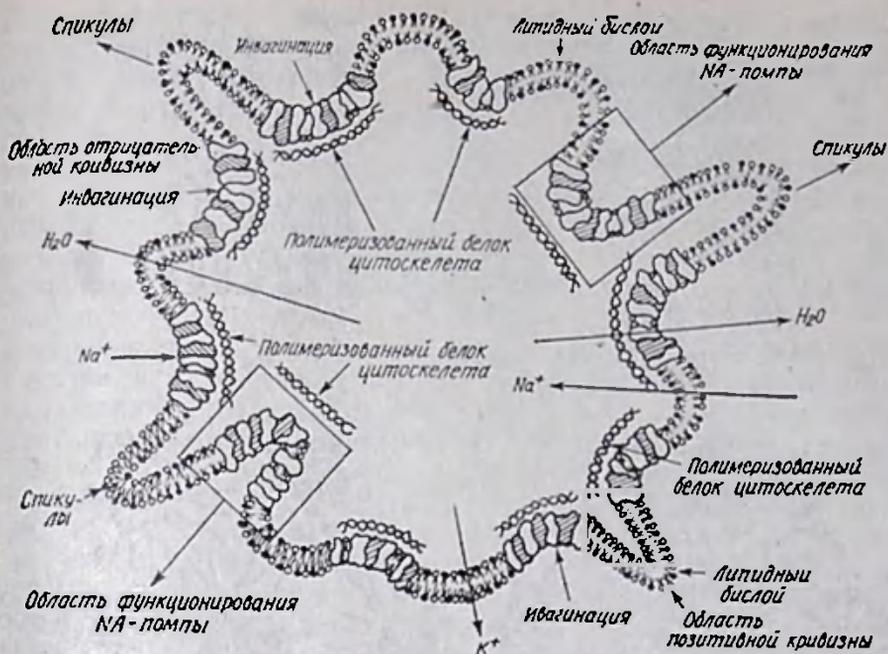


Рис. 40. Температурно-осмотическая деформация плазматической мембраны

морозивании зависят от степени гидратации, поскольку вода играет важную роль в поддержании структуры мембраны. Увеличение содержания воды в клетке при физиологических температурах приводит к увеличению площади молекул липидов, в результате чего бислой может трансформироваться из плоской ламеллярной фазы в другой тип упаковки. От степени гидратированности фосфолипидных молекул зависят также такие важные параметры мембраны, как ее плотность, упаковка, толщина и температура фазовых переходов липидов. В водной среде фосфолипиды ведут себя как анизотропные жидкости, наподобие жидких кристаллов, образуя ламеллярные, мицеллярные, гексагональные, инвентированные и другие более сложные структуры (рис. 41). Формирование и динамика таких структур зависят от степени гидратации липидных молекул (лиотропный мезоморфизм) либо воздействия высоких или низких температур (термотропный мезоморфизм). При физиологических температурах и нормальной гидратированности липиды мембран образуют ламеллярную систему.

При замораживании, когда вода вымораживается в лед, ламеллярная упаковка бислоя сильно деформируется и в ней возникают дефекты липидной решетки, размеры которых увеличиваются в присутствии белков. Такие нарушения молекулярной упорядоченности жирно-кислотных цепей липидов в мембране достигают своего максимума в температурной зоне $0...-25^{\circ}\text{C}$, и при дальнейшем замораживании до -196°C эти процессы существенно не изменяются. При отогреве замороженных липидных систем изменение

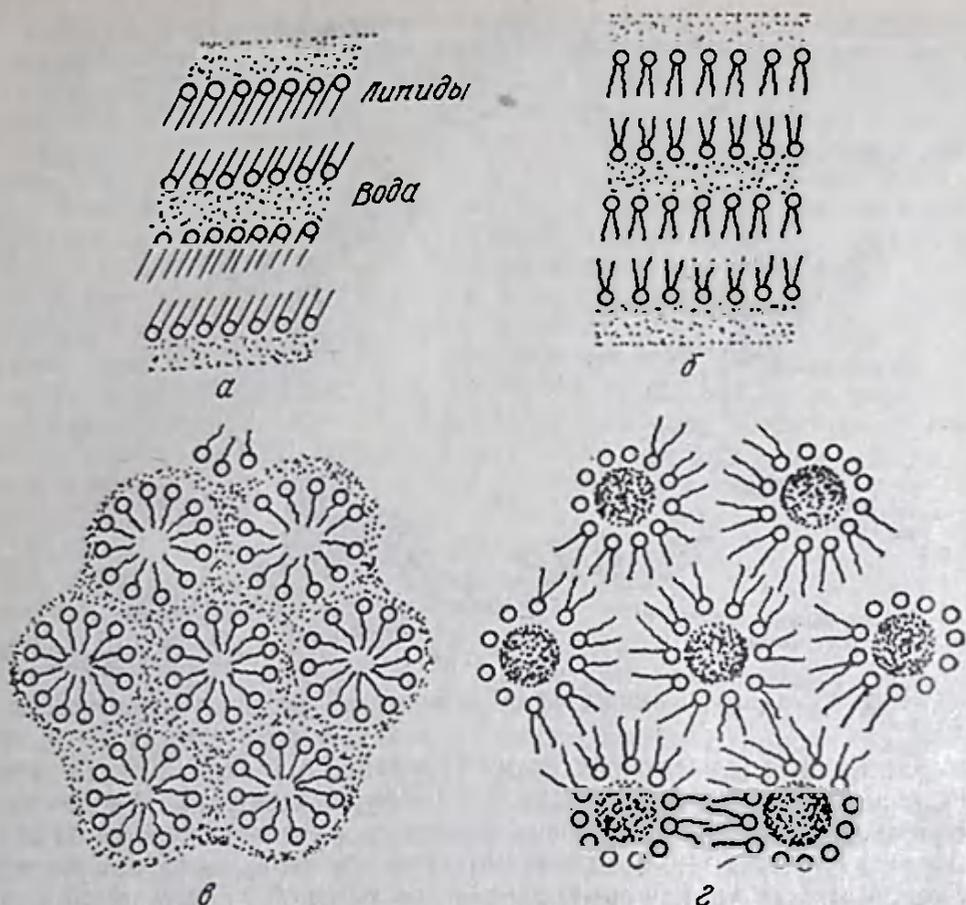


Рис. 41. Структура липидных агрегатов в воде:

а — гелеобразная; б — ламеллярная; в — цилиндры липидов в воде; г — цилиндры воды в липидной фазе

структуры выявляется уже при -80°C , а в температурной зоне $-30-0^{\circ}\text{C}$ в липидном слое присутствует несколько структурных фаз липидов, т. е. в результате низкотемпературного воздействия в мембране формируются разнородные по своему составу липидные кластеры, время релаксации которых после отогрева может исчисляться часами.

Исследования, проведенные с помощью ЯМР, ДСК и дифракции нейтронов, показывают, что липидный бислой содержит на поверхности 6—10 молекул воды, которая образует прочную связь с гидрофильными полярными и неполярными группами фосфолипидов, а также с гидрофобными участками жирнокислотных цепей. В липидных системах может быть выявлено несколько типов воды (табл. 24).

Первые два слоя воды формируют гидратную оболочку липида, которая метаболически не активна и не принимает участия в растворении веществ. Основной функцией этих фракций воды является поддержание структуры и конформации фосфолипидной молекулы.

Два других слоя воды участвуют в обмене веществ между цитоплазмой и окружающей средой. Вода в жидких и твердых липидных доменах локализована главным образом в полярной гидрофильной области вокруг фосфатных групп, расположенных вблизи

Таблица 24. Содержание различных фракций воды (число молекул H_2O /молекулу липида) в искусственных фосфолипидных системах, полученных из мозга быка

Фракция воды	Фосфатидилхолин	Фосфатидилэтаноламин	Фосфатидилсерин
Внутренняя	1,0	1,0	1,0
Основная	11,0	11,0	10,0
Межбислойная	11,0	—	120,0
Свободная	23,0	12,0	140,0

центра полярной зоны бислоя. Две первые фракции воды, прилегающие непосредственно к молекуле липида, проявляют свойства, характерные для капиллярной воды, т. е. она обладает высокой плотностью, низкой подвижностью и способностью не кристаллизоваться при отрицательных температурах. Выявлено, что вплоть до концентрации 20 % вся вода в липидной системе фосфатидилхолина представлена гидратным слоем. Как видно из приведенных данных (табл. 24), различные фосфолипиды в различной степени и количестве гидратируют молекулы воды. Предпочтительней гидратируется фосфатидилсерин, затем фосфатидилхолин и в меньшей степени — фосфатидилэтаноламин. При этом молекулы H_2O первого (внутреннего) слоя не кристаллизуются при температурах около $-100^\circ C$, а второго (основная и межбислойная) — при $-60...-50^\circ C$. Согласно другим данным, в нативных мембранах клеток и тканей выявляются три фракции воды, кристаллизующиеся при различных температурах (табл. 25).

На степень связывания воды молекулами липида сильное влияние оказывает природа липидов либо присутствие в липидной фазе различных примесей, например холестерина. Холестерин оказывает существенное влияние на процессы гидратации и дегидратации липидов. При содержании в бислое 30 моль % холестерина каждая молекула фосфатидилхолина гидратируется 9 молекулами H_2O , а в

Таблица 25. Температура кристаллизации и содержание (%) фракций воды в нативных мембранах

Фракция воды	Кристаллизация, $^\circ C$	Содержание фракций воды
Свободная	0...-15	90
Связанная	-35...-50	10
Неподвижная (проч. несвязанная)	-70 и ниже	0

Таблица 26. Влияние холестерина на гидратацию везикул и дисперсий фосфатидилхолина при $-25^\circ C$ (моль H_2O /моль липида)

Состояние системы	Содержание холестерина, моль/%	Гидратация
Лизосомы	0,0	6,5
	30,0	9,0
	50,0	150,0
Дисперсии	0,0	6,5
	30,0	9,0
	50,0	14,0

отсутствие холестерина — лишь 6 молекулами H_2O (табл. 26). При добавлении холестерина в систему из яичного фосфатидилхолина число прочносвязанных молекул увеличивается вдвое. Это происходит в результате дополнительной гидратации молекул холестерина и увеличения средней площади полярных головок фосфолипидов, что повышает возможность их гидратации.

Дегидратация головок липидов происходит при замораживании и достигает своего максимума в диапазоне $-30...-40^\circ C$. Фосфатидилхолиновая фаза бислоя мембран более устойчива к действию низких температур, чем, например, система заряженного фосфолипида — фосфатидилэтаноламина. Это связано с тем, что фосфатидилхолин включает значительно большее число молекул H_2O в полость полярной головки и участков бислоя между полярными группами, чем фосфатидилэтаноламин. Температурная зона до $-10^\circ C$ может считаться нижней границей, до которой сохраняется еще высокая подвижность полярных групп липидов, а при более низких температурах происходит их мобилизация, т. е. завершается большинство фазово-структурных переходов. Внутримембранные перестройки липидного бислоя, связанные с дегидратацией, наряду с фазовыми переходами являются важными факторами формирования в мембране различных по своим размерам ТМД.

Выявлено, что степень гидратированности зависит от природы фосфолипидов. Так, например, фосфатидилэтаноламин адсорбирует гораздо меньше молекул воды, чем фосфатидилхолин, поскольку его фосфатные группы упакованы таким образом, что не имеют резерва площади для дополнительной гидратации. Однако в смеси с фосфатидилхолином эти свойства фосфатидилэтаноламина изменяются. Более высокая устойчивость гидратированных липидов фаз из фосфатидилхолина при низких температурах определенным образом влияет на стабильность плазматических мембран, в которых этот фосфолипид сосредоточен главным образом на внешней стороне бислоя. Важным является тот факт, что фосфатидилхолин может связывать значительно большее число молекул H_2O в полость полярной головки и бислоевой участок между полярными группами, чем другие липиды, и таким образом как самостоятельно, так и в комплексе с холестерином поддерживать определенную степень упорядоченности компонентов бислоя при низких температурах. Как видно из рис. 42, при максимальной гидратации фосфатидилхолина максимум перехода сдвигается от $\sim 67^\circ C$ в безводном липиде к $\sim -10^\circ C$. При замораживании и, особенно, высушивании, когда теряются фракции межбислоевой и связанной воды, резко изменяется агрегатное состояние липидного бислоя: происходят фазовые переходы, кластерообразование и латеральное разделение в плоскости бислоя. Практически происходит искажение планарной упаковки бислоя мембраны. В таком состоянии бислоя теряет способность контролировать диффузию ионов и транспорт биомолекул внутрь цитоплазмы. При снижении температуры гидратация полярных головок изменяется главным образом при температурах фазового перехода.

В отличие от белков степень гидратации липидов в составе мембраны при определенных температурах гораздо выше. Например, при замораживании липосом из фосфатидилхолина от 0 до -7°C каждая молекула, входящая в микроокружение липида, способна гидратироваться 10 молекулами H_2O , в то время как белки при этих температурах практически не гидратируются. Однако при понижении температуры до -25°C степень гидратации липидной молекулы снижается вдвое, а при -35°C гидратация практически не происходит, поскольку вода начинает вымораживаться в лед. Имеются различия в динамике гидратации искусственных и природных мембран. Если при температурах порядка $-34\dots-35^{\circ}\text{C}$ искусственные липидные системы способны еще гидратироваться, то в нативных мембранах этого не происходит.

Фракции мембраносвязанной и межбислойной воды контролируют латеральную диффузию гидратированных полярных групп липидов и белков, ионную проницаемость и работу мембраносвязанных ферментов. Тот факт, что при температурах $0\dots-35^{\circ}\text{C}$ происходит значительная дегидратация полярных головок липидов, играет существенную роль в нарушении функции липидного бислоя мембран.

Роль холестерина. Холестерин мембран играет важную роль в фазово-структурном состоянии липидного бислоя и функциональной активности транспортных и метаболических систем клетки как при физиологических, так и при низкотемпературных условиях. Как видно из приведенных ниже данных, холестерин в плазматических мембранах распределен неравномерно, основная его масса сосредоточена в плазматических мембранах миелиновых мембран. Внутренняя мембрана митохондрий вообще не содержит холестерина, а в мембранах клеточного ядра и эндоплазматической сети он при-

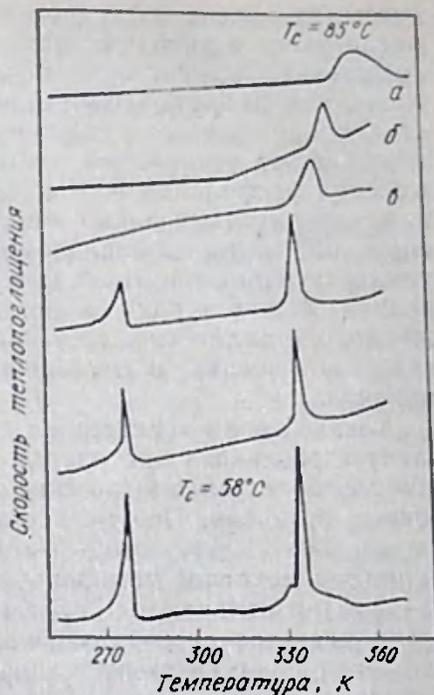


Рис. 42. Зависимость удельной теплоемкости от температуры для яичного лецитина при концентрации воды 15,2 % (а), 10,5 % (б) и 3,6 % (в)

Природа мембран	Коэффициент мольного отношения холестерина / фосфолипиды
Тени эритроцитов	0,89
Миелиновые мембраны	1,32
Мембраны гепатоцитов	0,26
Саркоlemma	0,24

существует в очень небольшом количестве. Холестерин неравномерно распределен в липидных монослоях мембраны. Так, например, его содержание во внешнем монослое мембраны эритроцита вдвое выше, чем во внутреннем. Холестерин в составе мембраны вызывает два процесса: так называемый конденсирующий эффект, т. е. способствует увеличению плотности упаковки (упорядоченности) молекул фосфолипидов, уменьшая их объемную поверхность и подвижность, и пластифицирующий (разжижающий) эффект. Конденсирующий эффект в липидном бислое холестерин осуществляет при температурах, выше точки фазового перехода липидов, а при более низких температурах — пластифицирующий, т. е. поддерживает жидкокристаллическое состояние бислоя. Холестерин в определенном соотношении с фосфолипидами регулирует гидратацию их молекул.

Касаясь роли холестерина в структурной стабильности клеток, следует различать два определенных типа структурной организации мембран: плазматические мембраны и мембраны внутриклеточных органелл. Первые достаточно хорошо обогащены холестерином (30—35 %), который локализован в основном во внешнем липидном монослое мембраны, вторые содержат мало холестерина (1—2 %) и отличаются более выраженной пластичностью. Холестерин является своеобразным «пластификатором» мембраны, поскольку влияет на степень гидратации и кинетические параметры липидного бислоя. Такие свойства холестерина во многом являются результатом его специфического взаимодействия с фосфатидилхолином. Действие холестерина на головки фосфолипидов носит сложный характер и зависит от их фазового состояния. Холестерин конденсирует (т. е. повышает плотность упаковки) бислои при температурах выше точки фазового перехода фосфолипидов и разжижает его при более низких температурах. В присутствии 30 моль % холестерина в значительной степени улучшается степень гидратации полярных головок фосфатидилхолина, поскольку в его присутствии увеличивается размер полярной полости, которая содержит фракцию связанной воды с очень низкой криоскопической точкой.

При высоком содержании холестерина в мембране (выше 30 моль %) количество незамерзающей воды в липидных системах увеличивается. Это связано с тем, что часть участков липидного бислоя, с которыми ассоциирована незамерзающая вода, экспонируется внутрь, т. е. замедляются их подвижность и обмен с окружающей средой.

При смешивании холестерина с фосфолипидами формируются локальные участки, в которых фазово-структурные переходы и кластеризация молекул протекают по-иному, чем в чистых липидных фазах. Например, фазовый переход в липидных бислоях из дипальметонил-фосфатидил-холина начинается при 39 °С, а после добавления холестерина температурный интервал перехода значительно расширяется. Если содержание холестерина в мембранах превышает 33 моль %, то фазово-структурные переходы и в липидах трудно выявляются, т. е. в присутствии холестерина граница

температуры фазовых переходов в мембранах сглаживается. Например, в эритроцитарных мембранах начало фазовых переходов липидов обнаруживается в диапазоне $-10...-20^{\circ}\text{C}$ с максимумом при -8°C . Это происходит потому, что холестерин в бислое фосфолипидов формирует фазу, промежуточную по степени упорядоченности жирнокислотных цепей между гель-фазой и жидкокристаллическим состоянием.

Присутствие молекул холестерина в наружном монослое мембраны обуславливает различия в текучести мембраны, т. е. холестерин поддерживает асимметрию текучести (более ригидный наружный слой и более жидкий внутренний).

В мембранах, истощенных по холестерину, например в наружной мембране митохондрий, потеря текучести охватывает почти всю массу липидов уже при $-5...-8^{\circ}\text{C}$, поскольку в ее составе очень низкий процент холестерина и фосфолипидов с ненасыщенными жирными кислотами.

Сродство холестерина с различными фосфолипидами неодинаково и зависит от природы их полярной группы и характера жирнокислотных остатков. В частности, оно уменьшается в следующем направлении: сфингомиелин \rightarrow фосфатидилхолин \rightarrow фосфатидилэтаноламин. В различных смесях фосфатидилхолинов холестерин избирательно взаимодействует с фосфолипидами, имеющими более низкую температуру фазового перехода. Холестерин в мембранах распределен неравномерно и находится в виде микродоменов. Поскольку холестерин влияет на степень упаковки, подвижность и фазовое состояние фосфолипидов бислоя, он тем самым может изменять активность мембраностроенных ферментов, проницаемость липидного бислоя для воды и малых молекул. Если содержание холестерина в мембране высокое, она становится менее проницаемой, а при уменьшении концентрации, наоборот, ее проницаемость увеличивается (рис. 43). При замораживании холестерин переме-

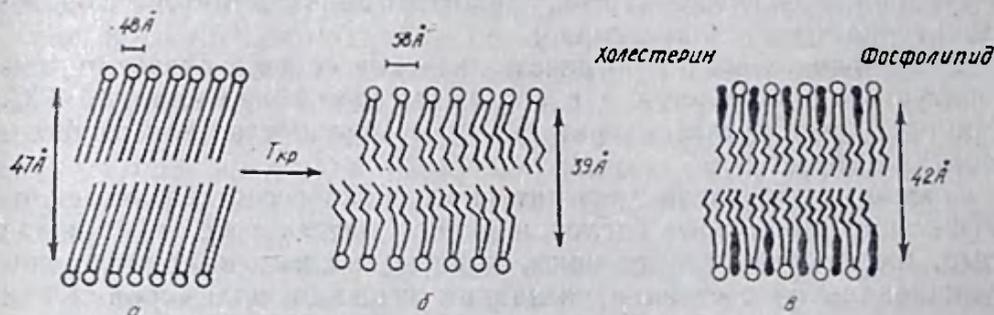


Рис. 43. Изменение упаковки бислоя при термoinдуцированном фазовом переходе (от а к б) и при встраивании в бислой молекул холестерина (в)

шивается с остальной массой липидов в бислой с образованием кластеров липидов, которые достаточно устойчивы по своей структуре. Поэтому чаще всего структурно-фазовым превращениям подвергаются участки чистых жидкокристаллических липидов на границе с твердыми доменами, находящимися в окружении белков,

из которых холестерин исключен. Отсюда следует, что в интервале температур до -20°C нестабильность мембран клеток, обогащенных холестерином, является следствием изменения структуры, главным образом, пограничных липидных доменов, а также липидов, входящих в микроокружение белков. В мембранах с низким содержанием холестерина, например в мембранах *E. Coli*, охлаждение в интервале от 37 до -20°C сопровождается фазовым изменением основной массы липидов, т. е. нестабильность мембраны носит генерализованный характер. Этим во многом объясняются различия в поведении клеток при термальном шоке и замораживании. Более значительная площадь нестабильных участков в мембранах клеток с низким содержанием или полным отсутствием холестерина является причиной их гибели при термальном шоке в изоосмотических условиях, в то время как в клетках, мембраны которых обогащены холестерином, термальный шок проявляется в условиях гиперосмолярности.

Со структурной ролью холестерина в плазматической мембране тесно связана его функциональная роль как регулятора проницаемости мембран для различных веществ и активности мембрановстроенных ферментов, поскольку он обладает двойственным эффектом. Если холестерин оказывает на мембрану конденсирующий эффект, то проницаемость ее уменьшается, если пластифицирующий (разжижающий), то скорость проникновения веществ увеличивается. Эффективность действия холестерина зависит от температуры: она тем выше, чем выше текучесть мембраны. На активность мембраносвязанных ферментов холестерин оказывает влияние через механизм изменения вязкости липидного бислоя. При увеличении его содержания в мембране вязкость липидного бислоя увеличивается, что приводит к снижению активности фермента, и наоборот.

Таким образом, холестерин играет важную роль в низкотемпературной стабильности клеток, где играет роль регулятора фазово-структурного состояния липидов.

Роль ионов. Следует различать значение ионов в развитии температурного шока клеток, т. е. при их быстром охлаждении до 0°C , и роль ионов в низкотемпературной нестабильности (или стабильности) мембран.

Поскольку развитие температурного шока тесно связано с модификацией липидного бислоя и белков цитоскелета, то, прежде всего, имеют значение те ионы, которые влияют на структурно-функциональное состояние указанных выше биополимеров. К их числу прежде всего следует отнести Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ и др. Эти катионы путем электростатического взаимодействия с липидами и белками экранируют их отрицательные заряды и способствуют сближению их реакционноспособных концевых групп. Если нарушается соотношение указанных выше катионов внутри клетки, то это приводит к изменению структуры и функции белков цитоскелета, стабилизирующих ее структуру. Концентрация ионизированного Ca^{2+} внутри клетки строго контролируется ионными насо-

сами и специфическими кальций-депонирующими белками типа кальмодулина, а также мембранами СПР и митохондрий. При сдвиге концентрации ионизированного Ca^{2+} более чем 10^{-6} М белковый скелет деполимеризуется (рассыпается), и мембрана клетки теряет свою устойчивость.

Взаимодействие ионов Ca^{2+} , H^+ , Mg^{2+} с липидами бислоя существенно влияет на их упаковку и температуру фазовых переходов. Двухвалентные (но не одновалентные) ионы играют важную роль в формировании электростатических взаимодействий компонентов мембраны, обеспечивая тем самым поддержание их нативной конформации. Эти связи могут нарушаться в присутствии высоких концентраций солей, нейтрализующих поверхностные заряды, в результате чего липид-липидные и липид-белковые комплексы диссоциируют. Электростатические взаимодействия играют основную роль в связывании основных белков с кислыми фосфолипидами.

Повышение ионной силы среды влияет на гидрофобные взаимодействия в мембране. Так называемые хаотропные анионы (CN^- , ClO_4^- , Br^-) снижают силу этих взаимодействий в результате люотропного разрушения структуры вициальной и связанной воды. В присутствии этих анионов вода становится более липофильной, что ведет к перемещению в водную фазу неполярных групп липидов. Другие анионы типов CH_3COO^- , F^- и SO_4^{2-} , наоборот, стабилизируют структуру воды мембран.

Многие липидные и белковые молекулы содержат участки для связывания или отдачи H^+ , т. е. так же, как и H_2O , участвуют в образовании водородных связей, устойчивость которых усиливается ван-дер-ваальсовыми силами. Экзогенный Ca^{2+} является активатором внутримембранных фосфолипаз, и повышение его концентрации в среде сопровождается повышением процессов гидролиза фосфолипидов мембран. Поскольку в зоне эвтектики электролитов NaCl и KCl концентрация солей достигает 5,2 и 1,2 М, структура воды мембран и биополимеров полностью разрушается. Такие высокие концентрации солей вызывают достаточно выраженную дегидратацию клетки, связываются с ее поверхностью и могут изменять потенциал отрицательно заряженных групп белков и липидов в сторону их электронейтральности. Это приводит к изменению ионизации полярных головок липидов, ослаблению ассоциативных связей и силы взаимодействий в системах липид-липид, белок-липид и белок-белок.

Криобиохимическая модификация липидов. Под криобиохимической модификацией липидов понимают обычно их деградацию под влиянием процессов ПОЛ и фосфолипаз. При замораживании — отогреве различных биообъектов всегда можно обнаружить разрушение части фосфолипидов в мембране, особенно выраженное в эвтектической зоне хлористого натрия. Наряду с этим в мембране накапливаются продукты деградации липидов (СЖК, лизофосфатиды и лизолецитины, МДА, диеновые конъюгаты и др.). Процессы деградации фосфолипидов протекают в широкой температурной зоне, охватывающей интервал $21...0^\circ\text{C}$, а также $0^\circ...-25^\circ\text{C}$, когда

в закристаллизованной матрице еще сохраняются жидкие микрофазы, в которых локализуется высококонцентрированная солевая смесь, и изменены тоничность и ионная сила среды (см. рис. 2). Повышение уровня СЖК и лизосоединений в составе клеток может рассматриваться как низкотемпературное активирование мембранных и лизосомальных фосфолипаз, которые активируют процессы гидролиза липидов. Одним из возможных механизмов активации этого фермента в мембране при замораживании — отогреве является нарушение пространственного расположения фермента в результате низкотемпературной гомогенизации липидного бислоя и повышения его проницаемости для экзогенного Ca^{2+} , который является активатором фосфолипаз. В криобиологическом отношении важным является то, что активность мембраносвязанных фосфолипаз (например, фосфолипазы A_2 митохондрий) выявляется при отрицательных температурах порядка $-5...-25^{\circ}C$, т. е. при температурах начала и полного завершения фазовых переходов липидов внутренней мембраны митохондрий.

После медленного замораживания до $-25^{\circ}C$ и последующего отогрева в составе мембраны накапливаются лизофосфатиды и свободные жирные кислоты. Такой фермент, как триацилглицеридлипаза дрожжей, также активируется при замораживании до $-20^{\circ}C$, что приводит к деградации липидов, уменьшению их содержания в замороженном объекте (рис. 44). В результате низкотемпературного гидролиза фосфолипидов под влиянием мембранных фосфолипаз происходит уменьшение количественного содержания липидов бислоя (табл. 27). Видно, что скорость отогрева играет важную роль в сохранении основных классов липидов, содержание которых снижается (фосфатидилхолина и этаноламинфосфатида), если пробы медленно отогре-

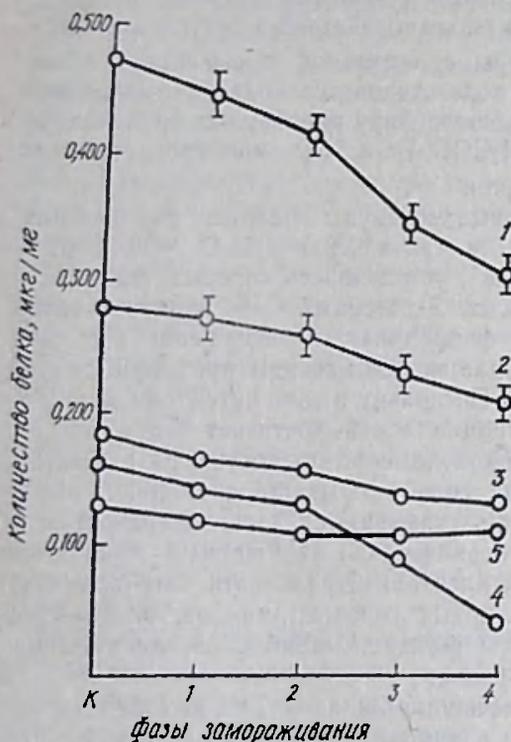


Рис. 44. Характер количественного снижения содержания основных классов липидов в мембранах митохондрий под влиянием процессов ПОЛ и фосфолипазного гидролиза в процессе медленного ($1-2^{\circ}C/мин$) замораживания до $-30^{\circ}C$; 1 — лецитин; 2 — $0^{\circ}C$ (ЭАФ), 3 — $15^{\circ}C$ (кардиолипин); 4 — $-25^{\circ}C$ (холестерин); 5 — $-30^{\circ}C$ (инозитолфосфатид)

Таблица 27. Содержание фосфолипидов в митохондриях печени белых крыс после быстрого замораживания (300—400 °С/мин) и различных способов отогрева (мкг Р_н/мг белка)

Природа фосфолипида	Скорость отогрева		
	Контроль (незаморожен- ные)	Быстро при тем- пературе 40 °С	Медленно при тем- пературе 18 °С
Фосфатидилхолин	22,0±3,9	19,7±2,6	13,7±4,8
Этаноламинфосфатидилхолин	18,0±2,4	16,4±2,5	11,5±5,0
Кардиолипин	9,5±2,2	9,0±3,0	9,1±3,1
Инозитолфосфатидилхолин	5,5±0,4	5,1±0,4	5,1±0,4

вать. Потеря липидов из состава мембраны является причиной нарушения поинной проницаемости мембран, поскольку функция большинства локализованных в мембране белков-переносчиков является липидзависимой, т. е. их активность регулируется фазово-структурным состоянием аннуляриных липидов. Для проявления активности митохондриальной β-оксипутиратдегидрогеназы и сукцинатоксидазы требуется присутствие фосфатидилхолина. При замораживании митохондрий до —25 °С эти ферменты «выдавливаются» из состава мембраны, поскольку фиксирующие их липиды при этих температурах переходят в твердое состояние. Активация фосфолипазы в этом случае связана со структурными превращениями липидов, в результате чего фермент изменяет свое пространственное расположение и становится более уязвимым к действию экзогенного Са²⁺. Поскольку при замораживании липиды мембран переходят в гель-фазу, они особенно активно атакуются фосфолипазами, т. е. фазово-структурный переход липидного бислоя из жидкокристаллического состояния в твердое индуцирует активность фермента. Накопление продуктов фосфолипазной дегградации фосфолипидов в митохондриях приводит к нарушению процессов генерации и аккумуляции энергии после отогрева. Так, например, повышение концентрации свободной олеиновой кислоты подавляет окислительное фосфорилирование в митохондриях печени крыс.

Фактором, ведущим к развитию низкотемпературной патологии мембран клетки, является также свободно-радикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ), которому подвергаются главным образом полиненасыщенные жирные кислоты (см. рис. 44). Особенно активно эти процессы протекают в структурах, содержащих катализаторы и ПОЛ-Fe-белки (например, цитохромы, гемоглобин). Так, в митохондриях важную роль в инициировании процессов ПОЛ играют геминные (цитохром с) и негеминные железо-серные белки электрон-транспортной цепи (например, НАД-Н-Ко-с-редуктаза), а также активные формы кислорода (O₂⁻). Основными причинами, ведущими к инициированию процессов ПОЛ в липидном бислое мембран при охлаждении и замораживании — отогреве, являются гипоксия, лиотропное действие гиперконцентрированных солей и нарушение структурной интеграции мембраны, что приводит к стерическому сближению субстра-

та (липидов) и катализаторов (Fe-содержащие белки) процессов ПОЛ. В результате действия этих факторов при замораживании—отогреве в мембранных фракциях микросом или митохондрий происходит избыточное накопление аннион-радикалов O_2^- , которые в присутствии НАД—Н активируют процессы ПОЛ. Продукты, образующиеся при ПОЛ, например гидроперекиси, являются высокогидрофильными соединениями, в силу чего они эффективно гидратируют бислой, разрыхляя мембрану. Процессы ПОЛ после замораживания до -25°C очень активно развиваются во внутренней мембране митохондрий, липидный бислой которой обогащен полиненасыщенными жирными кислотами и содержит достаточное количество железосодержащих белков. При разветвлении цепей ПОЛ идет распад фосфолипидов до промежуточных (дненовые конъюгаты) и конечных продуктов (малоновый диальдегид, эпоксиды и др.). При этом содержание основных классов липидов в мембране снижается, функция клеток или внутриклеточных органелл нарушается. Процессы ПОЛ могут протекать в мембранах замороженных клеток вплоть до -25°C , т. е. когда в ледяных канальцах еще сохраняются жидкие микрофазы, содержащие концентрированные растворы солей, которые оказывают хаотропное действие на структуру мембран и фракцию вичиальной воды. Снижение содержания фосфатидилхолина и этаноламинофосфатида в составе мембран митохондрий ведет к их набуханию, а в дальнейшем, в условиях нарастающей дегидратации,— к распаду мембран на фрагменты, поскольку в этих условиях резко ослабляются гидрофобные липид-липидные и липид-белковые взаимодействия в мембране. Изменение фазового состояния липидов при охлаждении нарушает пространственную локализацию цитохрома *c* и усиливает его контакт с липидами. Особенно активна окисленная форма цитохрома *c*, поскольку она имеет повышенное сродство с липидами. Сейчас имеются экспериментальные доказательства, что процессы ПОЛ после замораживания — отогрева индуцируются в различных органах и тканях, содержащих большое количество полиненасыщенных жирных кислот (ткани печени и мозга, эритроциты, микросомы). Значительно меньше известно о состоянии антиоксидантных систем защиты мембран от ПОЛ при замораживании — отогреве.

Температурно-зависимые изменения мембран внутриклеточных органелл

Криповреждение митохондрий. Митохондрии представляют собой внутриклеточные мембранные структуры, основной функцией которых являются генерация и трансформация энергии клетки и внутриклеточное распределение ионов (рис. 45). Хотя форма и величина митохондрий, выделенных из различных тканей, не одинаковы, их структура едина и содержит наружную и внутреннюю мембраны, межмембранное пространство и матрикс. Органеллы, изолированные в традиционной сахарозной среде, отличаются бо-

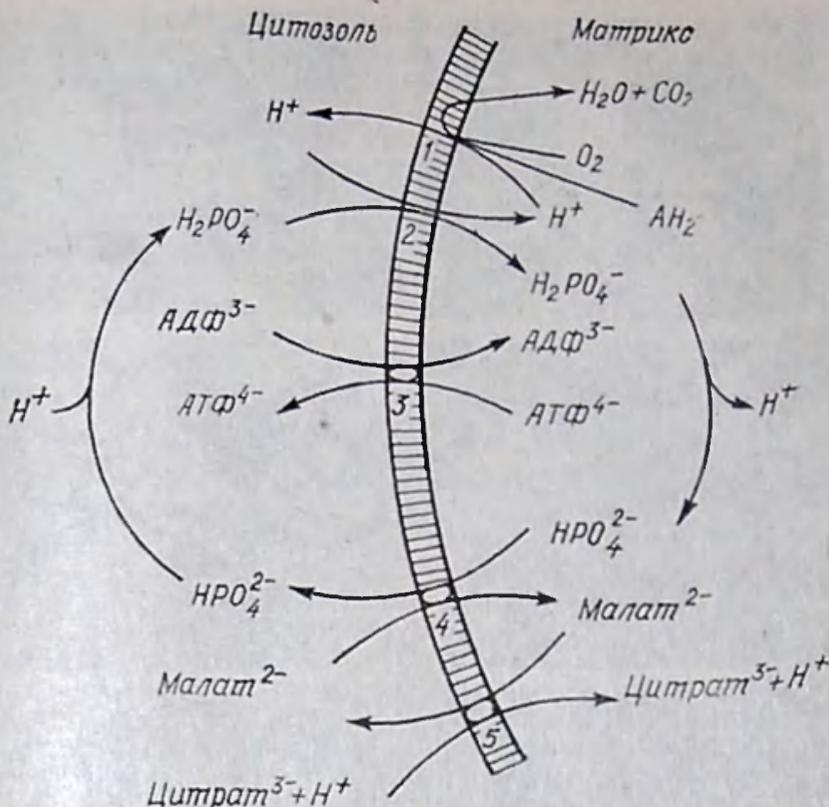


Рис. 45. Схема транспортного каскада внутренней митохондриальной мембраны. Дыхательная цепь откачивает ионы H^+ из матрикса; $(H_2PO_4^-, H^+)$ -симпортер и $(АДФ^{3-}/АТФ^{4-})$ -антипортер переносят фосфат и АДФ в матрикс в обмен на АТФ; HPO_4^{2-} —малат $^{2-}$)-антипортер катализирует вход малата; малат $^{2-}$ (цитрат $^{3-} + H^+$)-антипортер вызывает накопление в матриксе цитрата

лее сжатым матриксом и увеличенным в объеме межмембранным пространством (рис. 46). Эти морфологические отличия обусловлены изменением онкотического равновесия, которое может быть восстановлено введением в среду высокомолекулярных соединений, например поливинилпирролидона. Мембраны митохондрий отличаются от других мембран низким содержанием холестерина и превалированием в их составе заряженных липидов (кардиолипин и др.) и ионов Ca^{+2} . На мембране локализованы системы дыхания и окислительного фосфорилирования, которые генерируют около 90 % АТФ из АДФ и фосфатов. При изменении ионного гомеостаза внутри или вне клетки, величины рН, степени дегидратации состояние мембран митохондрий резко меняется: происходит набухание органелл, барьерные свойства мембран нарушаются, что выражается в утечке ионов H^+ , K^+ и Ca^{2+} из матрикса в цитоплазму. Митохондрии как хорошо выраженные мембранные системы весьма чувствительны к действию охлаждения и замораживания —

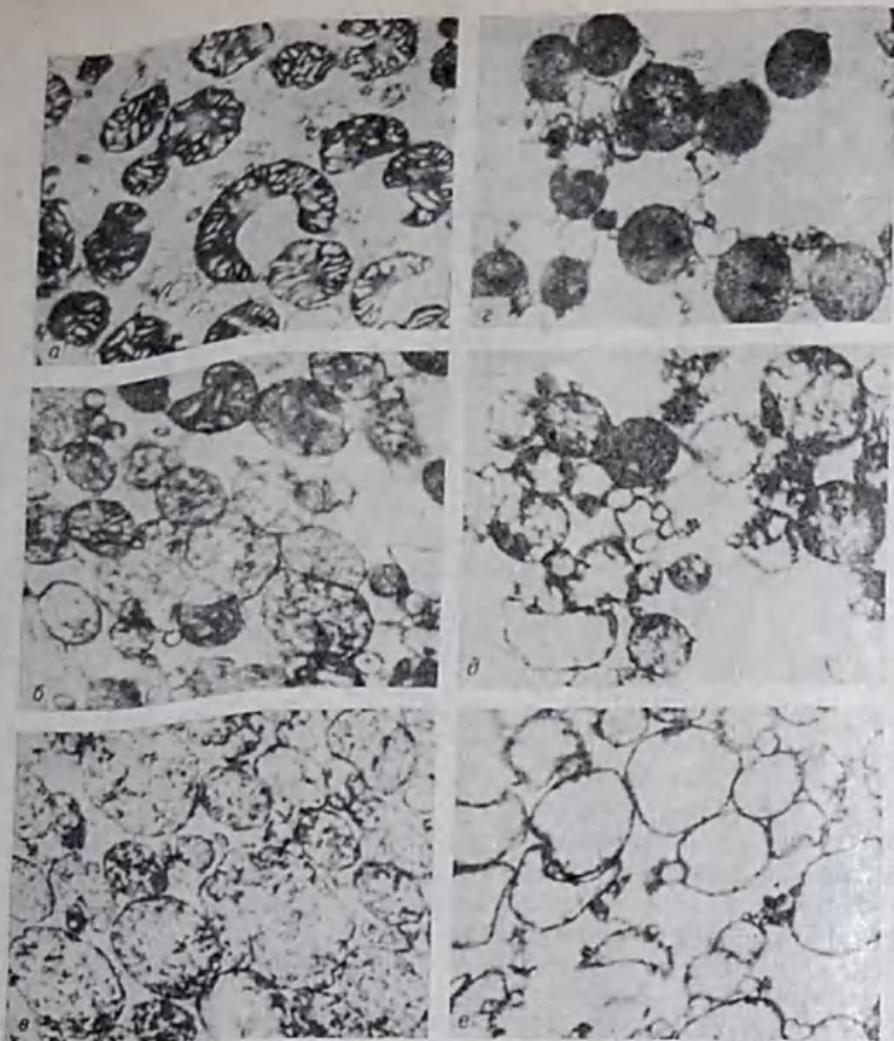


Рис. 46. Ультраструктура фракции митохондрий печени крысы после замораживания — отогрева в сахарозной (а, б, в) и солевой (г, д, е) средах (X5000):
 а — сахарозная среда выделения (контроль); б — замораживание и быстрый отогрев; в — замораживание и медленный отогрев; г — солевая среда выделения (контроль); д — замораживание и быстрый отогрев; е — замораживание и медленный отогрев

отогрева, что прежде всего объясняется особенностями строения мембран митохондрий.

Наружная мембрана митохондрий по своему фосфолипидному составу напоминает плазматическую мембрану; в ней также существуют каналы, через которые могут проникать вещества с м. м. до 7—10 000 и ферменты метаболизма белков, жирных кислот, фосфолипидов. Для внешней мембраны характерно присутствие моноаминоксидазы и кинуренин-3-гидроксилазы, которые являются маркерами внешней мембраны. Внутренняя мембрана по своей структуре отличается тем, что весовое соотношение в ней

фосфолипидов и белков составляет всего 0,27 (у внешней — 0,82), она содержит много кардиолипина и мало холестерина и фосфатидилинозитола. Маркерными ферментами внутренней мембраны митохондрий являются сукцинатдегидрогеназа и цитохромоксидаза. На внутренней мембране этих органелл локализованы переносчики фосфата, карбоксилатов, адениновых нуклеотидов и ионов Ca^{2+} . Она характеризуется чрезвычайно низкими показателями проницаемости для ионов и метаболитов, поскольку в мембране отсутствуют специфические переносчики. Ферменты системы окислительного фосфорилирования составляют 20—25 % всех белков внутренней мембраны. Принцип работы внутренней мембраны состоит в том, что ионы водорода метаболитов, образованных в цикле трикарбоновых кислот и β -окисления жирных кислот, расщепляются электронами с образованием аниона O^{2-} и свободного H^+ , который выбрасывается на внешнюю сторону мембраны с образованием электрохимического градиента, который является движущей силой при синтезе АТФ в АТФ-синтетазном комплексе.

Содержание липидов во внутренней мембране митохондрий довольно низкое (27 % массы), а холестерина — менее 4 % общего содержания липидов, что обуславливает легкую солиubilизацию мембран детергентами, низкой ионной силой и рН, т. е. теми факторами, которые формируются в жидких микрофазах в температурном диапазоне 0...—25 °С. Основными фосфолипидами мембран этих органелл являются фосфатидилхолин (41 %) и фосфатидилэтаноламин (33 %), которые содержат ненасыщенные ацильные группировки в C_2 -положении. При низкотемпературном воздействии они могут легко подвергаться перекисному окислению, поскольку приобретают контакт с железосодержащими белками, являющимися активаторами свободно-радикальных процессов.

Мембраны митохондрий обогащены заряженными фосфолипидами — кардиолипином (15 %) и фосфатидилинозитом (8—10 %), что обуславливает суммарный отрицательный заряд поверхности мембраны. Все эти типы фосфолипидов, составляющие 97 % фосфолипидов мембран митохондрий, расположены в основном в наружном слое внутренней мембраны, где расположены полиненасыщенные жирные кислоты. Поскольку мембраны митохондрий содержат мало холестерина, они слабо защищены от термотропных фазовых превращений, которые возникают уже при воздействии умеренно низких температур (0...—3 °С).

При замораживании митохондрий, когда происходит нарушение структуры их мембраны, субстрат окисления (фосфолипиды) и катализатор (железосодержащие белки) пространственно сближаются, что приводит к активации процессов перекисного окисления липидов.

Для нормального функционирования системы окислительного фосфорилирования мембрана должна сохранять свойство непроницаемости для ионов, в частности H^+ . Поэтому замораживание — отогрев как факторы, способствующие повышению неспецифической проницаемости мембран, вызывают разобщение окислитель-

ного фосфорилирования митохондрий. Методом криофрактографии подтверждено, что при температурах $-5...-15^{\circ}\text{C}$ в мембранах митохондрий выявляется отчетливое разделение липидов. При этом дыхательная активность и окислительное фосфорилирование митохондрий резко снижаются, из матрикса в среду выходят K^+ и H^+ (рис. 47), а также такие маркерные ферменты, как малатде-

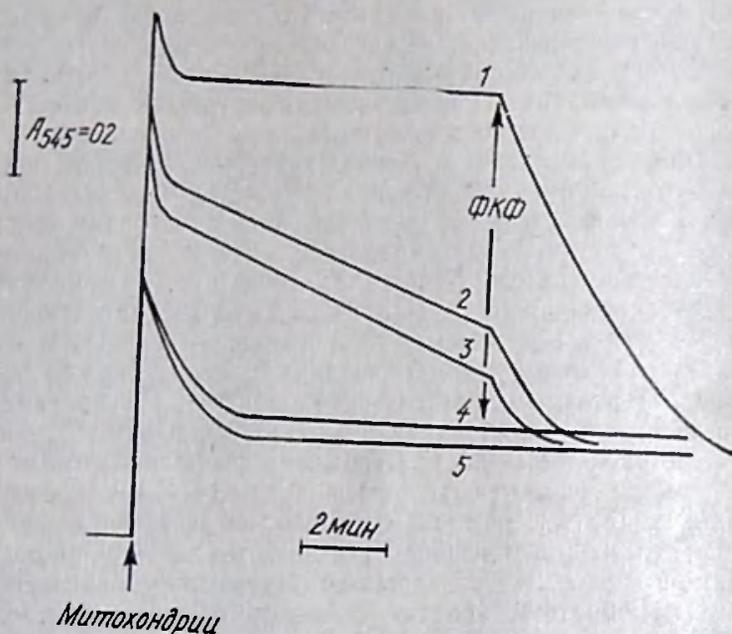


Рис. 47. Влияние скоростей замораживания — оттаивания на протонную проводимость внутренней мембраны митохондрий:

1 — контроль; 2 — быстрое замораживание — быстрый отогрев; 3 — медленное замораживание — медленный отогрев; 4 — медленное замораживание — быстрый отогрев; 5 — быстрое замораживание — медленный отогрев; ФКФ — 3-фторметоксикарбонил-цианидфенилгидразон

гидрогеназа и цитохром С, т. е. мембрана становится проницаемой для ионов и белковых молекул. Поскольку мембраны органелл содержат мало холестерина, фазово-структурные переходы липидов в наружной мембране начинаются вблизи $5-10^{\circ}\text{C}$ и завершаются при $-2...-3^{\circ}\text{C}$; во внутренней мембране эти процессы осуществляются в диапазоне $-3...-12^{\circ}\text{C}$. При этом идет интенсивное формирование во внутренней мембране трансмембранных дефектов, что приводит к полному разобщению сопряжения процессов, генерирующих макроэрги. При медленном охлаждении вблизи $-3...-5^{\circ}\text{C}$ развивается температурный шок, и органеллы лизируют при температурах -8°C , т. е. выше завершения фазово-структурных переходов основной массы липидов. Степень криоповреждений органелл зависит от скоростей замораживания и присутствия в среде эффективных концентраций криопротекторов. При очень быстром (свыше $400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) замораживании до -196°C клеток специфические свойства митохондрий могут сохраняться

в ближайшее время после отогрева. Однако спустя короткий промежуток времени наступает разобщение дыхания и окислительно-форсфорилирования. При других режимах охлаждения органеллы в отсутствие криопротектора в среде замораживания разрушаются, так как начинают действовать так называемые «латентные» факторы криповреждений. К их числу прежде всего относятся лизосомальные гидролазы, а также продукты свободнорадикального перекисления и ферментативной деградации фосфолипидов. В результате развития этих процессов во внутренней мембране возникают трансмембранные дефекты, проницаемые для катионов и ферментов (сукцинатдегидрогеназа, β -оксibuтиратдегидрогеназа). Существенным фактором, нарушающим функцию митохондрий при замораживании, являются диссоциация цитохрома С с внешней поверхности внутренней мембраны и выход его в межмембранное пространство, в результате чего дыхание ингибируется на одном из конечных участков, что приводит к подавлению окисления практически всех энергетических субстратов.

Ферменты, участвующие в окислении субстратов, в минимальной степени повреждаются после быстрого замораживания — быстрого отогрева в сахарозной или маннитной среде, хотя и в этих условиях происходит постепенное разобщение окислительного фосфорилирования, обусловленное высокой ионной проводимостью мембраны и изменением мембранного потенциала.

Если органеллы заморожены по оптимальному режиму, то сформированные в мембране микродефекты могут замыкаться, что сопровождается восстановлением способности генерации мембранного потенциала и синтеза АТФ. Для стимуляции восстановительных процессов в мембранах целесообразно вводить в состав сред хранения НАД-зависимые субстраты или ингибиторы процессов перекисного окисления липидов, например ионол. В целом митохондрии являются органеллами, высокочувствительными к действию низких температур и сопутствующих им факторов. Особенно сильное разрушающее действие на их структурно-функциональное состояние оказывают «эффекты раствора», которые индуцируют во внутренней мембране фазовую сепарацию ее липидных компонентов и деградацию фосфолипидов под влиянием перекисных процессов.

Криповреждение мембран эндоплазматической сети (ЭПС). Эндоплазматическая мембрана клеток представляет собой своеобразную гетерогенную эластичную сеть (рис. 48), способную формировать вакуоли, цистерны, пузырьки и микроканалы. Различают шероховатую и гладкую ЭПС; первая содержит на внешней поверхности ассоциированные рибосомы, вторая представляется в виде свободной мембраны. При искусственном разрыве мембраны цилиндрические структуры ЭПС замыкаются и образуют шероховатые или гладкие везикулы, имеющие размеры 0,05—0,3 мкм в диаметре, которые называются микросомальной фракцией. В микросомальной мембране локализованы две ферментные системы, окисляющие НАДФН и НАДН (схема), которые входят в состав

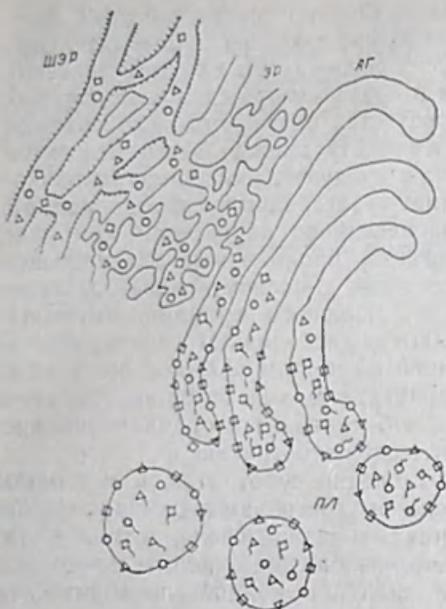
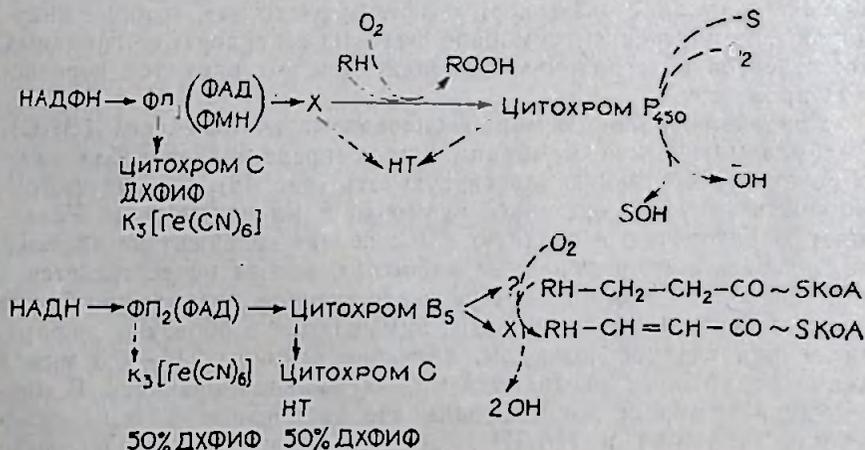


Рис. 48. Схема эндоплазматической мембраны клетки эукариота:

ШЭР — шероховатый ретикулум; ЭР — гладкий ретикулум; АГ — аппарат Гольджи; ПЛ — плазматические пузырьки

вать накоплению токсических соединений. Гидроксилирование в микросомах происходит по типу монооксигеназных реакций: $S + AH_2 + O_2 \rightarrow SOH + A + H_2O$, где S — окисляемый субстрат; H_2 — донор электронов, необходимый для активации O_2 (схема).



активных ферментов, регулирующих в клетке процессы детоксикации ксенобиотиков.

Биологическое значение микросомальной мембраны с локализованными в ней ферментными комплексами достаточно важно, поскольку они обеспечивают детоксикационную функцию гепатоцитов на молекулярном уровне (окисление ядов, ксенобиотиков), переводя их в безвредные соединения.

В процессах детоксикации ксенобиотиков важная роль принадлежит множественным формам цитохрома P_{450} и монооксигеназе микросом, которые обладают способностью окислять (гидроксилировать) самые различные по своей химической природе неполярные молекулы и удалять их из организма, т. е. препятствовать

Центральный фермент окисления — монооксигеназа — содержит НАДФН — специфичный белок флавопротенд с м. м. 81 кДа и цитохром P₄₅₀.⁴

Цитохром P₄₅₀ является акцептором электронов и относится к числу лабильных ферментов — гемопротендов, которые способны в восстановленном состоянии связывать СО с образованием отчетливого максимума поглощения при 450 нм.

НАДФН — специфичный флавопротенд и цитохром *c* — встроены во внешнюю поверхность микросомального пузырька, а цитохром P₄₅₀ пересекает всю толщину мембраны. Поэтому в функционировании этого гемопротенда важную роль играют гидрофобные взаимодействия.

При охлаждении до 0 °С или замораживании клеток микросомальные ферменты повреждаются. При хранении микросом при 0 °С или в замороженном состоянии без криопротектора при температуре —5...—8 °С нарушается функция Fe-активируемого НАДФ и процессов свободного окисления липидов. Однако если клетки печени хранить в смеси этиленгликоль — вода при —15 или 4 °С, то поглощение O₂, скорость гидроксирования и концентрация цитохромов *b* и P₄₅₀ не изменяются в течение 7 сут. При очень быстром замораживании (300—400°/мин) изолированной микросомальной фракции до —196 °С цитохромы *b* и P₄₅₀ полностью сохраняют свои свойства после 32-часового хранения при указанных выше температурах. При 4 °С в средах без криопротекторов эти системы снижают свою активность на 57 % через 7 дней. Это связано с тем, что при 4 °С в мембранах возрастает гидролиз фосфолипидов в результате активации процессов перекисного окисления. Медленное охлаждение изолированных микросом до —15...—20 °С в средах, содержащих ДМСО или глицерин, способствует хорошему сохранению свойств микросом. Спустя 24 ч после замораживания в средах с этими криопротекторами происходят лишь незначительные изменения деметилазной активности, а после трех дней хранения она снижается лишь на 15 %. При этом НАДФН-цитохром-*c*-редуктаза и цитохром P₄₅₀ сохраняют полную активность после 10-дневного хранения.

Ферменты микросом, выделенные из клеток печени койкилотермных и гибернарующих животных, гораздо лучше переносят как гипотермические температуры, так и замораживание. Так, цитохром P₄₅₀, выделенный из микросом печени хомяка, сохраняет свои свойства на протяжении 72 ч при 2 и 20 °С, а цитохром, индуцированный фенобарбиталом, — на протяжении 8 дней. Активность НАДФН-цитохром-*c*-редуктазы гибернарующих животных также изменяется незначительно после 10 дней хранения при низких положительных температурах. Если микросомы печени хомяка заморозить в жидком азоте (—196 °С) и затем хранить при —85 °С, то в течение 3—6 недель существенного изменения количества цитохромов *b* и P₄₅₀, а также активности анилингидроксилазы, нитроредуктазы и этил-морфин- θ -деметилазы не происходит. Лишь спустя 6 недель хранения активность этих ферментов и со-

держание цитохрома P₄₅₀ уменьшаются примерно на 9—10 %. При медленном (1—2 °С/мин) замораживании микросомной суспензии до —40 °С спустя 3—4 сут активность системы 0-деметилирования кодеина и морфина, 0-деметилирования кодеина и гидроксילирования диэтилтриптамина снижается на 20—25 %, а через 30 дней — на 50 %. Цитохром P₄₅₀, выделенный из клеток крыс и кроликов, является более стабильным в том случае, если микросомы хранить не при 0°, а при —15 °С в виде плотного осадка. Микросомальный фермент гепатоцитов — КоАР, регулирующий скорость биосинтеза холестерина в печени крыс, обратимо инактивируется при низких температурах, однако при 0 °С утрачивает 80 % своей активности уже через 30 мин. Микросомальные ферменты микроорганизмов по сравнению с клетками эукариотов более криоустойчивы и практически не разрушаются после замораживания в средах, содержащих защитные добавки.

Как видно, изолированные из клеток микросомальные системы довольно устойчивы к действию быстрого замораживания — отогрева, однако плохо переносят длительное охлаждение при 0 °С и медленное замораживание, если в среде отсутствуют такие криопротекторы, как ДМСО, глицерин или 1—2-пропандиол.

При охлаждении либо замораживании клеток ферментные системы ЭПС повреждаются в результате действия двух факторов: развития ишемии и влияния «эффекта раствора», которые индуцируют развитие латентных повреждений мембран, вызванных действием лизосомальных гидролаз и продуктов ПОЛ. При сравнении криоустойчивости митохондрий и систем микросомального окисления обнаруживается, что при полном разобщении процессов дыхания и фосфорилирования в замороженных гепатоцитах печени крысы микросомальные ферменты сохраняют высокую гидроксилазную активность. Например, хранение гепатоцитов при 2—4 °С на протяжении 5—6 дней практически не сопровождается изменением процессов гидроксילирования анлина, диметиланилина и аминопирина в микросомах, в то время как функция митохондрий в этих условиях полностью подавляется уже через 24 ч.

Таким образом, системы гидроксילирования субстратов, протекающих на микросомах, обладают более высокой устойчивостью к условиям гипоксии и действию пониженных температур, чем, например, процессы дыхания и фосфорилирования в митохондриях. Механизм указанной выше криоустойчивости микросом во многом остается неясным.

Криповреждения лизосом. Лизосомы локализованы внутри клеток в особые мембранные пузырьки, содержащие в своем составе гидролитические ферменты в неактивном (латентном) состоянии. Наиболее богаты лизосомальными пузырьками сегментоядерные нейтрофилы, которые в организме выполняют фагоцитарную роль. Достаточно много лизосом содержится также в цитоплазме других типов клеток — тироцитах, гепатоцитах, лимфоцитах. Существуют первичные и вторичные лизосомы, имеющие

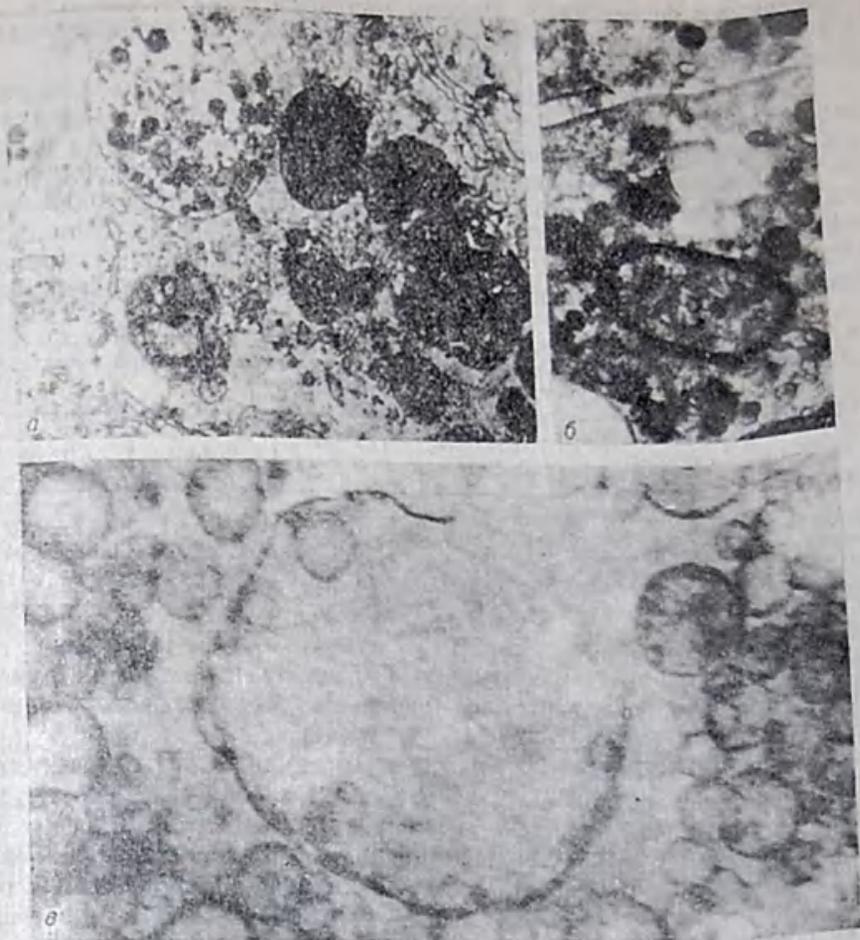


Рис. 49. Внутриклеточные лизосомальные пузырьки (а, б) и повреждение мембран лизосом после замораживания (в)

различные внешний вид и внутреннее строение (рис. 49). Лизосомы играют важную физиологическую роль в процессах фагоцитоза, внутриклеточной деградации различных биополимеров, т. е. участвуют в процессах обновления компонентов внутриклеточных органелл и плазматических мембран. Мембрана лизосом не устойчива к воздействию различных факторов: ультразвука, токсинов, химических ядов, гипоксии, низкой и высокой температур. В результате этого воздействия она становится проницаемой для кислых гидролаз, которые выходят в цитоплазму и подвергают гидролизу компоненты плазматических мембран, генетического аппарата, митохондрий и других органелл, вызывая так называемые латентные повреждения. К числу маркерных ферментов внутреннего пространства лизосом относятся кислая фосфатаза, кислые ДНКаза и РНКаза, арилсульфатаза А и В. Мембраносвязанными

маркерными ферментами лизосом являются β -глюкозидаза, 3-й и 4-й изоферменты кислой фосфатазы, а также 1-я и 5-я фракции неспецифической эстеразы и катепсины.

Выход кислых гидролаз в цитоплазму может происходить при охлаждении клеток до 0 °С и особенно после замораживания клеток. Изменение проницаемости мембран лизосом не всегда вызывает одновременное и параллельное освобождение гидролитических ферментов, что объясняется различной степенью прочности связей их с мембраной. Если изолированные лизосомы замораживают медленно (1—2 °С/мин), то степень элиминации гидролаз будет зависеть от конечной температуры охлаждения (табл. 28).

Таблица 28. Влияние медленного замораживания лизосом до различных температур на уровень неседиментируемой активности ферментов (мкмоль субстрата/мг белка за 1 мин)

Фаза замораживания	Температура, °С	Кислая фосфатаза	РНКаза	ДНКаза
Контроль	—	0,0	1,4±8,1	0,17±0,02
Начало кристаллизации	—5,0	0,0	2,6±0,3	0,28±0,04
Конец кристаллизации	—15	0,4±0,08	3,7±0,4	0,38±0,04
Конечная температура	—35	0,8±0,12	4,5±0,3	0,57±0,01

Видно, что уже при температуре —5 °С из лизосом элиминируют РНКазу и ДНКазу, а при более низких температурах — и кислая фосфатаза.

Особенно чувствительны лизосомы к изменению тоничности среды и pH, которые, как известно, существенно изменяются в жидких микрофазах ледяных канальцев при медленном замораживании, когда в эвтектике концентрация NaCl достигает 5,2 М, что более чем достаточно для нарушения барьерных свойств мембран лизосом. Из табл. 29 следует, что основная масса гидролаз из лизосом выходит уже после замораживания лейкоцитов человека до —30 °С. По мере понижения температуры до —196 °С их активность в среде постепенно повышается и превышает исходные данные в сотни раз (рис. 50).

Таблица 29. Активность лизосомальных ферментов в супернатанте при медленном замораживании лейкоцитов человека до —196 °С (мкмоль субстрата/мг белка за 1 мин)

Температура замораживания, °С	Виды ферментов			
	РНКаза	ДНКаза	Катепсины	Кислая фосфатаза
Контроль	0,08	0,03	0,15	0,02
—30	2,06	0,83	3,50	0,46
—70	3,23	1,27	5,62	0,80
—140	4,66	2,23	8,41	1,52
—196	6,37	3,19	9,37	2,05

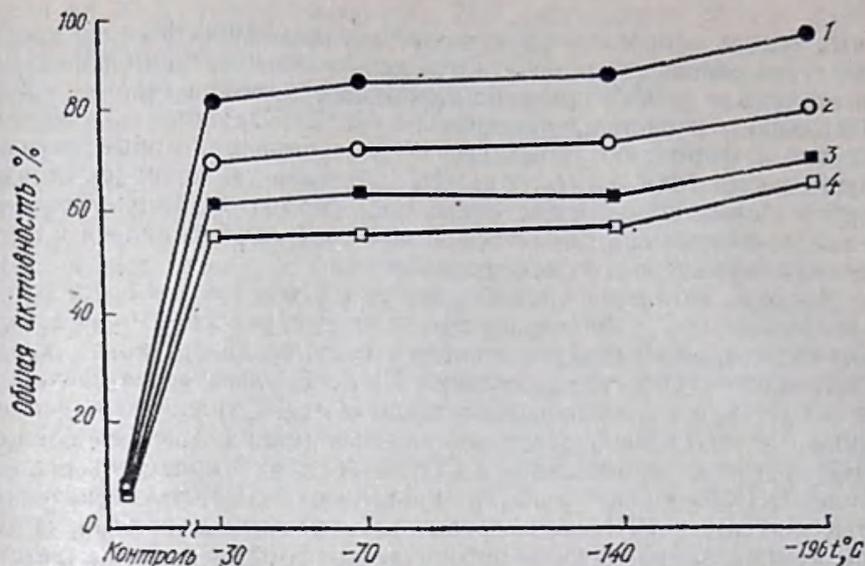


Рис. 50. Неседиментируемая активность РНКазы (1), ДНКазы (2), катепсина Д (3) и кислой фосфатазы (4) после замораживания лизосом до различных температур

Криобиологическое значение лизосом заключается в том, что в процессе неадекватного криоконсервирования клеток или тканей из лизосомальных пузырьков выходят высокоактивные гидролазы, которые вызывают селективное разрушение тех или иных микромолекулярных и мембранных структур в цитоплазме, способствуя таким образом развитию вторичных «латентных» повреждений. Высвобождение гидролитических ферментов из лизосом при замораживании обнаружено при консервации клеточных суспензий, тканей и органов. Поэтому определение в надсадочной жидкости уровня вышедших лизосомальных гидролаз широко используют на практике в качестве диагностического теста глубины низкотемпературного повреждения того или иного биообъекта.

Некоторые соединения, используемые при консервации биообъектов, стабилизируют мембрану лизосом и могут в известной мере снижать уровень солиubilизации кислых гидролаз. К их числу относятся эффективные концентрации ДМСО, низкомолекулярных полиэтиленгликолей, 1,2-пропандиола, а также некоторые мембранотропные соединения, например глюкокортикоиды, противовоспалительные вещества (например, ацетилсалициловая кислота), мембранные стабилизаторы — хлорпромазин, хлорохин, а также некоторые жирорастворимые витамины (ретинол, витамин Д, токоферол).

Криповреждения ядерного аппарата. Ядро клетки в состоянии интерфазы является весьма сложной структурой, в состав которой входят мембрана, нуклеоплазма или кариолимфа, хроматин, кариосомы и ядрышки. Хроматин состоит из фибрилл ДНК и основ-

ных белков — протаминов и гистонов, содержащих в своем составе такие основные аминокислоты, как лизин и аргинин. Протамины содержат до 85 % аргинина и имеют очень низкую $M. M.$ — ~ 400 . Протамины и гистоны присоединены к ДНК с помощью ионных связей и формируют комплекс нуклеогистонов, которые регулируют синтез РНК на матрице ДНК. В ядре также присутствуют другие белки, обладающие свойствами ферментов, например эстеразы, некоторые виды нуклеотидфосфатаз, β -глюкуронидаза и ферменты окислительного фосфорилирования.

Ядерная мембрана представляет собой двойной слой эндоплазматической сети с фиксированными на ней рибосомами и содержит каналы, через которые осуществляется транспорт ионов, предшественников рибосом и молекул РНК. Биологическая функция ядра клетки и его компонентов заключается в хранении и реализации наследственной генетической информации, опосредованной ДНК через регуляцию синтеза РНК и белков. В процессах репликации ДНК активное участие принимают ДНК-полимеразы и ДНК-зависимые РНК-полимеразы, т. е. ферменты, полимеризующие комплексы из дезокси-рибонуклеотидфосфатов на соответствующих матрицах. ДНК-зависимые РНК-полимеразы существуют в клетках в виде нуклеоплазматической и ядрышковой форм, и обе участвуют в регуляции генетической информации. Ядерный экстракт печени крысы содержит три формы РНК-полимеразы: I-а, I-б и II.

Ядерный материал, замороженный в виде нуклеогистонного комплекса или в составе клеток, весьма чувствителен к действию факторов замораживания: дегидратации, изменению тоничности среды и pH. Вместе с тем очищенная от структурных белков и ферментов двойная спираль ДНК не повреждается замораживанием — оттаиванием, и ее свойства сохраняются. При глубоком замораживании, когда в клетках активируются процессы перекисного окисления липидов и действие лизосомальных гидролаз, ядерная мембрана, компоненты хроматина, регуляторные и фибриллярные белки генома, составляющие опорный каркас ядра, могут достаточно сильно повреждаться. Хотя низкотемпературное повреждение ядерных компонентов клеток, характер их репарации и функционирования на молекулярном уровне изучен еще в недостаточной мере, в настоящее время имеются некоторые сведения о характере этих криповреждений, изученных главным образом на изолированных ядрах клеток.

Уровень синтеза РНК в системе с ДНК после быстрого или медленного замораживания до -196°C практически не изменяется, т. е. матричная активность ДНК, а также такие ее показатели, как $M. m.$ ДНК, коэффициенты молярной экстинкции и гиперхромизма, после замораживания остаются постоянными. Однако ферменты, участвующие в синтезе РНК, под влиянием низких температур теряют свою активность. Если заморозить изолированный из ядер печени крысы хроматин до -25°C со скоростью $\sim 0,5$ — $1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, то это приведет к уменьшению его матричной актив-

ности на 50 % в системе синтеза РНК, осуществляемого за счет эндогенной РНК-полимеразы. Это связано с тем, что нарушается взаимодействие нуклеопротендной фракции ДНК с белками, которые подвергаются криоденатурации, выпадению в осадок и агрегации, что сильно изменяет процесс транспорта РНК-полимеразы по матрице и посадку гистонов на генетические локусы после отогрева системы. Изолированный из клеток или тканей комплекс ДНК, хранимый при температуре 0—4 °С на протяжении одного-двух месяцев, практически мало изменяется. Однако ДНК в составе клеток или органов изменяет свои физико-химические свойства уже через 72 ч после хранения при 0 °С. При охлаждении клеток костного мозга до 0 °С включение ¹⁴С-тимина в ДНК снижается в десятки раз. Растворимые нуклеогистоны в чистом виде не изменяют свои свойства на протяжении двух недель после хранения при 4 °С. После замораживания клеток и тканей хроматина очень быстро изменяет свои свойства. Замораживание изолированного хроматина до —10 °С сопровождается формированием осадка и повышением вязкости его молекул, снижением М. м. на 30 % по сравнению с первоначальной. Низкотемпературная консервация лимфоцитов или гепатоцитов сопровождается снижением уровня синтеза ДНК и РНК на 60—70 %, несмотря на использование эффективных концентраций криопротекторов. Причина подавления синтеза ДНК и РНК в ядре клеток после замораживания — отогрева весьма разнообразны. В частности, это может зависеть от степени разрушения ядерной мембраны и опорной ткани, регулирующей механическую прочность ядра, уровня инактивации ферментных и ядрышковых белков. Регуляторные системы ядра, включающие ферменты, ядерные белки, являются весьма чувствительными к действию таких факторов замораживания, как процессы дегидратации, повышение тоничности и изменение рН. При медленном замораживании (1—2 °С/мин) ядрышковой формы РНК-полимеразы I ее активность существенно снижается, однако быстрые скорости охлаждения (300—400 °С/мин) не вызывают изменений активности этого фермента. Активность РНК полимераз резко снижается при температуре —25 °С, что примерно соответствует эвтектическому диапазону температур NaCl (табл. 30).

Среди этих форм полимераз нуклеоплазматическая (форма II) оказывается наиболее устойчивой, в то время как другие виды

Таблица 30. Влияние медленного замораживания до —25 °С на активность различных форм РНК-полимераз (имн/мин)

Конечная температура замораживания, °С	Формы РНК-полимераз		
	I-a	I-b	II
Контроль	1692 ± 128	1558 ± 105	1194 ± 144
—2	1875 ± 164	1442 ± 166	1203 ± 159
—12	1713 ± 93	1279 ± 157	1179 ± 82
—25	539 ± 166	472 ± 93	984 ± 68

ядрышковых РНК-полимераз после замораживания — отогрева заметно снижают свою активность. Исследования ядрышковых форм ферментов методом ультрацентрифугирования и дискэлектрофореза в системе ПААГ — додецилсульфат показывают, что в их структуре изменяется молярное соотношение субъединиц, появляются признаки их агрегации и нарушения пространственного расположения. Все это приводит к существенному изменению процессов транскрипции генетической информации в клетке. При добавлении в систему замораживания экзогенных белков, например альбумина, степень аинактивации РНК-полимеразы уменьшается при хранении в замороженном состоянии. Растворы различных криопротекторов по-разному влияют на стабильность ДНК-зависимых РНК-полимераз.

Хранение суммарного препарата РНК-полимеразы I-а и II в различных растворах криопротекторов при 0 °С в течение 3 ч приводит к неоднозначному снижению активности этих ферментов. Видно (табл. 31), что наиболее отрицательное действие как на очищенные, так и в составе ядер РНК-полимеразы оказывает полиэтиленгликоль с М. м. 400.

Таблица 31. Влияние различных концентраций криопротекторов на активность РНК-полимераз из печени крыс, хранимых при 0 °С, % (контроль 100 %)

Концентрация криопротектора, М	Активность различных форм РНК-полимераз			
	Очищенная		В составе ядер	
	I а	II	I б	III
Глицерин				
1,2	100	96	109	78
2,4	101	82	76	64
ДМСО				
1,2	93	114	80	123
2,4	73	94	73	97
ПЭГ с М.м. 400				
0,12	80	51	78	82
0,24	63	32	64	16

Торможение системы транскрипции под влиянием криопротекторов может быть результатом прямого «псевдотоксического» влияния на активность ферментов и системы белков, регулирующих синтез РНК на матрице ДНК. Механизмы холодовых повреждений системы биосинтеза белков, а также характер нарушений регуляции матричной активности хроматина после охлаждения и замораживания — отогрева во многом остаются невыясненными, однако видно, что использование традиционных методов криозащиты не обеспечивает предохранение ядерного материала от деструктивного действия холода и особенно «эффектов растворов». Ядерный аппарат клетки представляет собой достаточно динамичную и сложную систему, элементы которой ассоциированы в основном за счет слабых связей (гидрофобные, ионные, элект-

тростатические), которые могут быстро разрушаться на этапах криоконсервации клеток и тканей, хотя двойная спираль изолированной ДНК довольно устойчива к действию замораживания. Вместе с тем входящие в ее состав регуляторные и энзиматические белки быстро разрушаются под влиянием факторов замораживания.

Вопрос о криоустойчивости ДНК в условиях замораживания клеток, находящихся на различных стадиях митоза, окончательно не решен и требует специальных исследований. Однако, учитывая характер возникающих процессов в клетке, особенно после медленного их замораживания, можно допустить, что повреждения особенно низкоконденсированной спирали ДНК все же наступают и могут сопровождаться различными физико-химическими процессами. К числу этих повреждений при замораживании — отогреве можно отнести следующие:

- размыкание пиримидинового или имидазольного кольца, сопровождающееся дезаминированием цитозина, аденина, гуанина;
- окисление спиртовых групп и разрывы углерод-углеродных связей;

- разрывы полинуклеотидных цепей, происходящие с образованием 3'ОН- и 5'ОН-концов, 3'РО- и 5'ОН-концов, разрывы с высвобождением аннона фосфорной кислоты, нуклеотидов, нуклеозидов;

- разрывы водородных связей на отдельных участках двунитевых ДНК с частичной их денатурацией;

- возможные ковалентные сшивки — продольные между основаниями и поперечные между двумя нитями в двойной спирали.

Эти изменения зависят от стадии митоза, т. е. состояния ДНК и присутствия других факторов в среде замораживания (рН, напряжение O_2 и др.) (рис. 51).

Таким образом, в процессе замораживания возникает, очевидно, два основных типа повреждений: разрушение нуклеотидов и одно- или двуни-

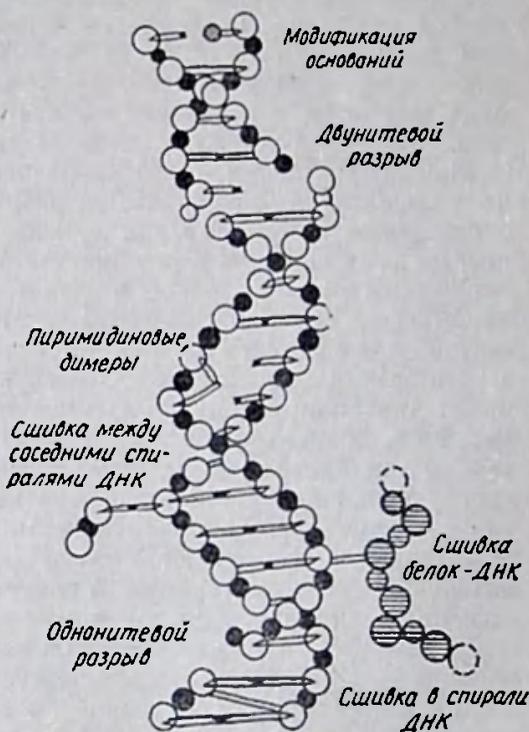


Рис. 51. Возможные структурные повреждения ДНК в составе хроматина после медленного замораживания

тевые разрывы ДНК. О разрывах водородных связей и локальной денатурации можно судить по гиперхромному эффекту — увеличению поглощения света в области 262 нм растворами ДНК. Разрывы нитей ДНК определяются по изменению M_w молекул с помощью дифференциального центрифугирования в градиенте плотности или измерением микровязкости раствора, свободнорадикальными и другими процессами, природу которых можно определить методами ЭПР и ЯМР (на ядрах ^{31}P и ^{23}Na).

Температурный шок клетки

Клетки могут разрушаться при охлаждении до 0°C и при воздействии отрицательных температур. В связи с этим следует различать повреждения, связанные с комплексом процессов в мембранах и клетке при развитии температурного шока, и повреждения, связанные с воздействием отрицательных температур, когда кристаллизуется вне- или внутриклеточный раствор, а клетки разрушаются в результате действия «эффектов раствора» или внутриклеточных кристаллов. Наконец, часть повреждений клеток может происходить в период их отогрева из замороженного состояния.

Под температурным шоком понимают внезапно наступающее состояние структурной лабильности (или разрушения) плазматической мембраны (или клетки в целом) после быстрого снижения температуры до 0° в изо- или гипертонических средах. Возникновение и развитие температурного шока клеток зависит от ряда факторов, и в первую очередь — от скорости и глубины охлаждения, присутствия в среде тех или иных солевых растворов и защитных веществ, а также от природы клеток. В одних случаях определенные виды клеток разрушаются уже после быстрого охлаждения, в то время как другие, наоборот, подвергаются температурному шоку только в присутствии гипертонических концентраций электролитов. Такое различие в реакции различных клеток на быстрый сдвиг температуры и повышенную тоничность среды связано прежде всего с характером организации липидного бислоя и содержанием холестерина. Молекулярно-мембранными механизмами, контролирующими развитие температурного шока клеток, являются: концентрация холестерина в мембране; структурные переходы в ионной воде, регулирующие стабильность и функциональную подвижность компонентов мембран; фазовые переходы в микродоменах аннулярных липидов (в системах, обогащенных холестерином) или основной массы липидного бислоя (в системах, истощенных по холестерину). В последнем случае структурная модификация липидного бислоя может начинаться уже при температурах $25-15^\circ\text{C}$ и ниже; кристаллизация липидов и фазовое разделение их в бислое, что способствует формированию ТМД, служащих каналами утечки ионов, малых и средних биомолекул; нарушение ионного гомеостаза клетки, и прежде всего K^+ и Ca^{2+} , регулирующих полимерные свойства белков цитоскелета и характер их взаимодействия с якорными белками мембран.

Роль холестерина в механизмах температурного шока клеток заключается в том, что он является стабилизатором липидов и белков мембран. Мембраны одних видов клеток, например эритроцитов и тимоцитов, обогащены холестерином, другие, напротив, содержат в своем составе мало холестерина (мембраны нейронов, *E. Coli*, митохондрии). Холестерин способствует жесткому скреплению липидов в стабильные холестерин-фосфолипидные кластеры, и поэтому в плазматических мембранах клеток, обогащенных холестерином, фазовые переходы липидов происходят в тех липидных микродоменах, из которых исключен холестерин. К числу таких микродоменов следует отнести аннулярные липиды, фазовые переходы которых охватывают зону от 10 до -20°C с максимумом при -8°C . В мембранах митохондрий или *E. Coli*, в которых содержится очень мало холестерина, фазовые переходы липидов и их разделение в бислое происходят уже при температурах около 0 либо $-1...-2^{\circ}\text{C}$. В этом случае барьерные свойства мембран нарушаются уже при охлаждении до 0°C , и температурный шок клеток развивается в зоне умеренно низких температур. В клетках, обогащенных холестерином, температурный шок возникает только при комбинированном воздействии низких температур и высокотоничного раствора электролита (либо неэлектролита), так как необходимо преодолеть термодинамический барьер жестко скрепленных комплексов холестерин — липид, холестерин — белок. Поэтому в аспекте развития шока клеток следует различать два типа реакций мембран на охлаждение до 0°C , зависящие от липидного состава: в мембранах с высоким содержанием холестерина снижение температуры в первую очередь влияет на микродомены, окружающие белки (аннулярные липиды), а в мембранах с низким содержанием холестерина охлаждение сопровождается изменением состояния основной массы липидов, т. е. нестабильность становится фактором, присущим всей мембране. Поэтому мембраны первого типа клеток подвергаются термальному шоку только в условиях гиперосмолярности, а клетки, в мембранах которых содержится мало холестерина, — в изоосмолярных условиях. Поэтому очень часто употребляют еще термин «температурно-осмотический шок клеток», подразумевая, что для их лизиса необходимо не только очень быстрое охлаждение, но и повышение осмотических условий среды. Действительно, для развития температурного шока эритроцитов, тимоцитов или лимфоцитов, мембраны которых обогащены холестерином, требуется быстрое охлаждение в средах с повышенной тоничностью, например NaCl. Аннулярные липиды, иммобилизованные вокруг структурных и функциональных белков мембраны, содержат очень мало холестерина и много насыщенных жирных кислот, температура фазовых переходов которых лежит в температурной области до 0°C , что делает эти зоны достаточно неустойчивыми к сдвигу температуры. Поэтому интегральные белки, окруженные аннулярными липидами, могут изменять свое конформационное состояние и функциональную активность уже в гипотермической области температур.

На первом этапе развития шока фазово-структурные переходы липидов приводят к формированию в мембранах каналов утечки ионов, прежде всего K^+ . Поэтому на втором этапе из-за нарушения ионного гомеостаза возникает коллоидно-осмотическое набухание клеток с последующим их лизисом на третьем этапе. Анализируя роль механизмов первого этапа шока клеток, можно отметить, что мембраны клеток в аспекте их структурной организации представляют собой высокогетерогенные системы с упорядоченными плотноупакованными доменами и лабильзованными участками разупорядоченных жидкокристаллических липидов, не содержащих холестерина. Границы, расположенные на этих участках, являются неустойчивыми к действию температуры и осмотических факторов, формируя в этих местах ТМД, т. е. формирование ТМД в мембране при охлаждении связано во многом с исходной неидеальностью ее пространственной структуры. Топологическая «подгонка» белков и липидов, по-видимому, не является совершенной, и при изменении температуры и тоничности среды такая исходная неидеальность упаковки может стать решающим фактором в механизме инициации ТМД. Это состояние особенно резко меняется при осмотической деформации клеток (изменение формы и объема), когда возникают неравномерные напряжения на мембране, особенно в местах ее изгибов и растяжений. Как видно из рис. 52, характер осмотической деформации эритроцита нарастает с повышением концентрации $NaCl$ в среде и зависит от температуры. При медленном охлаждении до $0^\circ C$ и концентрации $NaCl \sim 0,6 M$ увеличивается число сильно сжатых форм клеток, которые достаточно устойчивы к замораживанию. Эти данные свидетельствуют, что криоустойчивостью клеток можно управлять с помощью осмотического давления раствора, в котором эквилибрируют предварительно клетки перед их замораживанием.

Трансформация формы и объема клеток при изменении температуры и тоничности среды связана со сложными перестройками ионного гомеостаза, структурного состояния липидов и белков мембран и цитоскелета, который контролирует форму, объем и общую интеграцию клетки.

Инициация и развитие этих процессов в клетке сопровождается потерей эластических и изгибных свойств плазматической мембраны. При осмотическом воздействии на мембране появляются участки сильного растяжения (плазматические спиккулы) и сжатия (инвагинаций). Такая ранняя перестройка в местах растяжения способствует образованию ТМД различных размеров. Формирование неонпроницаемых участков плазматической мембраны является обратимым процессом, если тоничность среды и сдвиг температуры не превышают критических величин.

Поскольку структурная интеграция мембран клеток осуществляется на основе специфических взаимодействий ее внутренних компонентов и периферических белков цитоскелета, которые локально ассоциированы с интегральными белками плазматической мембраны, то изменение объема и формы клеток оказывает суще-

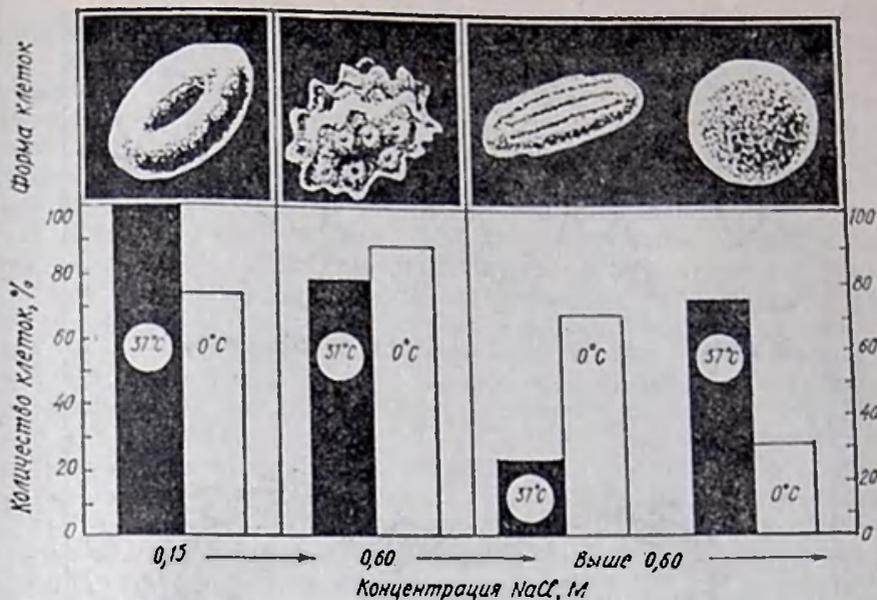


Рис. 52. Зависимость формообразовательных процессов в клетках от тоничности среды и температуры

ственное влияние на состояние контактирующих с ними интегральных белков мембраны и заряженных фосфолипидов внутреннего слоя мембраны (например, фосфатидилсерина), которые начинают перераспределяться в месте изгибов. Следовательно, начальная реакция клеток на изменение осмотических условий среды и температуры предполагает одновременное изменение свойств белковой решетки и липидной матрицы мембраны. Эти изменения прежде всего проявляются в области «точечных» контактов белков цитоскелета с интегральными белками, которые включены в двухмерный липидный матрикс, и при изменении объема и формы клетки их состояние будет определяться локальной кривизной мембраны и состоянием компонентов цитоскелета. При восстановлении исходных условий среды, например при переходе из гипертонических условий в изотонические, реакция белковой и липидной систем мембраны определяется сформировавшейся к тому времени трехмерной структурой (например, формой). Поэтому в начальных микроскопических реакциях клетки на изменение условий среды основную роль играет изменение структуры трехмерной белковой решетки и липидного бислоя. Многие клетки не способны сохранять жизнеспособность при повышении осмолярности среды выше определенной критической границы (1800—2000 мосм), поскольку в этих условиях нарушаются связи белков цитоскелета с мембраной, что связано с частичной дегидратацией клетки. Если тоничность среды и температура достаточно быстро и интенсивно меняются, то клетка отвечает на это не только трансформацией формы, объема, но и аномальным распределением ионов (рис. 53).

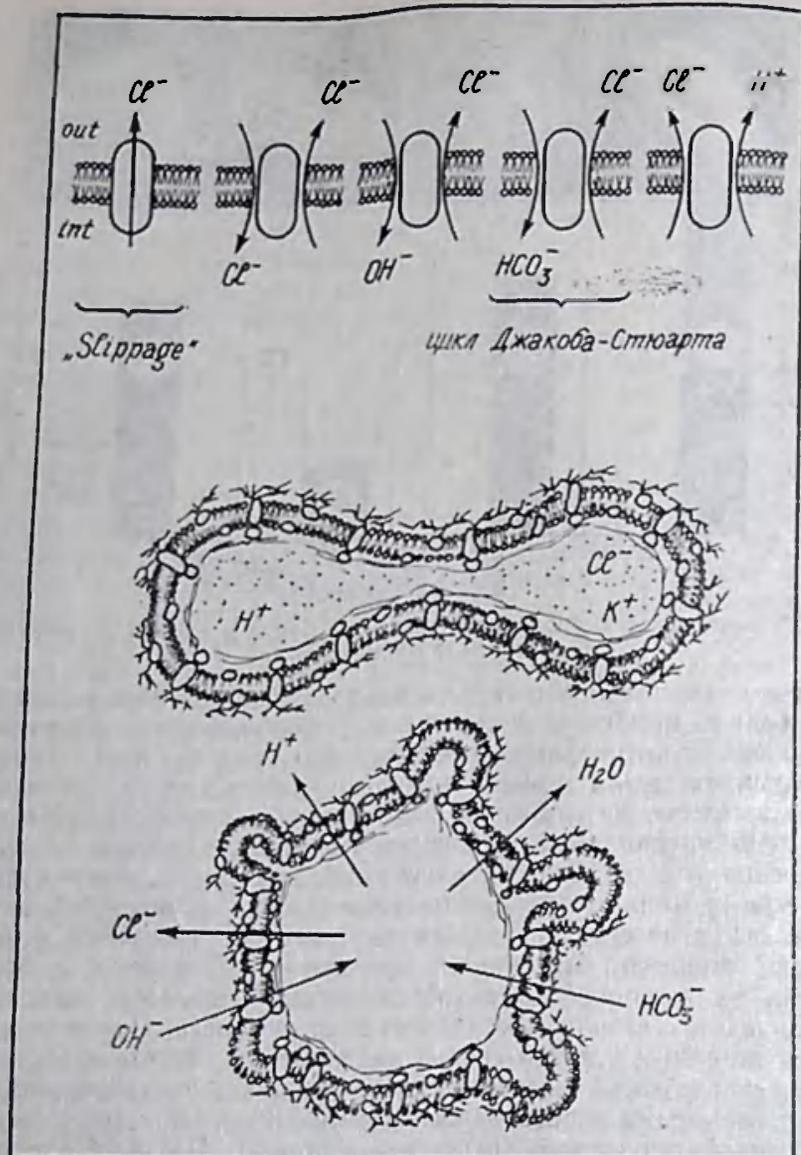


Рис. 53. Схема трансформации формы клетки при повышении тоничности среды, сопровождающаяся конформационным «параличом» (Slippage) белкового переносчика в цикле Джакоба—Стюарта

Как видно, при изменении тоничности среды вслед за пассивным выходом молекул H₂O клетку покидают ионы K⁺, Cl⁻ и H⁺ в обмен на OH⁻, HCO₃⁻, что приводит к увеличению трансмембранного потенциала. Важно, что в условиях осмотического и холодового воздействия изменяется проницаемость плазматических мембран и для [Ca²⁺], которые из внешней среды проникают внутрь цито-

плазмы. Повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} приводит, во-первых, к активации Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов (эффект Гардоша), что нарушает функцию цитоплазматических трансаминидаз, регулирующих структурное и агрегатное состояния белкового цитоскелета, а во-вторых, к деполимеризации актиновых филаментов, что ослабляет силы, удерживающие форму и объем клеток. В целом процессы увеличения или уменьшения объема клеток регулируются функцией нонтранспортирующих систем, которые модулируют свойства белкового цитоскелета. Однако молекулярные механизмы, приводящие к активации нонтранспортных систем клеток при осмотическом сжатии клеток, остаются во многом неясными. В последнее время выяснено, что при сжатии эритроцитов изменяется метаболизм мембранных полифосфонозитидов, в результате чего нарушается соотношение в клетке ди-трифосфонозитидов, влияющих на уровень Ca^{2+} в клетке, который также регулирует функцию белков цитоскелета. Вовлечение фосфонозитидной системы в стимуляцию Ca^{2+} -обмена опосредовано через активацию протеинкиназ, которые активируются ионами Ca^{2+} и 1,2-диацилглицерином, являющимся продуктом фосфолипазной дегградации фосфонозитидов.

Существенным молекулярно-клеточным процессом, развивающимся при температурно-осмотическом шоке, является везикуляция мембран, ведущая к потере мембранного материала. В результате этого изотропное натяжение мембраны возрастает, поскольку ее общая площадь уменьшается. Микроскопически это выражается в формировании на поверхности мембраны спикул или выпячиваний, выраженность которых зависит от реакции белков цитоскелета. Предполагается, что в основе механизма везикуляции лежит изменение агрегатного состояния белков цитоскелета, что изменяет степень их ассоциации с интегральными белками и молекулами липидов, с которыми они скреплены с помощью вспомогательных белков либо ионных связей. Характер эволюции мембранных спикул имеет существенное значение для исходов охлаждения клеток, поскольку они могут явиться местом формирования одного большого или множества меньших по размеру ТМД. В случае формирования крупного ТМД может произойти спонтанный лизис клетки. Во втором случае, очевидно, формируются мелкомасштабные ТМД, соизмеримые с катионной проницаемостью и способные к полной «репарации». Несмотря на многообразие клеточных и молекулярных перестроек в мембране клетки при температурном шоке, решающим является вопрос о механизмах инициации и эволюции ТМД как источника потери физиологически активных ионов и биомолекул. При этом существенную роль играет скорость репарации структуры, отражающей время существования ТМД. В целом процессы репарации контролируются текучестью липидной фазы мембран и белками цитоскелета. Количество ТМД возрастает при температурах $37-20^\circ\text{C}$ и, наоборот, вблизи 0°C заметно снижается, поскольку по термодинамическим закономерностям повышается энергетический барьер

их формирования. Это связано с тем, что при температурах, близких к 0 °С, происходит «низкотемпературная усадка липидов», когда их молекулы сближаются в латеральной плоскости мембраны, а также повышается агрегатное состояние белкового цитоскелета.

Методы исследования мембран

Для изучения состояния бислоя мембраны широко используются различные методы, например флуоресцентные и ЭПР-спин-меченные зонды, с помощью которых может быть получена самая разнообразная информация о физико-химических превращениях в липидах и белках (табл. 32). Для объективной информации о состоянии бислоя следует использовать различные методы, так как ни один из существующих не дает объективной информации.

Т а б л и ц а 32. Физико-химические методы оценки состояния бислоя мембран

Используется метка	Изменяемый параметр	Получаемая информация
Пирен	Экцимеризация; тушение флуоресценции триптофанильных радикалов белка	Изменение гидрофобного объема мембран; характеристика белок-липидных контактов
1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен	Поляризация флуоресценции	Изменение жидкости бислоя
α (цис)-и β (транспариновая кислота)	Флуоресценция	Состояние жидкой и структурированной части бислоя
Спин-меченные (содержащие нитроксильный радикал) стероиды, фосфолипиды и жирные кислоты	Параметры упорядоченности микроокружения зонда	Фазовые переходы и разделение фаз в мембране
Эритрозин, ковалентно связанный с молекулами белка	Поляризация флуоресценции	Вращательная подвижность и конформационное состояние белка
Дейтерированные жирные кислоты или фосфолипиды	Характеристика линий дейтерия на спектре ЯМР	Упаковка молекул в бислое и относительная подвижность отдельных его частей

Существенную информацию о температурноиндуцированных переходах в бислое можно получить с помощью ЭПР-спин-меченных зондов и меток. Спин-меченные зонды отличаются тем, что они относятся к свободноплавающим соединениям, а метки ковалентно связываются с липидом или белком. Особенность метода ЭПР-спектроскопии заключается в том, что регистрируемые параметры характеризуют состояние непосредственного микроокружения спинного зонда или метки (рис. 54).

Процесс агрегации белков в мембране может быть выявлен с помощью метода замораживания — скалывания. При этом на поверхности скола обнаруживаются либо «выпячивания» белковых глобул, либо вмятины от их «ложа». Зная увеличение микроско-

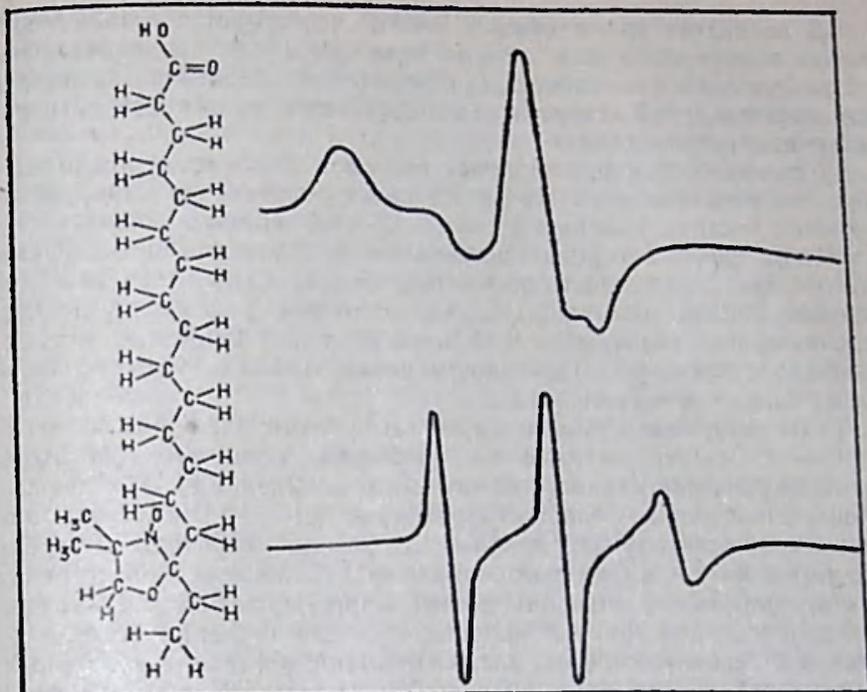


Рис. 54. Типичные спектры ЭПР-спинмеченого зонда при исследовании температурноиндуцированных переходов в липидном бислое

па, размеры белковых частиц и молекулярную массу белка, можно определить количество белковых молекул в выявленной на поверхности скола частице. Для исследования проницаемости мембран могут быть использованы различные методы. Например, объемные методы (плазмолитические, плазмометрические, гемолитические) основаны на регистрации кинетики изменения объема клетки в гипо- и гипертонических растворах. Широко применяют различные красители, которые позволяют исследовать характер и темпы мембранного движения веществ через поврежденную либо неповрежденную мембрану клетки.

Наиболее универсальный и широко применяющийся метод — исследования барьерных свойств мембраны с помощью радиоактивных и стабильных изотопов — позволяет выявить кинетику проникновения веществ внутрь в низких концентрациях и движение веществ внутри клетки.

Метод ^{31}P -ЯМР позволяет наблюдать за изменениями конфигурации гидрофильных головок фосфолипидов мембран, а ^1H -ЯМР-липидов в дейтерированных растворах — за поведением гидрофильных частей головок или хвостов жирных кислот. С помощью этого метода оценивается направленность фазовых переходов и структурных изменений полярных и неполярных областей бислоя в мембране.

В последнее время метод ^{31}P -ЯМР используется для исследования внутриклеточного обмена макроэргов без предварительного разрушения клеток, что позволяет более объективно оценивать их энергетический статус в различных условиях температуры, радиации, действия ядов.

Фазовые состояния липидных систем в мембранах можно изучать также с помощью ИК- и КР-спектроскопии, регистрируя изменения частоты колебаний связей $\text{C}-\text{H}$ в жирных кислотах.

Метод рентгеновского рассеивания под малыми и большими углами дает возможность получать следующие характеристики липидного бислоя мембран: фазовое состояние, размеры, углы наклона жирно-кислотных цепей относительно плоскости бислоя, среднюю степень упорядоченности цепей, площадь одной молекулы и положение молекул воды.

Температурные фазовые переходы в мембранах можно регистрировать также методом калориметрии, используя для этого метод дифференциального термического анализа (ДТА) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Эти методы дают возможность изучать влияние на фазовые переходы внутренних и внешних параметров, например содержания холестерина, ионной силы, Ca^{2+} , значения длины жирно-кислотных радикалов.

Флуоресценция широко используется для изучения белок-белковых и белок-нуклеиновых взаимодействий, а также структурных особенностей нуклеиновых кислот. Для получения данных о форме белков и их комплексов применяют в основном два метода: дифракцию рентгеновских лучей на трехмерных кристаллах и электронную микрофотографию двумерных кристаллов белка при разных углах наклона образца. Однако для большинства мембранных белков пока не удается получить совершенные кристаллы, поэтому на практике применяют малоугловое рассеивание (особенно рассеивание нейтронов) и обычную электронную микроскопию. Для изучения структуры и функции биополимеров, и в частности нуклеиновых кислот, существуют разнообразные химические и физиологические методы. Чаще всего используют радиоактивные индикаторы для измерений количества импульсов включившейся метки с помощью жидкостных сцинтилляционных счетчиков.

Метод седиментации молекул биополимера с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы используют для получения седиментационных диаграмм и расчета коэффициентов седиментации, которые позволяют следить за конформационными переходами и молекулярной массой молекул.

Длину фрагментов и их нуклеотидный состав можно исследовать с помощью двумерного электрофореза с ПААГ. Используя этот метод в комбинации с бифункциональными реагентами (глутаровый альдегид, диамид), различающимися расстоянием между активными группами белков, и оценивая количество образовавшихся сшивок в их присутствии, можно оценить расстояние между отдельными белковыми молекулами. Образование поперечных сшивок выявляется при электрофорезе белков в полиакриламид-

ном геле в присутствии додецилсульфата натрия, когда можно определить наличие олигомерных и других форм «аномальных» полос. С помощью этого метода определяется также молекулярная масса белка, поскольку выдерживание его с додецилсульфатом натрия приводит к образованию отрицательно заряженных глобул, в которых собственный заряд белков уже не имеет значения и их подвижность в электрическом поле определяется лишь собственной молекулярной массой.

Широкое распространение также получили такие спектральные методы, как круговой дихроизм, флуоресценция, УФ-, ЯМР-спектроскопия, с помощью которых изучают пространственную структуру биополимеров, определяют доступность отдельных групп биополимеров растворителю, исследуют взаимодействие белков и нуклеиновых кислот между собой, а также с малыми молекулами, измеряют концентрацию биополимеров, проводят идентификацию фрагментов белков и нуклеиновых кислот.

ЯМР-спектроскопия, которая связана с существованием дискретных уровней энергии магнитной природы, позволяет осуществлять регистрацию спектров ЯМР—Н (ПМР) белков и нуклеиновых кислот. Обычно эти измерения проводят в дейтерированных растворах, что практически исключает наложение спектров растворителя и исследуемого соединения.

Круговой дихроизм чрезвычайно чувствителен к изменению химической структуры мономерных производных нуклеиновых кислот, а также их конформации. УФ-спектроскопия дает информацию об электронной структуре белков и нуклеиновых кислот в области 200—300 нм, пространственной организации и устойчивости олиго-поли-нуклеотидов и полипептидов.

С помощью жидкостной хроматографии можно разделять сложные смеси белков, пептидов, липидов, углеводов и других веществ. Разделение белков этим методом можно проводить в различных вариантах, которые включают ионный обмен, адсорбцию, гель-фильтрацию. Удержание на колонке определяется такими свойствами белка, как размер и форма молекул, молекулярная масса, заряд, насыщенность поверхности белка гидрофобными и гидрофильными группами. Очистку белков производят с помощью ионообменной и аффинной хроматографии. Первая позволяет фракционировать белки, отличающиеся зарядом, вторая — селективно выделять ферменты из сложных смесей в одну фазу с хорошей степенью очистки и количественным выходом.

Для разделения и анализа липидов существует также много методов (колоночная хроматография на силикагеле в оксиде алюминия, тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Чаще всего в исследованиях мембран, содержащих малые количества липидов, используют ТСХ на силикагеле, которая позволяет проводить как качественный, так и количественный анализ липидов различных классов.

Глава 9

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Клетки эукариот имеют довольно сложное строение и под электронным микроскопом представляются в виде сложных комбинации мембранных структур, несущих различные физиологические и метаболические нагрузки (рис. 55). Клетка отделена от внешней среды хорошо выраженной цитоплазматической мембраной толщиной около 7,5 нм, состоящей из фосфолипидного бислоя и встроенных в липиды на различную глубину белков. Барьер, ограничивающий клетку на периферии, препятствует утечке ее содержимого во внешнюю среду. В цитоплазме клеток сосредоточен ряд внутриклеточных органелл (митохондрии, лизосомы, эндоплазматический ретикулум, системы микросомального окисления и биосинтеза белков, ядерный аппарат), которые отличаются различной компоновкой мембранных структур и выполняемыми функциями. Эти различия в структуре и функции мембран клеток и внутриклеточных органелл обуславливают неоднозначный ответ клетки в целом на воздействие низких температур, осмотически активных соединений и отогрев. Первичный холодовый и осмотический удар принимает на себя плазматическая мембрана клеток, от устойчивости которой во многом зависит их дальнейшее структурно-функциональное состояние. По наружной поверхности плазматической мембраны располагается гликокаликс, который играет важную роль молекулярного сита для селекции ионов, биомолекул и метаболитов, проникающих внутрь клетки. При физиологических температурах компоненты гликокаликса клеток представлены разветвленными цепями, состоящими главным образом из гликопротеинов — белков, обогащенных сиаловыми кислотами и аминированными углеводами. Основная масса гликокаликса заряжена отрицательно и связана с белками наружной поверхности мембраны слабыми связями. По своему функциональному назначению гликопротеины гликокаликса представляют собой обширные рецепторные поля, обеспечивающие взаимодействие клеток с гормонами, экзогенными чужеродными веществами, микроорганизмами. Сигналы, воспринимаемые компонентами гликокаликса, перерабатываются в дальнейшем аденилатциклазной системой, которая через соответствующие посредники («мессенджеры») реализует тот или иной эффект в клетке. При охлаждении клеток от 37 °С до ~0 °С состояние гликокаликса изменяется в зависимости от тоничности

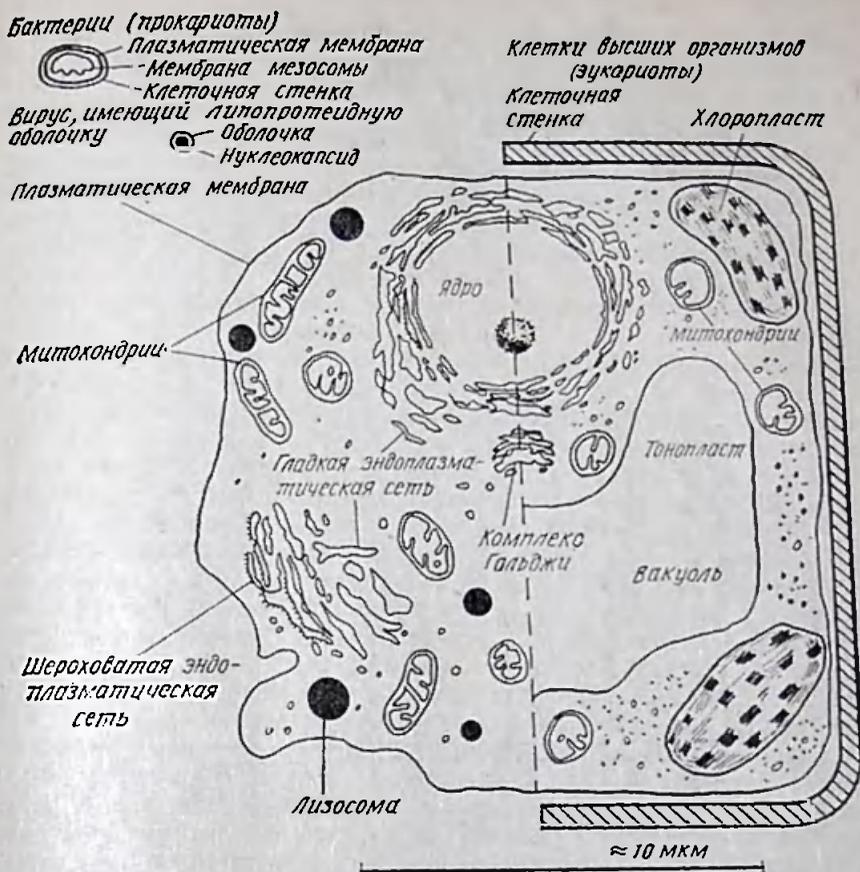


Рис. 55. Структурная организация клетки

среды и природы вещества, контактирующего с его компонентами, а также времени, прошедшего с момента процесса взаимодействия. При эквilibрации клеток в оптимальных электролитных или неэлектролитных средах структура микроокружения клетки существенно не изменяется на протяжении 6—8 ч. в зависимости от типа клеток. Например, в гепатоцитах, спленоцитах и перевиваемых клетках почки свойства гликокаликса сохраняются примерно 6 ч, а в нейронах — 2—3 ч. При хранении клеток в оптимальных средах при 0 °C спустя 6—8 ч происходит диссоциация сиалопротеинов, и они частично элиминируют из зоны микроокружения клетки во внешнюю среду. Следовательно, хранение клеток в адекватных по своему составу средах при температурах 0—4 °C до 6—8 ч не приводит к необратимым изменениям компонентов гликокаликса.

При замораживании, когда на клетку воздействуют внутриклеточные кристаллы льда либо «эффект раствора», состояние компо-

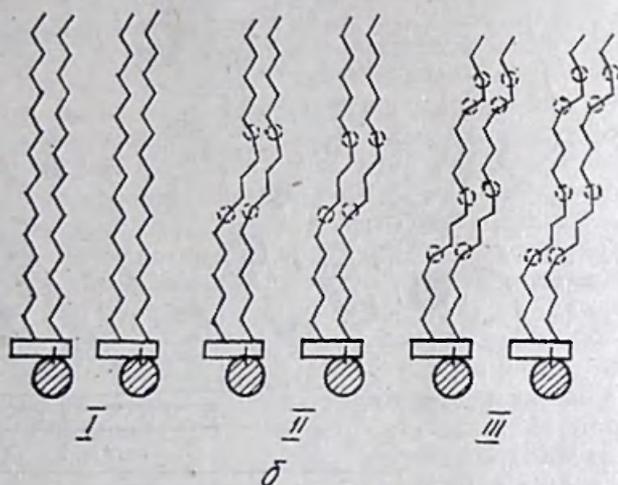
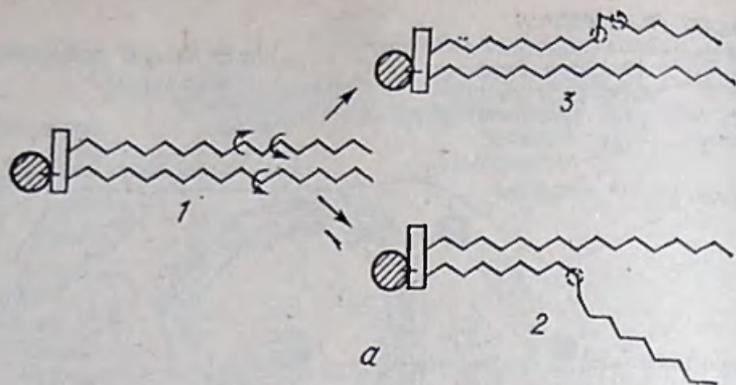


Рис. 56. Формирование дефектов в липидном бислое:

a — все жирнокислотные цепи молекулы фосфолипида находятся в транс-конфигурации; стрелками показано вращение вокруг С-С-связей (1). Образование скошенной конфигурации (2) или кинка (складки) (3); *b* — влияние кинков на упаковку бислоя: I — кинки отсутствуют, II и III — один и больше кинков на жирнокислотную цепь

нентов гликокаликса резко изменяется, и его компоненты могут легко диссоциировать с поверхности мембран. Фосфолипиды плазматических мембран клеток играют важную роль в регуляции функции мембраносвязанных ферментов и транспорте веществ. В условиях охлаждения и замораживания липиды плазматических мембран и мембран внутриклеточных органелл под влиянием низких температур претерпевают структурно-фазовые превращения, переходя из жидкокристаллического в гель-состояние.

В результате этого липиды теряют свою динамическую подвижность, в бислое формируются трансмембранные дефекты, через которые происходит вначале потеря ионов, а затем метаболитов и других компонентов цитоплазмы (рис. 56). Степень нарушения структурно-фазового состояния липидов отличается при раз-

ных температурах. В диапазоне 0—4 °С в плазматической мембране изменяются физические свойства в основном только «аннулярных липидов», локализованных в окружности белков, поскольку в их состав входят в основном насыщенные жирные кислоты, переход которых в гель-состояние осуществляется в диапазоне околопучевых температур или даже выше. В целом обратимость или необратимость возникающих в этой температурной зоне структурно-метаболических нарушений в плазматической мембране и мембранах внутриклеточных органелл, включая ядерный аппарат клетки, зависит от времени и степени температурного и осмотического воздействия. При температурах порядка —25...—30 °С происходит структурно-фазовый переход основной массы липидов, что сопровождается нарушением структуры и функций интегральных, функциональных и транспортирующих белков мембран.

Степень криоразрушений мембран клеток зависит от скорости замораживания — отогрева, содержания в них холестерина, фосфолипидного состава и степени гидратированности, а также природы и концентрации криопротекторов. Различные белки мембраны по-разному реагируют на замораживание и отогрев. Например, нонтранспортируемый белок мембраны — Ca^{2+} -АТФаза — сам по себе мало изменяет свои свойства, однако его функция как липидзависимого фермента нарушается в результате изменения свойств аннулярных липидов. Другие виды интегральных белков мембран, например гликофорин эритроцитов; структурная белковая субъединица аденилатциклазы, цитохром P_{450} , хорошо переносят замораживание. Белковые переносчики типа Na^+ — K^+ -АТФаза являются криочувствительными, так как после замораживания — отогрева их функция нарушается. Особенно высокой чувствительностью к охлаждению — замораживанию отличаются белки цитоскелета, которые в клетках представлены микрофиламентами актина, микротрубочками тубулина и промежуточными белками типа F-актина. Поскольку эти белки регулируют форму и объем клеток, нарушение их агрегатного и структурного состояния оказывает существенное влияние на устойчивость (или неустойчивость) клеток к воздействию низких температур. При замораживании белки цитоскелета подвергаются обратимой «криоденатурации» и теряют свои упругоэластические свойства. В этом случае устойчивость мембраны как первичного барьера клетки к действию охлаждения резко снижается, и клетки обычно лизируют.

Мембраны эндоплазматической сети, митохондрий, а также ряд регуляторных и структурных белков цитозоля создают внутриклеточную вязкую среду, которая играет важную роль в поддержании механохимической устойчивости клетки к действию факторов замораживания. Устойчивость тех или иных мембранных структур и внутриклеточных органелл к действию замораживания различна. Например, мембранные везикулы, сформированные из выделенного эндоплазматического ретикулума (микросомальная фракция), весьма устойчивы к действию низких температур и полностью сохраняют свою функцию после быстрого заморажи-

вания до -196°C . Наоборот, мембранные везикулы, сформированные из митохондриальных мембран и лизосом, очень чувствительны к осмотическому стрессу и снижению температуры.

Под криоконсервированием понимают способ сохранения жизнеспособного состояния биологических объектов при температуре ниже 120 K . Криоконсервирование объектов включает ряд определенных последовательных циклов, которые направлены на сохранение свойств и жизнеспособности биоструктур после размораживания — отогрева. К их числу относятся: отбор клеток, подготовка к замораживанию, которая включает охлаждение и эквilibрацию в защитных средах, замораживание, хранение, отогрев и восстановление.

Подготовка к замораживанию предусматривает выделение и забор биоматериала в максимально жизнеспособном состоянии и эквilibрацию его в защитных растворах, состав которых зависит от природы клеток, свойств их мембраны и функции внутриклеточных органелл. На этом этапе биоматериалы могут быть эквilibрированы в различных и достаточно сложных криоконсервантах, содержащих несколько видов криопротекторов и различные мембранные стабилизаторы, ингибиторы метаболизма и т. д. Выбор параметров эквilibрации клеток в таких растворах сильно зависит от природы биоматериала, поэтому он достаточно широко варьирует. На втором этапе подготовки очень часто биоматериалы предварительно охлаждают, помещают в специальную упаковку и замораживают по определенной программе, выбор которой зависит от структурно-функциональных свойств клетки и плазматической мембраны, ее формы и размера, наличия или отсутствия в среде криопротектора, его молярности и концентрации. Например, достаточно большие по размеру яйцеклетки человека и животных необходимо замораживать очень медленно ($\sim 0,5\text{--}1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$), а другие типы клеток требуют быстрых или многоступенчатых режимов замораживания; когда скорость охлаждения изменяется в различных температурных зонах, осуществляются температурные остановки, при необходимости — искусственная инициация кристаллизации. Параметры цикла замораживания, как правило, подбирают для того или иного вида клеток экспериментальным путем.

Несмотря на широкое использование эффективных криопротекторов типа глицерина, ДМСО, ПЭО, ПВП и ГЭК, результаты криоконсервирования биообъектов нельзя считать вполне удовлетворительными. Такие проникающие через мембрану клеток криопротекторы, как глицерин и ДМСО, хотя и позволяют сохранять довольно высокий процент полноценных замороженно-отогретых клеток, однако их необходимо полностью удалять из клеток, что ведет к развитию в них дополнительных разрушений, часто вызывающих гибель клеток. Сама по себе процедура удаления ДМСО и глицерина из клеток довольно сложна и требует наличия специальной аппаратуры и растворов, что удорожает процесс деглицеринизации.

В связи с этим в последнее время стали шире применять криопротекторы, не проникающие внутрь клетки (ПВП, ПЭО, ГЭК, ПЭГ, другие полиолы), которые не требуют удаления из среды замораживания перед трансфузией клеток. Однако экстрацеллюлярные криопротекторы являются эффективными только по отношению к определенному типу биологического материала. Введение искусственных полимеров с клетками внутрь организма сопровождается депонированием их частиц в клетках ретикулоэндотелиальной системы на протяжении длительного периода времени, где они могут вызвать трансформацию клеток и их перерождение. Такой криопротектор, как гидроксипропилкрахмал, имеет довольно узкий диапазон криопротекторного действия, хотя по своим свойствам является наиболее физиологичным, поскольку способен утилизироваться клетками организма. Однако непроникающие внутрь полимерные криопротекторы могут оказать неблагоприятное действие на плазматические мембраны клеток, изменяя величину поверхностного заряда, диэлектрической проницаемости, состояние липидного бислоя. При этом может происходить ослабление липид-белковых и липид-липидных взаимодействий в плазматической мембране клетки, которая становится проницаемой для ионов и метаболитов. Утечка биологически активных веществ из клетки в значительной мере ухудшает качество биоматериала уже на этапе его подготовки к замораживанию в целом и снижает результаты криоконсервирования. Поэтому существующие интра- и экстрацеллюлярные криопротекторы нуждаются в дальнейшей модернизации для уменьшения их отрицательных свойств. Ведутся разработки, направленные на модификацию структуры некоторых полиолов путем их оксипропилирования.

Наряду с традиционными криопротекторами (ПВП, ПЭО, глицерин, ДМСО), используемыми для криоконсервирования биоматериалов, в последнее время нашли широкое применение различного рода биологически активные соединения, активирующие процессы репарации структур в деконсервированных биоматериалах. С этой целью используют различные эмбриональные белки, фармакологически активные соединения, биокатионы и метаболиты, антиоксиданты и антиокислители, ингибиторы метаболизма. Все эти вещества оказывают селективный эффект на темпы самосборки молекулярных структур отогретых клеток или тканей, т. е. улучшают восстановительные процессы в постконсервационном периоде.

Наиболее надежно замороженные биоматериалы могут храниться при температуре, близкой к -196°C , при которой подавляются метаболические и биофизические процессы.

Размораживание биообъектов из замороженного состояния осуществляется с привлечением в основном метода теплопроводности (нагрев в водяной бане) и реже — метода СВЧ. В этом случае очень многое зависит от вида и размера биообъекта, состояния его гидратированности и барьерных свойств мембраны клеток после замораживания. Если мембраны клеток после размор-

раживания оказываются сильно поврежденными, то наряду с оптимальным режимом их нагрева часто применяют так называемые восстанавливающие среды, которые содержат в своем составе метаболически активные соединения, активизирующие биоэнергетический цикл клеток, а также процессы биосинтеза белков и нуклеиновых кислот. К их числу относятся также стабилизаторы мембран и соединения, подавляющие процессы перекисного окисления липидов и аутолиз клетки. Очень важным этапом процесса криоконсервирования клеток является их своевременная и адекватная оценка после размораживания. С этой целью применяют различные морфологические, биохимические и другие методы. Поэтому криоконсервирование биоматериалов представляет собой довольно сложный цикл, который требует в каждом отдельном случае экспериментального подбора соответствующих параметров эквиправации, замораживания, отогрева и оценки деконсервированного материала.

Таким образом, дальнейший прогресс в области криоконсервирования биообъектов различной степени сложности под защитой искусственных и естественных криопротекторов может быть получен при изучении как глубоких механизмов криповреждений различных биоструктур, так и особенностей взаимодействия их с криопротекторами на молекулярно-клеточном уровне. Соединение двух встречных направлений — раскрытия механизмов криповреждений в широком температурном диапазоне и действия криопротекторов на молекулярном уровне — позволит выработать наиболее рациональную и, очевидно, эффективную систему защиты живых систем от повреждающего действия холода.

Консервация клеток крови

Криоконсервация тромбоцитов. Тромбоциты играют важную физиологическую роль в процессах гомеостаза, поскольку эти клетки содержат в своем составе факторы свертывания. Тромбоциты представляют собой безъядерные клетки, окруженные трехслойной плазматической мембраной (рис. 57). На внешней стороне мембраны локализован гликокаликс толщиной 50 нм, содержащий повышенную концентрацию хондроитинсульфата В и гепаринсульфата, а также факторы свертывания плазмы: фибриноген, факторы V, VII, VIII, IX, X, XI и XII. Внутри тромбоцита расположены гранулы, которые являются депо фактора III свертывания, и цитозомы, содержащие ферритин и гидролитические ферменты (фосфатаза, β -галактуронидаза).

Агрегация тромбоцитов происходит под влиянием АТФ, адреналина, тромбина и коллагена в присутствии ионов Ca^{2+} . В этом процессе активное участие принимают сократительные белки, обладающие АТФазными свойствами и являющиеся соответственно актином и миозином. В присутствии Ca^{2+} активность этих белков возрастает, и форма тромбоцита из дискообразной превращается в звездчатую. Контрактильные белки тромбоцита, как и любой

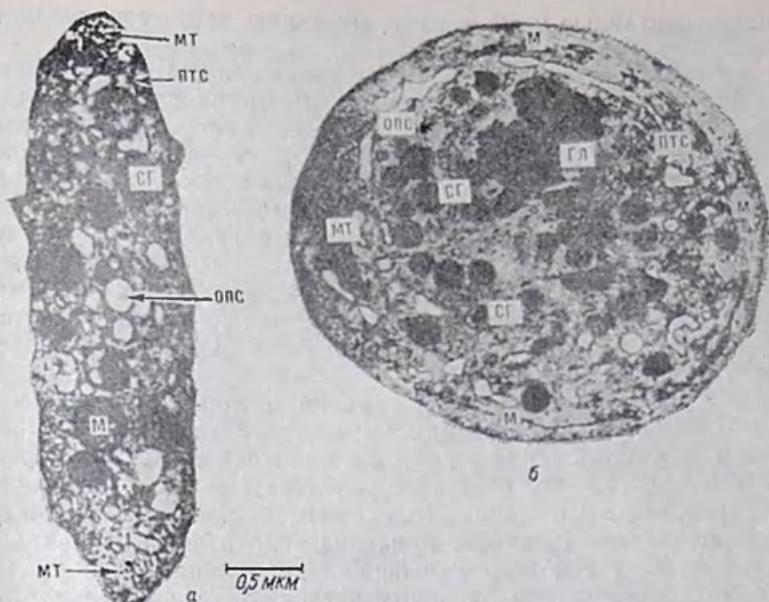


Рис. 57. Вертикальный (а) и горизонтальный (б) срезы нормального тромбоцита. Видны микротрубочки (МТ), митохондрии (М), специальные гранулы (СГ), плотная трубчатая (ПТС) и открытая проточная системы (ОПС). $\times 22\ 000$

клетки, очень чувствительны к изменению тоничности среды и температуры, рН и степени обезвоживания клеток.

В настоящее время для криоконсервации тромбоцитов используют главным образом ДМСО, глицерин и диметилацетамид (ДМАЦ) в концентрации 2,5—5 %.

Имеется несколько вариантов замораживания тромбоцитов с 5%-м раствором ДМСО. Например, можно замораживать клетки со скоростью 1 °С/мин до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ с последующим погружением в жидкий азот либо со скоростью 15—20 °С/мин до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ с последующим хранением при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Эти методы позволяют сохранять морфологические и частично биохимические свойства тромбоцитов на уровне 60—65 % по отношению к контролю. При использовании в качестве криопротектора 5%-го глицерина в сочетании с 4%-м раствором глюкозы можно получить около 70 % жизнеспособных клеток, если их заморозить со скоростью 30 °С/мин либо 33,6 °С/мин до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, а затем погрузить в жидкий азот. Неплохие результаты можно получить, если замораживать клетки со скоростью 1—5 °С/мин до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ с последующим хранением при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Поскольку основная масса размороженных клеток повреждается в основном на этапах отогрева и отмывания, в состав криозащитного раствора вводят «реставрирующие» добавки: глюкозу, плазму, маннитол и другие стабилизаторы типа кислых антикоагулянтов, снижающие рН до 6,5 и предотвра-

щающие спонтанную необратимую агрегацию деконсервированных клеток.

При использовании 5- или 10%-го раствора ДМАЦ в сочетании с 5%-м раствором глюкозы и плазмы тромбоциты предварительно смешивают с равным объемом защитного раствора и замораживают со скоростью 3 или 10 °С/мин до —60 °С, затем погружают в жидкий азот. Иногда используют замораживание со скоростью 1 °С/мин до —13 °С, а затем 10 °С/мин до —196 °С в присутствии 2,5 %-го раствора ДМАЦ и глюкозы. При этом следует учитывать, что растворы ДМАЦ снижают способность клеток к агрегации и ретракции, изменяют барьерные свойства их плазматических мембран. Однако эти нарушения во многом устраняются после удаления криопротектора из раствора и эквilibрации клеток в «реставрирующих» средах.

Существующие до настоящего времени методы криоконсервации тромбоцитов дают более или менее удовлетворительные результаты при использовании в качестве защитной среды растворов глицерина и глюкозы, что позволяет переливать эти клетки в клинических условиях. По данным японских исследователей, посттрансфузионная приживаемость криоконсервированных тромбоцитов достигает 60 % и более, хотя период циркуляции их в русле крови более короткий, чем нативных клеток. У больных с тромбоцитопениями после переливания размороженных эритроцитов заметно снижаются геморрагические явления и сокращается время кровотечения.

Вопросы эффективного криоконсервирования тромбоцитов окончательно не решены, необходимо дальнейшее совершенствование защитных сред и режимов замораживания, а также более детальное изучение структуры и функций мембранных структур тромбоцитов после замораживания — отогрева.

Консервация лейкоцитов. Суспензия лейкоцитов крови человека представляет собой набор клеточных популяций, в состав которых входят сегментоядерные гранулоциты (нейтрофильные, базофильные и эозинофильные формы) и ретикулоциты. Сегментоядерные гранулоциты являются довольно крупными ядросодержащими клетками (9—15 мкм) с объемной цитоплазмой и выраженными гранулами, которые по своей природе являются лизосомами с высоким содержанием гидролитических ферментов, фагоцитина и лизоцина (рис. 58). Основная функция гранулоцитов — фагоцитоз, осуществляемый с помощью лизосомальных гидролаз. Наиболее высокой фагоцитарной активностью обладают нейтрофильные лейкоциты молодых людей. Плазматическая мембрана этих клеток имеет типичное строение с хорошо выраженным полисахаридным комплексом на поверхности, образованным заряженными слабыми кислотами. Свойства гранулоцитов существенно меняются при повышении тоничности среды, снижении рН и температуры, т. е. они являются достаточно чувствительными к факторам криоконсервации. Лейкоциты в настоящее время применяются для лечения гранулоцитопенических состояний в клинике. Это стало воз-

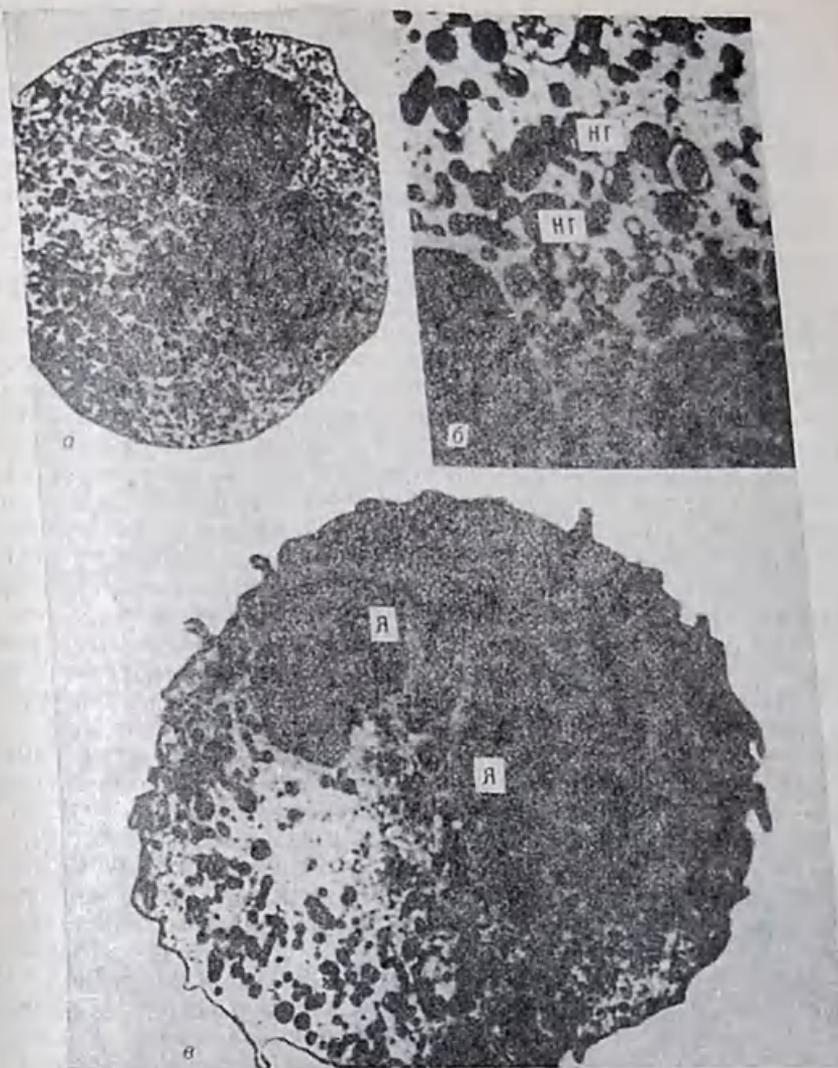


Рис. 58. Нейтрофильные гранулоциты человека:

а ($\times 12\ 000$) — хроматин распределен в виде более или менее плотных зон, много нейтрофильных гранул; *б* ($\times 30\ 000$) — участок этой же клетки, нейтрофильные гранулы (НГ) круглой и овальной форм окружены однослойной мембраной; *в* ($\times 61\ 000$) — клетка окрашена рутением красным для выявления мукополисахаридного покрытия плазматической мембраны (черное кольцо)

возможным после разработки и внедрения в практику метода лейкоцитозереза (сепараторы клеток крови типа «Аминго», «Гомонетик», система фильтрационного лейкофереза), позволяющего выделять из цельной крови достаточное количество лейкоцитов и других фракций крови.

Консервация лейкоцитов при умеренно низких температурах (0—4 °С) является малоэффективным, поскольку клетки после 48 ч хранения теряют способность к фагоцитозу. Криоконсервацию лейкоцитов лучше всего осуществлять под защитой проникающих (глицерин, ДМСО, ДМАЦ) и слабопроникающих (ИЭО М. м. 400) криопротекторов. Если замораживание лейкоцитов проводят под защитой раствора полиэтиленоксида с М. м. 400, то криопротектор медленно добавляют к суспензии в соотношении 1 : 4 и замораживают от 20 до —8 °С со скоростью 1—3 °С/мин. Затем клетки экспонируются при этой температуре в течение 5 мин и замораживаются со скоростью 10 °С/мин до —40 °С, а затем их погружают в жидкий азот.

Разработана также методика консервации гранулоцитов под защитой лейкокриодмаца, в состав которого входят 5-й раствор ДМАЦ, глюкоза и ЭДТА-Na₂. Для этого лейкоцитарная масса смешивается с защитным раствором в соотношении 3 : 1 и замораживается со скоростью 3 °С/мин от 20 °С до температуры кристаллизации. Затем клетки при этой температуре экспонируются 3—4 мин и в дальнейшем охлаждаются со скоростью 5 °С/мин до —100 °С с последующим погружением в жидкий азот.

Глицерин в чистом виде как защитное вещество не обеспечивает сохранность лейкоцитов в цикле криоконсервирования. Однако его эффективность может быть повышена добавлением в защитный раствор сахарозы. Растворы ДМСО по сравнению с глицерином дают несколько лучшие результаты, однако перед трансфузией клеток криопротектор необходимо удалять, что приводит, как и в случае с глицерином, к дополнительным повреждениям.

Криоконсервирование лейкоцитов до —196 °С под защитой ДМСО, глицерина и ДМАЦ с добавками сахарозы позволяет сохранять морфологическую целостность клеток в среднем 74,58—84 % при оценке с помощью суправитальных красителей (рис. 59).

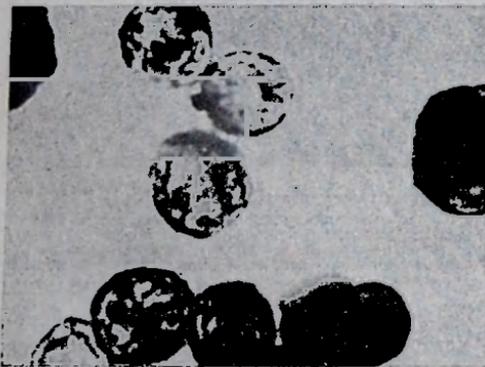


Рис. 59. Морфологическая картина замороженно-оттаянной суспензии лейкоцитов (×6000)

Однако при этом только около 30 % клеток сохраняют способность к фагоцитозу и передвижению. Поэтому терапевтический эффект размороженной лейкоцитарной массы иногда отсутствует, поскольку деконсервированные клетки не сохраняют своих специфических свойств. Методы криоконсервирования лейкоцитарной массы в настоящее время необходимо существенно модернизи-

ровать, так как клетки гранулоцитарного ряда чрезвычайно чувствительны к воздействию низких температур и осмотических факторов. Это прежде всего связано с тем, что эти клетки содержат много лизосом, которые быстро разрушаются, если режимные параметры криоконсервации не оптимизированы. Вышедшие в большом количестве в цитоплазму кислые гидролазы разрушают структуры клеток, что приводит к их гибели.

Консервация эритроцитов. Зрелый эритроцит человека, существующий в русле крови 120 дней, не содержит ядра и поэтому не способен синтезировать белки, нуклеиновые кислоты и их комплексы. Характерным для зрелого эритроцита является гликолитический тип обмена, в результате которого в клетке поддерживается высокое содержание 2,3-дифосфоглицериновой кислоты (2,3-ДФГ) и АТФ, регулирующих средство гемоглобина к кислороду. Образующиеся в процессе гликолиза энергетические продукты (АТФ, НАДН) необходимы для активного транспорта ионов через плазматическую мембрану, поддержания градиента ионов и функции сократительных белков мембранного скелета, формирующих двояковогнутую форму клетки. В эритроцитах наряду с гликолизом имеется также метаболическая система прямого окисления глюкозы (пентозный цикл), в которой активное участие принимают НАДФ, глутатион и глутатионредуктаза.

В зрелом состоянии эритроцит является высокоспециализированной клеткой, выполняющей исключительно функцию транспорта кислорода к тканям организма и обратного вывода из тканей углекислого газа.

В состав мембраны эритроцитов входит около 20 белков и гликопротеинов, а также различные липиды и гликолипиды. Большинство белков и гликопротеинов являются интегральными, они пронизывают мембрану, причем гидрофильные сегменты белков находятся в водной фазе и довольно прочно связаны с липидами. Периферические мембранные компоненты (примерно 25 % полного количества мембранных белков) расположены на внешней и внутренней поверхности мембраны и связаны с ней слабыми связями.

Фосфолипиды в мембране эритроцитов распределены асимметрично по обе стороны мембраны. Сфингомиелин и фосфатидилхолин находятся преимущественно на наружной поверхности мембраны, а фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин — на внутренней. Предполагают, это асимметричное расположение фосфолипидов в мембране эритроцитов связано со способностью фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина взаимодействовать с частью молекул спектрина, расположенного на внутренней поверхности мембраны. Такое распределение липидов играет существенную роль в регуляции текучести бислоя мембраны, и в частности обуславливает неоднородный характер его фазового состояния. Фосфолипиды принимают участие в регуляции нонтранспортирующих систем мембран. Важную роль в мембранах эритроцитов играет холестерин, который регулирует пластичность мембраны и

гидратированность липидного бислоя, т. е. влияет на температуру фазово-структурных переходов липидов и конформационное состояние белков.

Существует два основных способа консервирования эритроцитов: во-первых, консервация при низких положительных температурах (0—4 °С) и, во-вторых, замораживание — криоконсервация, т. е. когда клетки хранятся при температуре —80...—196 °С. Возможны также замораживание и хранение эритроцитов при температурах —30...—40 °С.

Метод консервации эритроцитов при 0 °С используется очень давно и имеет много различных модификации по режимам хранения и особенно по составу и природе стабилизирующих сред, сохраняющих структурно-функциональные свойства клеток. Для первичной стабилизации донорской крови применяют кислый цитрат натрия либо натриевую или калиевую соль сахарной кислоты, которые по своей структуре напоминают глюкозу. Так называемый раствор 7б для стабилизации эритроцитов, в котором цитрат заменен солями сахарной кислоты, поддерживает структурно-функциональные свойства эритроцитов примерно 3—4 нед при 4 °С. Поскольку в процессе хранения эритроцитов при температуре 4 °С происходит убыль энергетических ресурсов и нарушение метаболических процессов, в состав консервирующих растворов вводят аденин, инозин, гуанозин, пируват, токоферол, прогестерон, ксилит, глутаминовую кислоту. Нередко используют так называемый стабилизирующий раствор 8, в состав которого входят сахароза, глюкоза, кислый цитрат натрия и сульфатид натрия. В этих растворах спустя 2—3 нед количество функционально полноценных клеток снижается на 60—70 %. Замена сахарозы в этом растворе маннитом практически не повышает его стабилизирующие свойства при гипотермическом хранении эритроцитов. Состав некоторых плазмозамещающих растворов для гипотермического хранения эритроцитов приведен в табл. 33. Используемый в практике раствор 1 обеспечивает сохранность эритроцитов на протяжении 3 нед при температуре 4 °С. Разработанный КНИИГПК препарат эритроцифонит, представляющий собой сложный кристаллоидный раствор, позволяет хранить эритроциты в жизнеспособном состоянии на протяжении 3 нед. Гемоконсерванты типа «глюгидир» и «циглюфад» (лимонная кислота, глюкоза, гидроцитрат натрия, трехзамещенный фосфат, аденин, рН 5,7) позволяют продлить сроки гипотермического хранения клеток до 1 мес. Для поддержания структурно-метаболического состояния консервированных эритроцитов используют также так называемые реставрирующие растворы, включающие в свой состав различные активные вещества и более сложные ингредиенты. Растворы типа «эритропифаден» и «цитроглюкофосфат» содержат соединения, которые интенсифицируют процессы гликолиза и повышают концентрацию АТФ и 2,3-ДФГ в клетке, т. е. способствуют сохранению их кислородтранспортной функции. В настоящее время продолжается

Таблица 33. Состав некоторых плазмозаменяющих растворов для гипотермической консервации эритроцитов (г/л)

Раствор 76 ЦНИИГПК		Гемоконсервант КНИИГПК		Раствор 8 ЦНИИГПК	
Цитрат	2,0	НССК	10,0	Сахароза	80,0
Глюкоза	3,0	Глюкоза	3,0	Глюкоза	6,0
Левомицетин	0,015	Левомицетин	0,015	Цитрат	3,5
<i>Aq. dest.</i>	до 100	<i>Aq. dest.</i>	до 100 мл	Сульфацил	1,0
pH	4,9—5,2	pH	4,9—5,2	(либо риванол левомицетин)	0,01
					0,06)

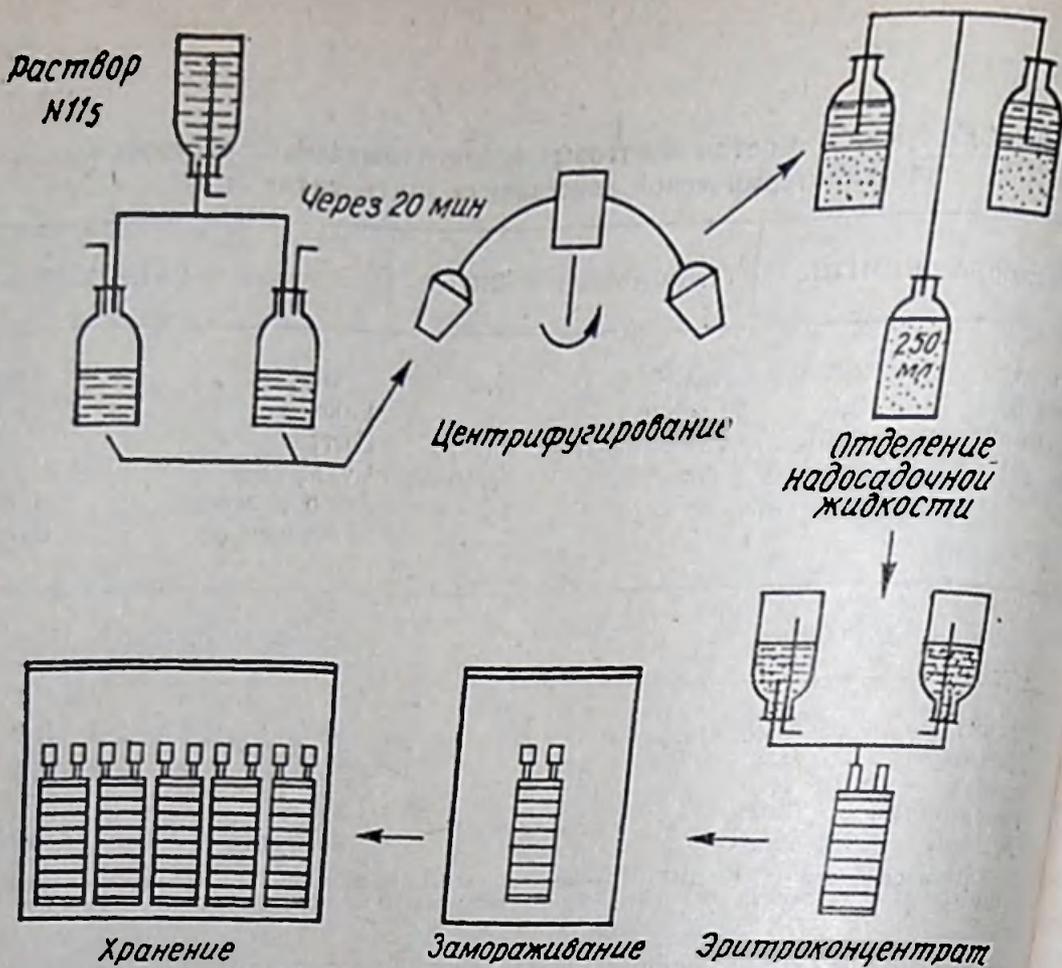
Раствор 8 с манным		Раствор ЦНИИГПК 1 (ммоль)	
Маннит	40,0	NaCl	154
Глюкоза	0,6	Аскорбат	20,0
Цитрат	1,75	Никотинамид	20,0
Левомицетин	0,06	Аденин	0,5
<i>Aq. dest.</i>	до 1 л	<i>Aq. dest.</i>	1,0 л

Примечание. КНИИГПК — Киевский НИИ гематологии и переливания крови
ЦНИИГПК — Московский НИИ гематологии и переливания крови

разработка более эффективных сред для гипотермического (0—4 °С) хранения эритроцитарной массы.

Низкотемпературная консервация эритроцитов чаще всего осуществляется путем замораживания клеток до —196 °С со скоростью 200—300 °С/мин под защитой 15—20 %-го раствора глицерина или другого криопротектора, который легко проникает через плазматическую мембрану клеток при комнатной температуре и предотвращает формирование крупных внутриклеточных кристаллов льда (схема). Во втором способе эритроциты медленно замораживают до —70...—80 °С под защитой 40 %-го глицерина. Замораживание эритроцитов с глицерином проводят по разработанной методике. Для этого, например, защитный раствор ЦНИИГПК-11₄ добавляют к клеткам в соотношении 1 : 1, глицеринизированную взвесь эритроцитов помещают в алюминиевый контейнер и выдерживают в нем 15 мин, а затем замораживают путем погружения контейнера в жидкий азот. Отогрев после хранения производят в водяной бане с температурой 45 °С. При модифицированном методе, позволяющем при том же объеме контейнера (290 мл) заморозить удвоенное количество эритроцитов, используют защитный раствор ЦНИИГПК-11₅, отличающийся от раствора ЦНИИГПК-11₄ только более высокой (40 %) концентрацией глицерина (табл. 34).

Если замораживают эритроциты до температур —50...—35 °С, то концентрацию глицерина в защитной среде надо увеличить до 30 % и, кроме того, в нее желательнее ввести 10 % лактозы или сахарозы, 0,2 % натрия бромид и 0,3 % ЭДТА-Na. Существует также метод криоконсервации эритроцитов (Львовский НИИГПК),



Т а б л и ц а 34. Состав криоконсервантов для замораживания эритроцитов (г/л)

Раствор II, ЦНИИГПК для замораживания клеток до -196°C		Раствор для замораживания клеток до -60°C — -70°C	
Маннит	40,0	Маннит	20,0
ЭДТА	3,0	NaCl	4,0
NaCl	7,0	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	0,8
Глицерин	300,0 мл	Глицерин	570 мл
Ag. dest.	до 1,0 л	Ag. dest.	до 1,0 л
		pH	6,8
Раствор для замораживания клеток до -40°C		Раствор II, ЦНИИГПК для замораживания клеток до -196°C	
ЭДТА	3,0	Маннит	40,0
Глюкоза	90,0	NaBr	7,0 или ЭДТА 3,0
Глицерин	791,2	KCl	—0,3
Ag. dest.	1,7 л	Глицерин	400,0 мл
		Ag. dest.	до 1,0 л
Раствор для медленного замораживания клеток до -40°C — -80°C		Сахарозный раствор для консервирования цельной фибринолизной крови	
Маннит	20,0		
	4,0		
			0,8
Глицерин	570 мл	Сахароза	110
Ag. dest.	до 1,0 л	Левомецетин	0,15
		Ag. dest.	до 1,0 л

при котором клетки выдерживают вначале 30 мин при 4°C в защитном растворе, содержащем 39,6% (конечная концентрация) глицерина, а затем суспензию переносят в холодильную камеру с температурой -40°C.

Криоконсервирование эритроцитов до -40...-70°C отличается относительной простотой, возможностью широкого применения, поскольку этот метод позволяет использовать электрохолодильники.

Данные об эффективности ПВП в качестве криопротектора при консервации эритроцитов противоречивы. Наиболее эффективными являются растворы ПВП с М. м. 25 000 и 12 000, которые при соблюдении определенных скоростей замораживания могут сохранять определенный процент жизнеспособных клеток. Например, в ЦНИИГПК разработана следующая консервирующая среда на основе ПВП:

ПВП с М. м. 12600	2000,0 г	глюкоза	20,0 г
NaCl	4,0 г	вода	до 1000 мл

Недостаток глицерина заключается в том, что его необходимо удалять из деконсервированной взвеси клеток. В настоящее время для криоконсервации эритроцитов апробировано достаточное количество сред и криопротекторов.

В ИПКиК АН Украины разработаны методы криоконсервирования эритроцитов, первый из которых включает в себя предварительную холодовую адаптацию клеток при 0-4°C в 15%-м растворе ПЭО с М. м. 1500, после чего эритроциты быстро замораживаются в жидком азоте. После замораживания — отогрева жизнеспособность клеток составляет 95%. Размороженную суспензию можно использовать в клинике без отмывания суспензии от криопротектора.

Второй способ основан на замораживании эритроцитов под защитой более сложного раствора — пропандносахароля. Эквипробацию клеток с раствором 1,2-пропандиола (370 мл), сахарозы (32,0 г) и хлористого натрия (6,0 г) в отличие от первого метода проводят при 20-25°C, а замораживание со скоростью 12-14°C/мин до -196°C. Перед переливанием клеток защитный раствор удаляют путем разведения суспензии сахарозно-солевым раствором и центрифугирования. Величина гемолиза после замораживания составляет 2-3%.

Важным этапом в технологическом процессе криоконсервирования эритроцитов является удаление криопротектора из размороженных клеток.

Отмывание эритроцитов от глицерина проводят в настоящее время тремя методами: многократного центрифугирования, обратной агломерации и автоматического непрерывного центрифугирования. Все методы отмывания основаны на принципе постепенного разведения содержащих глицерин эритроцитов гипертоническими растворами не проникающих в клетку веществ — дисахаридов, многоатомных спиртов, электролитов и др. Осмотическая

активность отмывающих растворов понижается по мере уменьшения концентрации внутриклеточного глицерина. После процедуры отмывания в эритроцитах, как правило, остается менее 0,5 % глицерина.

Для отмывки эритроцитов от глицерина можно также использовать метод ускоренной седиментации, разработанный ЦНИИГПК. Он основан на принципе обратной агломерации при разведении суспензии растворами сахаров в бессолевой среде. Для этого используют глюкозо-маннитный и глюкозо-сахарозный растворы без добавок ЭДТА, после добавления которых через 2—3 мин начинается, а спустя 5—10 мин заканчивается осаждение клеток. Надосадочную жидкость удаляют, а клетки после третьего промывания концентрируют в равных количествах сахарно-фосфатно-солевого раствора 8в.

Ленинградский НИИГПК рекомендует отмывать деконсервированные эритроциты раствором, содержащим 37,5 % глицерина, 4 % сорбита и 1 % натрия цитрата. Разработанный этим институтом двухэтапный метод деглицеринизации клеток не уступает трехкратному. Известны также среды для ресуспендирования размороженных эритроцитов, в состав которых входят желатиноль, сахароза, глюкоза и фосфатные соли.

В зарубежных криобиологических центрах широко используются автоматизированные методы деглицеринизации с помощью специальных фракционаторов.

Поскольку в процессе замораживания и деглицеринизации размороженные клетки интенсивно теряют ионы и биологически активные вещества (нуклеотиды, ионы и энергетические субстраты), для улучшения качества консервированных под защитой глицерина эритроцитов используют так называемые омолаживающие, или реставрирующие, растворы. В ЦНИИГПК разработано несколько таких типов взвешивающих растворов для реабилитации размороженных и отмывших от глицерина эритроцитов. Растворы 8б и 8в, замедляющие гемолиз и распад макроэргов, обеспечивают срок годности деконсервированных клеток в течение 3 дней, а другие растворы — 5—7 дней. В зарубежных криомедицинских центрах используют реставрирующие составы под названием ПИГФа (пируват, инозин, глюкоза, фосфат неорганический) и ПИГФА, в состав которых входят ингибиторы процессов дезаминирования, протеолиза и перекисного окисления липидов.

Ресуспендирование клеток в этих растворах позволяет хранить их на протяжении 1 мес при 4 °С. Однако добавление в состав гемоконсервантов или реставрирующих растворов биологически активных соединений может вызывать опасные осложнения после переливания крови. Например, переливание больших доз крови, содержащей добавки нуклеотидов (аденин, гуанозин) и других ингибиторов (пирадамоль, синтетические антиоксиданты), может вызывать токсическое поражение почек и падение артериального давления. Это происходит в результате образования метаболита аденина — 2,8-диоксиаденозина, который обладает токсическими

свойствами. Поэтому вопрос о целесообразности и эффективности использования продуктов нуклеиновых кислот и ингибиторов метаболизма остается открытым и требует более тщательных работ.

Криоконсервация иммунокомпетентных клеток

Имунокомпетентные клетки в организме животных и человека представлены гетерогенной популяцией и продуцируются вилочковой железой, костным мозгом, селезенкой и другими видами лимфоидной ткани. Родоначальником лимфоидных клеток являются стволовые кроветворные клетки, которые выступают в роли общих предшественников всех ростков кроветворения, в том числе и лимфоидного. Они локализованы в гетерогенной популяции клеток костного мозга (миелокариоцитах) и морфологически пока точно не идентифицированы, хотя разработан способ их количественного учета в экспериментальных условиях.

Стволовые кроветворные клетки представляют собой полипотентную, самоподдерживающуюся клеточную популяцию, которая проходит ряд последовательных этапов развития и трансформируется в более дифференцированные клетки — предшественники, дающие рост определенной клеточной линии, в том числе и лимфоидной. Лимфоидные стволовые клетки генерируют два типа клеток: предшественники тимусзависимых (Т-лимфоцитов) и бурсазависимых (В-лимфоцитов) клеток. Предшественники Т-лимфоцитов мигрируют в тимус, где под влиянием гуморальных медиаторов претерпевают ряд последовательных стадий дифференцировки, приобретая иммунологическую компетентность Т-лимфоцитов. Под влиянием тимических факторов и соответствующего микроокружения формируется три самостоятельных типа лимфоцитов Т-ряда: Т-помощники (Т-хелперы), Т-эффекторы и Т-супрессоры, которые выходят в кровоток и расселяются в тимусзависимых зонах периферических лимфоидных органов. Первой системой клеточного иммунитета является Т-система лимфоцитов, число которых в крови достигает 50—70 %. Т-хелперы и Т-супрессоры выполняют функции главных регуляторов иммунной системы. Так, Т-хелперы стимулируют трансформацию В-лимфоцитов в клетки, синтезирующие антитела (плазмоциты), а Т-супрессоры ограничивают интенсивность иммунного ответа биологической потребностью, достаточной для восстановления гомеостаза. К числу Т-эффективных относятся клетки, которые осуществляют клеточные иммунологические реакции. Среди Т-лимфоцитов существуют клетки — амплификаторы (усилители), которые участвуют в процессах дифференцировки иммунокомпетентных клеток и формировании клеток иммунологической памяти.

В-система лимфоцитов у млекопитающих возникает из кроветворных стволовых клеток непосредственно в костном мозге. Здесь часть стволовых клеток под влиянием неизвестных еще причин превращается в предшественников В-клетки, которые в свою очередь через определенные стадии превращаются в костномозго-

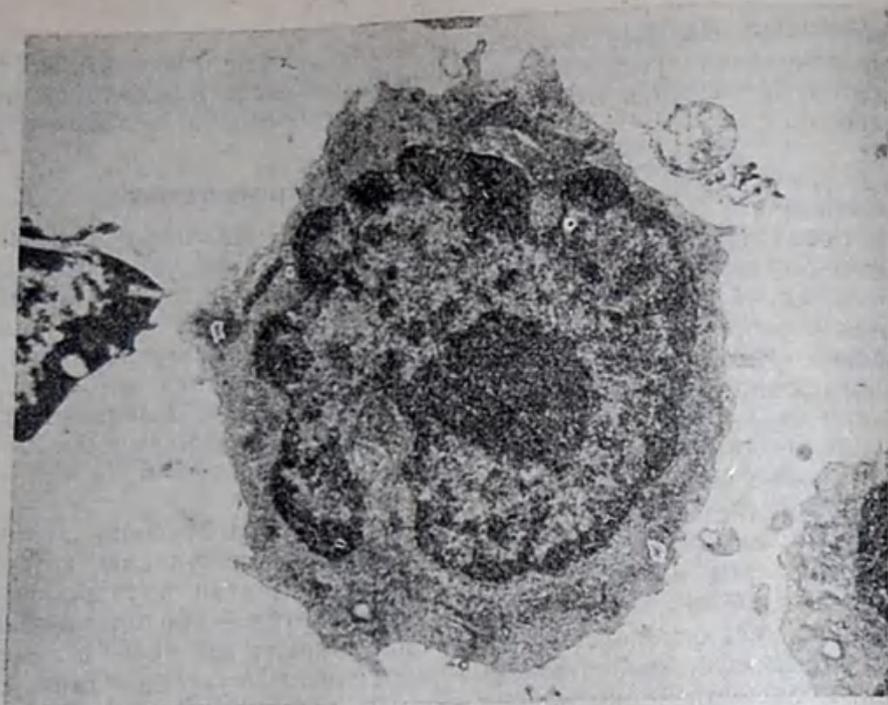


Рис. 60. Ультраструктура нативного тканевого лимфоцита ($\times 56\,000$)

вые В-лимфоциты. Основной функцией В-лимфоцитов является продукция антител. Однако в последнее время получены данные, показывающие, что эти клетки могут выполнять роль клеток-супрессоров, киллеров, хелперов, клеток памяти.

Таким образом, клетками, реализующими реакции гуморального иммунитета, являются В-лимфоциты, а клетками, реализующими реакции клеточного иммунитета, — Т-лимфоциты. Существенным признаком лимфоцитов является значительный объем ядра по сравнению с цитоплазмой (рис. 60).

Иммунологические реакции, развивающиеся в ответ на генетически чужеродные субстраты, — результат кооперативного взаимодействия Т- и В-лимфоцитов и макрофагов, которые отличаются тем, что имеют большие размеры (10—25 мкм), почковидное или овальное ядро с одним ядрышком и хроматином и цитоплазму, богатую лизосомами. Для антигенного распознавания лимфоциты и макрофаги содержат рецепторы, представляющие собой иммуноглобулины, которые имеют высокую плотность в мембране В-лимфоцитов и низкую в Т-лимфоцитах. Например, на поверхности В-лимфоцита находится 50 000—150 000 иммуноглобулиновых молекул, Т-лимфоциты содержат в 100—1000 раз меньше.

Нарушения в иммунной системе какого-либо из описанных выше звеньев вызывают заболевания у человека, которые называются иммунодефицитными. Тяжелые проявления иммунодефицитов

удается восстановить с помощью: пересадки костного мозга, Т- и В-лимфоцитов клеток селезенки, лимфатических узлов или лимфоцитов крови от иммунологически зрелых доноров; трансплантации вилочковой железы плода или взрослого донора; пересадки эмбриональной печени, которая является поставщиком кроветворных стволовых клеток и вилочковой железы от одного и того же донора-плода. Наряду с пересадкой цельного костного мозга от донора, совместимого с реципиентом по антигенам тканевой совместимости, эффективной является и трансплантация фракции стволовых клеток, выделенных из костного мозга или периферической крови иммунологически зрелого совместного донора (может сочетаться с трансплантацией вилочковой железы). Успех в лечении иммунодефицитных состояний в значительной мере будет зависеть от создания низкотемпературных банков костного мозга, лимфоидных клеток и других необходимых для этих целей биоматериалов. Источником получения лимфоидных клеток в организме человека являются периферическая кровь, лимфатические узлы, селезенка, костный мозг, тимус.

Криоконсервация тканевых лимфоцитов. Лимфоциты из соответствующих тканей или органов получают с помощью фильтрации клеточной суспензии, поскольку эти клетки обладают низкими адгезивными свойствами и не задерживаются на фильтрах. Лимфоциты крови выделяют и концентрируют с помощью дифференциального центрифугирования, например, в системе фикол — изопак, а также с помощью электрофореза и аффинной хроматографии. Такие методы, как препаративный электрофорез и аффинное разделение клеток на колонках, применяют лишь в тех случаях, когда необходимо не только выделить чистую популяцию лимфоцитов, но и разделить ее на субпопуляции.

Т-лимфоциты обладают более высокой по сравнению с В-лимфоцитами электрофоретической подвижностью, что обусловлено большей плотностью отрицательных электрических зарядов на их поверхности, поскольку содержат большое число остатков слаловых кислот. При получении лимфоцитов из лимфоидных органов ткань дезинтегрируют в растворе Хэнкса, среде 199 или Игла с добавлением 5—10 % аутологичной или гомологичной сыворотки и фильтруют через несколько слоев нейлоновой ткани. Поскольку при разделении клетки повреждаются, для их криоконсервирования пользуются не совсем чистой популяцией.

Наиболее эффективна консервация лимфоцитов при сверхнизких температурах, так как это позволяет достаточно длительно сохранять их функциональные и специфические свойства. Для краткосрочного хранения лимфоидных клеток применяют метод гипотермии, который позволяет сохранять лимфоциты селезенки при температуре 0—5 °С на протяжении до 24 ч. Замораживание клеточной взвеси до —196 °С производят в программных холодильных установках, а до температур —60...—70 °С — во фреоновых рефрижераторах. В случае программного замораживания лимфоцитов их эквивилибрируют в средах 199, Игла, Дюльбекко,

РРМІ-1640 или Хэнкса. Чаще всего применяется среда РРМІ-1640 с обязательной добавкой 10—40 % аутологичной, гомо- или гетерологичной сыворотки, которая способствует снижению разрушающего действия на клетки неблагоприятных физико-химических факторов криоконсервирования, реализуемых на этапах охлаждения, замораживания и отогрева. В базисную среду, содержащую сыворотку, к лимфоидным клеткам в концентрации $1 \cdot 10^6$ — $5 \cdot 10^6$ прибавляют 7,5—15%-е растворы ДМСО, замораживают при скорости 1—3 °С/мин до —196 °С и быстро отогревают. Лимфоциты из лимфоидных органов, замораживаемые под защитой ПЭО с М. м. 400, вначале охлаждают до —5 °С, а затем со скоростью ~3 °С/мин до —28 °С, осуществляют экспозицию при этой температуре 20—18 мин, а затем быстро погружают в жидкий азот. Имеются единичные сообщения и об эффективности глицерина при замораживании лимфоцитов, полученных из лимфоидных органов и костного мозга мышей. В этом случае клетки под защитой 15%-го раствора глицерина замораживают со скоростью 1 °С/мин до начала кристаллизации, т. е. до —9...—10 °С с последующим охлаждением со скоростью 10 °С/мин до —196 °С.

Наиболее эффективные методы программного криоконсервирования позволяют сохранять жизнеспособность 50—60 % клеток.

Отогрев суспензии лимфоцитов независимо от способа замораживания осуществляется на водяной бане при температуре 37 или 41 °С. Все криопротекторы, кроме ПЭО с М. м. 400, перед введением деконсервированной клеточной суспензии в организм необходимо удалять. При отмывании лимфоцитов от ДМСО суспензию клеток медленно разбавляют охлажденной средой, чаще всего РРМІ-1640, содержащей 20 % человеческой сыворотки, до соотношения криопротектор — среда 1 : 10. После центрифугирования клетки ресуспендируют в любой подходящей среде. При температурах —60...—90 °С клетки можно хранить в функционально полноценном состоянии до трех месяцев, а при температурах —160...—196 °С — 3—10 лет и более.

После низкотемпературного консервирования лимфоидных клеток часть их разрушается — преимущественно это средние и большие лимфоциты (рис. 61). Наиболее устойчивыми являются малые лимфоциты, что подтверждают цитологические, биохимические и иммунологические исследования. Устойчивость к замораживанию Т- и В-лимфоцитов неодинакова, что объясняется их различной чувствительностью к воздействию физико-химических факторов на этапах криоконсервации. В частности, Т-лимфоциты более чувствительны к осмотическому шоку, чем В-лимфоциты, что обусловлено различиями в молекулярной упаковке белков и липидов мембран указанных клеток. Деструкция Т-лимфоцитов под влиянием осмотического шока развивается как в период охлаждения — замораживания, так и в процессе отогрева.

В связи с этим существует так называемый феномен криогенного истощения иммунокомпетентных клеток костного мозга, обусловленный различной чувствительностью Т- и В-лимфоцитов к

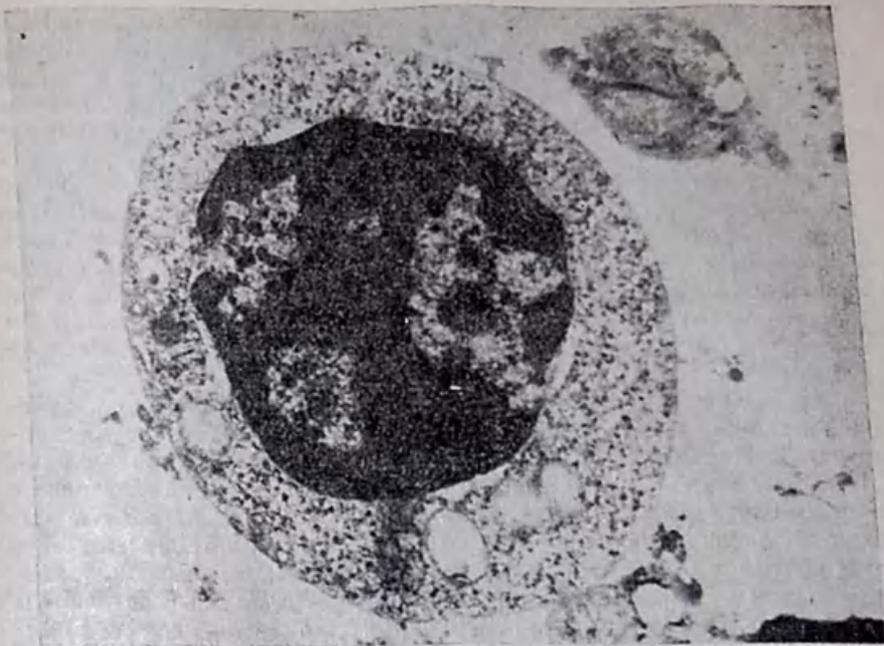


Рис. 61. Микроскопическая картина лимфоцита после замораживания — оттаивания ($\times 56\ 000$)

замораживанию, оттаиванию и осмотическому шоку. Под влиянием факторов криоконсервирования у лимфоцитов наиболее часто ингибируются процессы биосинтеза белка и нуклеиновых кислот, дыхания и окислительного фосфорилирования. Исследование неспецифической активности Т- и В-популяции лимфоцитов лимфоидных органов, например спленоцитов, с помощью поликлональных митогенов, избирательно индуцирующих трансформацию Т- или В-клеток, показывает, что после деконсервации сильно повреждаются в основном клетки, отвечающие на добавку во ФГА. При замораживании лимфоидных клеток, выделенных из селезенки или лимфоузлов, до -80 или -196°C в популяции остается всего 40—60 % клеток, способных реагировать на добавку в среду ФГА, и 30 % клеток, отвечающих на РВМ. Вместе с тем число клеток, реагирующих на *LPS* и на конковалин, изменяется в незначительной степени. При замораживании тканевых лимфоцитов изменяются и другие системы, реализующие различные иммунные реакции. В частности, после замораживания спленоцитов мыши до -150°C интенсивность их цитотоксической реакции на аллогенные опухолевые клетки не изменяется, а на сингенные — снижается. Это объясняется тем, что при замораживании меняется как-то образом соотношение клеток-киллеров и клеток-мишеней. Если оно уменьшается и составляет 25 : 1 (при норме 100 : 1), цитотоксический ответ клетки снижается. Характерным процессом

перестройки иммунной системы лимфоидных клеток под влиянием замораживания — отогрева является увеличение числа лимфоцитов, которые более интенсивно трансформируются под влиянием ФГА, и их способности активировать *GVH*-реакцию. Полагают, что это связано с разрушением в замороженной популяции клеток супрессоров.

Наиболее устойчивы к факторам низкотемпературной консервации лимфоциты, находящиеся в покоем состоянии. При этом лимфоциты из лимфоузлов и тимуса обладают одинаковой устойчивостью к воздействию факторов низкотемпературной консервации. Методы криоконсервации тканевых лимфоцитов в настоящее время не доведены до максимальной эффективности, и поэтому необходимы дальнейшие исследования, направленные на усовершенствование этапов их криоконсервации.

Криоконсервация лимфоцитов крови. Лимфоциты периферической крови человека осуществляют такие иммунологические процессы, как антителообразование, контроль дифференцировки и др. Лимфоциты крови людей по своей ультраструктуре разделяются на большие, малые светлые, малые темные и лимфоплазмциты. Основную популяцию лимфоцитов крови составляют малые светлые популяции, характеризующиеся плотноупакованным хроматином в ядре, которое занимает подавляющую площадь клетки, а в цитоплазме содержат мало митохондрий, рибосом гранулярной эндоплазматической сети и редуцированный комплекс Гольджи (рис. 62). Другие виды лимфоцитов отличаются от малых светлых форм содержанием внутриклеточных органелл. В целом по субмикроскопической организации и набору органелл лимфоциты из всех клеток крови наиболее близки к молодым гемопоэтическим клеткам, которые также являются достаточно устойчивыми к холодному воздействию клетками.

Лимфоциты крови хорошо переносят различные механические воздействия, что, очевидно, связано с их высокой стабильностью к различного рода воздействиям, приобретенной в процессе эволюции, когда организмам была необходима надежная защита от внедрения и действия чужеродных агентов.

Выделяют лимфоциты из крови с помощью фильтрации клеточной суспензии через слой ваты или колонки. При этом гранулоциты и моноциты прилипают к поверхности указанных материалов, а лимфоциты, обладающие низкой адгезивной активностью, на адсорбентах не задерживаются и концентрируются в фильтрате. Для получения чистой популяции лимфоцитов можно применять дифференциальное центрифугирование в градиентах плотностей различных веществ (верографин, фиколверографин). Собранные лимфоидные клетки эквilibрируют чаще всего в растворах *RPM1-1640*, содержащих в качестве обязательного компонента 5—20% инактивированной аутологичной или гомологичной эмбриональной сыворотки телят и 10—15%-е растворы ДМСО, реже — ПВП либо глицерин.

Криопротекторы в 10%-й концентрации к суспензии клеток до-

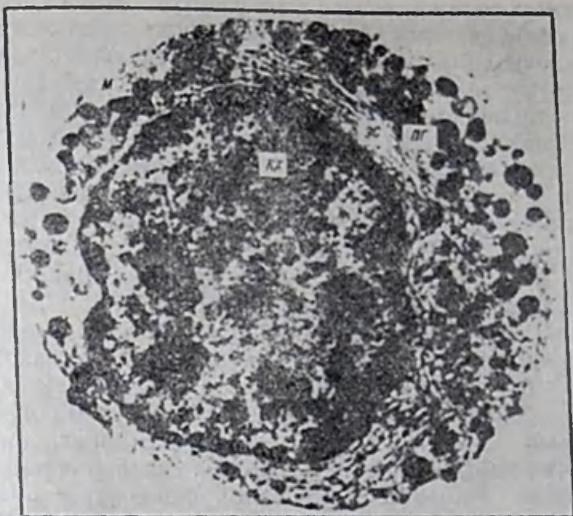


Рис. 62. Структура лимфоцита крови:

К — конденсированный хроматин; ЭС — эндоплазматическая сеть; ПГ — плазматический матриксе с большим числом лизосом ($\times 20\,000$)

бавляют при $0-4^{\circ}\text{C}$, а замораживают их по двухэтапной программе: на первом — со скоростью $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $-15...-20^{\circ}\text{C}$, на втором — до -80°C или погружают в жидкий азот. Существует методика замораживания суспензии лимфоцитов периферической крови человека под защитой 10%-го раствора ДМСО по следующей программе: на первом этапе замораживание со скоростью $0,3-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -60°C , на втором — быстрое погружение в азот либо замораживание со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -30°C , а затем со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -80°C , после чего быстро погружают в жидкий азот. Английским криобиологом Дж. Фаррантом разработана методика консервации лимфоцитов под защитой 10%-го ДМСО с температурными остановками, которая заключается в том, что на первом этапе лимфоциты замораживают со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -25°C и выдерживают при этой температуре 30 мин, а затем быстро погружают образцы в жидкий азот.

Жизнеспособность лимфоидных клеток сохраняется также при замораживании клеточной суспензии со скоростью $4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -50°C под защитой 10%-го раствора ПВП с добавкой аутологичной сыворотки крови. При использовании в качестве криопротектора ПЭО с М. м. 400 положительный эффект получают при криоконсервации лимфоцитов вначале со скоростью $45^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -15°C , а затем со скоростью $3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -28°C . При этой температуре клетки выдерживают 20 мин, а затем погружают в жидкий азот. Криоконсервация суспензии лимфоцитов крови без криопротектора возможна в очень малых объемах (0,2 мл) с добавлением в среду аутологичной или гетерологичной сыворотки.

Из размороженной взвеси лимфоцитов ДМСО либо другой криопротектор удаляют путем медленного добавления снижающихся концентраций специальных сред, содержащих эмбриональную сыворотку теленка. При соблюдении соответствующих условий замораживания — отогрева сохраняется до 100 % живых клеток, в которых такие морфофункциональные показатели, как их структура, сохранение основных антигенов гистосовместимости, способность к розеткообразованию и бласттрансформации под влиянием тканевых антигенов и поликлональных митогенов, практически не нарушаются. Исключением является запаздывание ответа клеток на воздействие ФГА, как это наблюдается и в случае криоконсервации других типов иммунных клеток.

Лимфоциты периферической крови являются достаточно устойчивыми к действию факторов криоконсервации, и их общая выживаемость составляет 80—90 %, в то время как лимфоциты, выделенные из лимфоидных тканей, отличаются высокой криочувствительностью, и процент их выживаемости после замораживания — отогрева не превышает 30—50. Это связано с тем, что в процессе выделения тканевых лимфоцитов повреждается их плазматическая мембрана, поэтому в процессе криоконсервации тканевых криоконсервации других типов иммунных клеток.

Криоконсервация миелокариоцитов. Суспензия клеток костного мозга представляет собой гетерогенную систему, состоящую из разной степени зрелости и развития родоначальных стволовых клеток (табл. 35).

Существует две популяции родоначальных клеток: первая, которая пролиферирует с определенным генерационным временем, и вторая — остающаяся в состоянии покоя и способная дифференцироваться в сторону того или другого клеточного ростка в зависимости от характера индукции. Первой, морфологически идентифицируемой хорошо различимой клеткой гранулоцитопозза является миелобласт, после созревания которого формируются промиелоциты нейтрофильного, эозинофильного и базофильного ряда. Промиелоциты дифференцируются в миелоциты, из которых формируются юные гранулоциты (метамиелоциты). Развитие и появление в популяции промоноцитов, а затем моноцитов связано с мононуклеарными фагоцитами. Дифференциация кровяных клеток — предшественников костномозговых клеток — также идет в направлении создания красного ростка крови — проэритробластов, базофильных, полихроматофильных и оксифильных нормобластов. После созревания эритроидных клеток образуются ядерные клетки, ретикулоциты и зрелые эритроциты. Гигантские клетки костного мозга — мегакарициты — являются родоначальными клетками тромбоцитов и образуются после созревания мегакариобластов и промегакариоцитов (табл. 35). Видно, что суспензия костного мозга содержит клетки различной стадии дифференцировки, которые отличаются друг от друга размерами, формой, внутренней архитектурой цитоплазмы. В криобиологическом аспекте существование такой гетерогенной популяции является немаловажным.

Таблица 35. Характеристика популяции миелокариоцитов

Степень дифференциации	Размеры, мкм	Некоторые структурные характеристики
Родоначальные (миелобласт)	клетки 8—10 или 5—6	Ядро содержит 2—5 ядрышек, обильно рибосом
Промиелоцит	16—23	Ядро занимает большую часть клетки 1—2 ядрышка
Миелоцит	8—12	Ядро занимает большую часть клетки, ядрышек нет
Метамиелоцит	7—8	Ядерно-цитоплазматическое отношение сдвинуто в сторону цитоплазмы, которая занимает большую часть клетки, характеризуется наличием гранул
Промоноцит	15—20	Ядро занимает большую часть клетки
Моноцит	14—20	Соотношение ядра и цитоплазмы 1 : 1
Прозеритробласт	15—20	Крупное сетчатое ядро, занимает большую часть клетки, содержит 1—2 ядрышка, много рибосом
Базофильный эритробласт	10—18	Большое ядро, хроматин образует комочки
Полихроматофильный эритробласт	10—14	Ядро небольшое, выражен пикноз хроматина
Оксифильный нормобласт	7—10	Ядро бесструктурное, сильный пикноз ядра, ядрышки отсутствуют
Мегакариобласт	25—40	Ядро занимает большую часть клетки, содержит 1—3 нуклеолы, много рибосом и митохондрий
Промегакариоцит	40—80	Ядро с перетяжками, сегментировано
Мегакариоцит	50—100	Отличаются разнообразием формы ядра, структура ядра грубосетчатая, ядрышек нет

важным фактором, поскольку затрудняет выбор оптимальных для всех видов клеток режимов замораживания — отогрева, природу и концентрацию криопротектора. Действительно, клетки, имеющие небольшой размер, должны лучше переносить криоконсервацию, чем более крупные клетки, поскольку степень их обводненности различна (рис. 63).

Суспензию клеток костного мозга обычно криоконсервируют с использованием определенных программ под защитой 12—15%-х растворов ДМСО, глицерина, ПВП и ПЭО с М. м. 400. Применяют двухэтапное замораживание: на первом — со скоростью 1—2 °С/мин до —15 либо —20 °С, на втором — клетки погружают в жидкий азот. Возможны различные модификации режимных параметров замораживания с использованием температурных остановок и способов индуцированной кристаллизации. Среди замороженной популяции костномозгового пункта более криоустойчивыми являются клетки эритроидного ряда и лимфоциты.

При оптимальных режимах криоконсервации жизнеспособность клеток достигает 70 %, колониеобразующая способность в селезенке — ~50—70 %. Жизнеспособность деконсервированных клеток оценивают с помощью суправитальных красителей (трипановый синий, эозин), изучения их миграционной и фагоцитарной

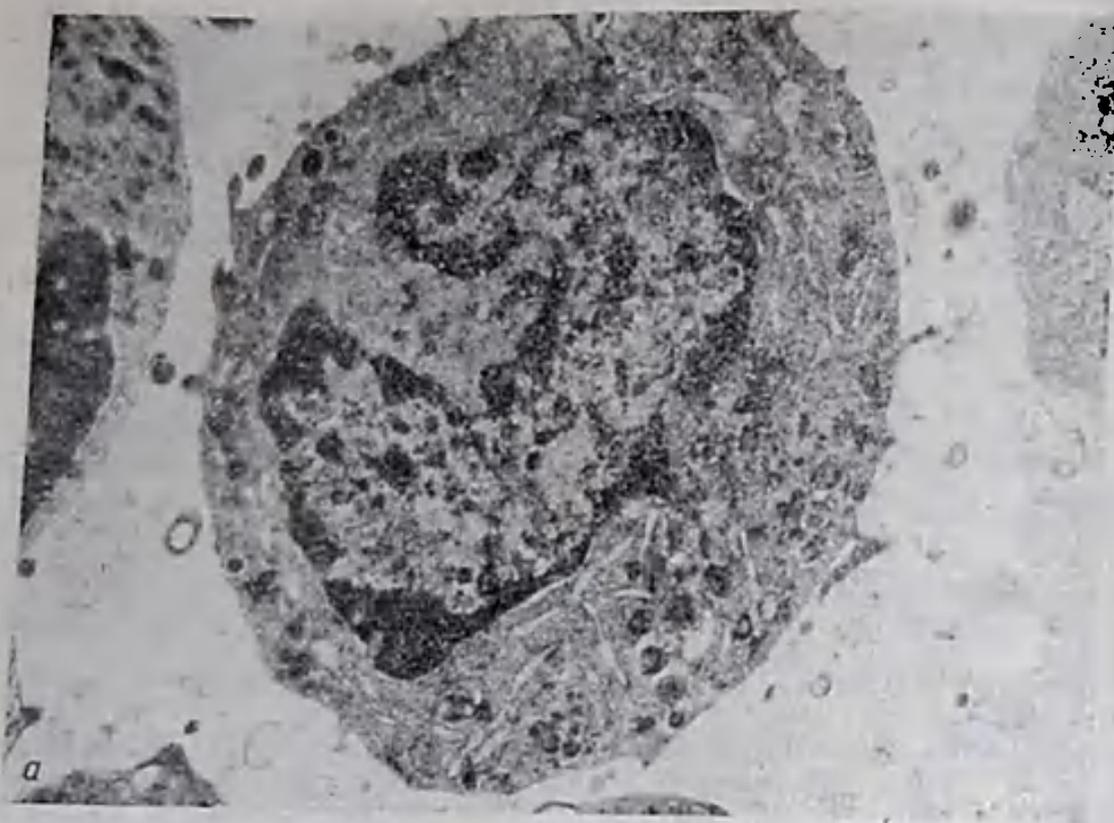


Рис. 63. Ультраструктура нативного (а) и замороженного до -196°C (б) миело-
карноцита ($\times 60\ 000$)

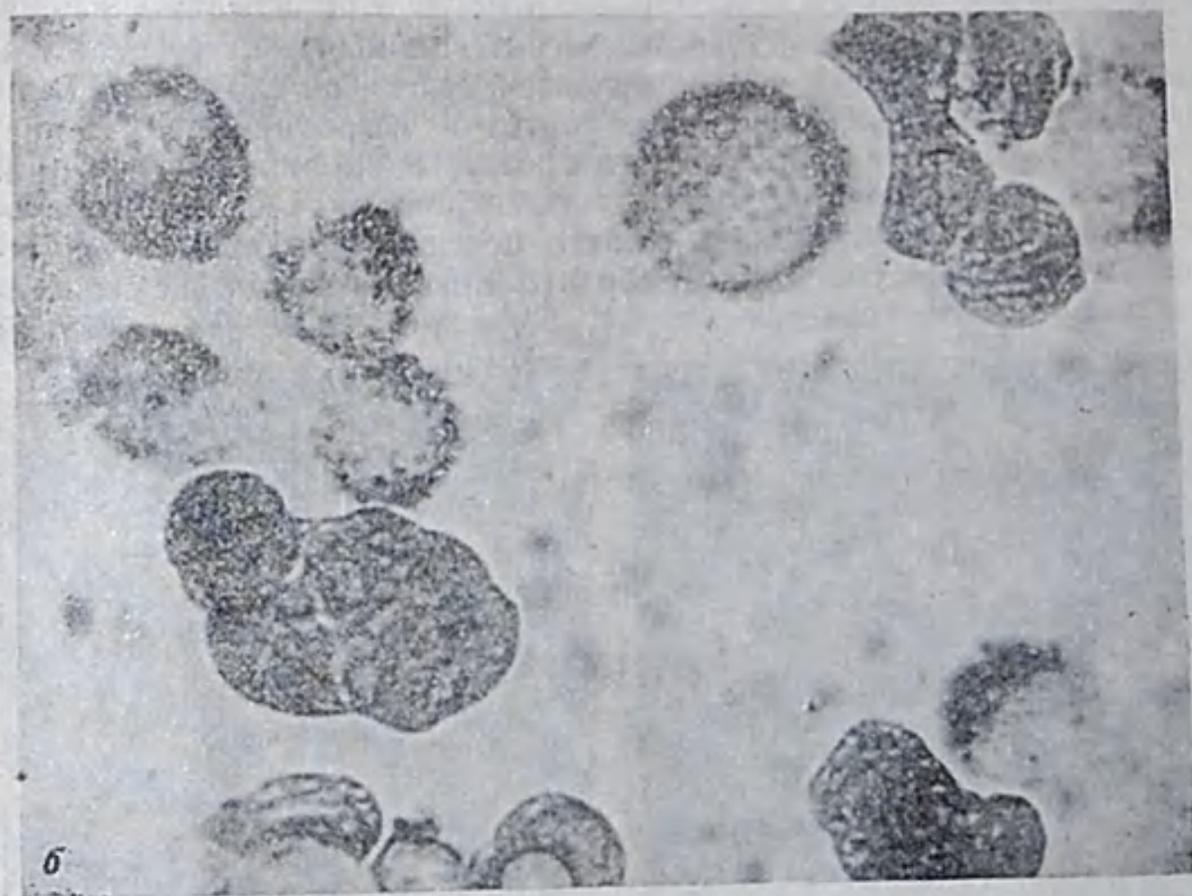


Рис. 64. Морфологическая картина нативной суспензии костного мозга крысы (а) и после замораживания — оттаивания (б)

активности, уровня дыхания, способности к пролиферации в краткосрочных культурах (рис. 64, а, б).

Доказательством жизнеспособности деконсервированной клеточной взвеси является ее пересадка летально облученным животным, у которых полностью подавлены процессы пролиферации и дифференцировки клеток миелиного ряда. Если клетки в процессе криоконсервирования сохранили свои свойства, то восстановление клеточного состава костного мозга у летально облученных животных под влиянием пересадки деконсервированной миелиной ткани начинается на 14—20-е сутки и завершается к 40—60-м суткам.

Криоконсервация гепатоцитов. Изолированные гепатоциты могут использоваться в качестве тест-клеток для исследования закономерностей трансформации ксенобиотиков и других токсических соединений, а также для лечения различных форм печеночной недостаточности.

В зависимости от вида животных, возраста, уровня функционирования микросомальной системы окисления и способа выделения объем гепатоцитов колеблется от 2 500 до 10 000 мкм³. При световой микроскопии нативные, неповрежденные клетки имеют хорошо контурируемую плазматическую мембрану (рис. 65), при нарушении целостности которой они интенсивно окрашиваются красителем. Изолированные гепатоциты *in situ* способны осуществлять глюконеогенез, гликолиз, синтез гликогена, мочевины и жирных кислот, белка и их комплексов. Процессы синтеза мочевины, глюконеогенеза, равно как синтез и деградация гликогена, влияющие на уровень глюкозы в крови, также можно отнести к важным показателям сохранения специфических свойств гепатоцитов в норме и патологии. Клетки печени характеризуются достаточно хорошо развитой мембраной цитоплазматической системы и аппарата Гольджи (50%), содержат много митохондрий

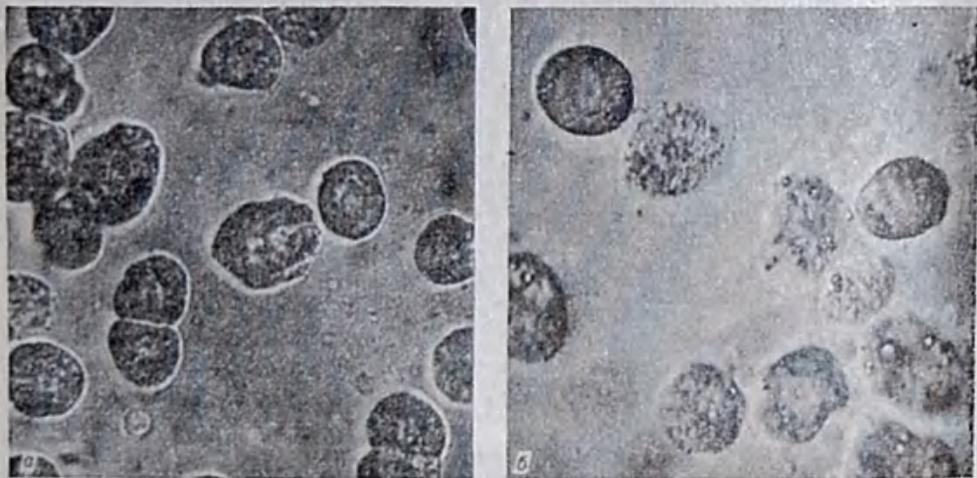


Рис. 65. Морфологическая картина нативных (а) и замороженно-оттаянных (б) гепатоцитов крысы

(~20—25 %). При нарушении целостности плазматической мембраны скорость эндогенного дыхания в клетках резко снижается, в окружающую среду элиминируют K^+ и метаболиты, а в цитоплазму свободно проникает сукцинат, который в нормальных условиях не проходит внутрь клетки.

Важной функцией гепатоцитов является их способность к обезвреживанию различных ксенобиотиков и других токсических продуктов, попадающих внутрь организма. Эти процессы осуществляются при участии микросомальной системы окисления.

Создание запасов жизнеспособных замороженных гепатоцитов в настоящее время встречает определенные трудности, так как они являются криочувствительными клетками. Поэтому пока не удается осуществить криоконсервирование гепатоцитов человека и крупных животных с высокой степенью сохранности их морфологических и метаболических свойств, присущих печени *in vivo*. Хорошие результаты пока получены при замораживании гепатоцитов мелких лабораторных животных с высокой степенью сохранности их морфологических и метаболических свойств. Увеличение количества жизнеспособных клеток в суспензии является необходимым фактором для повышения эффективности трансплантации с целью коррекции нарушенной функции печени.

В связи с необходимостью получения большого количества жизнеспособных клеток существуют методики их получения из печени. Клетки можно получать, во-первых, с помощью коллагеназы либо других протеолитических ферментов и, во-вторых, методом, основанным на комбинированном воздействии физических (вибрация) и химических факторов. Изолированные из печени гепатоциты очень чувствительны к изменению тоничности среды и действию низких температур. В таких условиях в гепатоцитах существенно нарушаются метаболизм и структура плазматической мембраны, на которой формируются везикулы, которые отделяются от мембраны и тем самым уменьшают ее эффективную площадь.

При медленном охлаждении гепатоцитов до -5°C площадь поверхности плазматической мембраны уменьшается на 35 %, а при температуре -12°C — на 45 %. При этом клетки полностью теряют жизнеспособность. Изолированные гепатоциты по-разному реагируют на добавки криопротекторов. Так, при использовании 10—20%-х концентраций растворов ДМСО функция митохондрий в целом сохраняется, хотя окислительное фосфорилирование остается на низком уровне. Среди большого числа испытанных криопротекторов (ДМСО, глицерин, метанол, ПЭГ, ПЭО, ПВП) наиболее эффективны для криоконсервации гепатоцитов 10—15%-е растворы ДМСО и глицерина. В одном из методов замораживание изолированных гепатоцитов осуществляют следующим образом: после 5 мин эквипирации с криопротектором ДМСО при 22°C суспензию гепатоцитов помещают в охлажденную баню при температуре на $1-2^{\circ}\text{C}$ ниже точки кристаллизации, а затем проводят искусственную индукцию кристаллизации. После этого клетки

замораживают до -60°C со скоростью $\sim 0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а затем быстро переносят в жидкий азот. При таком режиме замораживания в гепатоцитах сохраняется синтез мочевины на уровне примерно 50 %, хотя суммарный синтез белка составляет менее 10 % по отношению к контролю.

Существует также двухэтапная программа замораживания гепатоцитов с остановками между -10 и -20°C на 20—25 мин с последующим погружением в жидкий азот. Наиболее высокий уровень синтеза белка в клетках сохраняется, если гепатоциты замораживать с скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ под защитой 1,0 М раствора ДМСО с остановками при температурах $-12,5$ или -15°C .

При замораживании гепатоцитов по оптимальным программам количество поврежденных клеток прогрессивно увеличивается со снижением температуры. Так, при температуре -20°C повреждается 45 % клеток, а при -60°C — 70 %. В последнем случае нарушаются структура митохондрий, функция цикла Кребса, разобщается дыхание и окислительное фосфорилирование. Практически нормальную ультраструктуру сохраняют лишь около 10—20 % клеток.

Отогрев замороженных гепатоцитов лучше всего производить при температуре 37°C с последующей отмывкой в среде J-15, содержащей 1 М раствор глюкозы. При таком режиме замораживания большая часть клеток не прокрашивается красителем и сохраняет свои морфологические параметры. Однако замораживание до температур ниже $-20\text{...}-30^{\circ}\text{C}$ характеризуется формированием большого количества клеток с множественными дефектами поверхности, число которых нарастает после нескольких часов культивирования.

Одной из важных метаболических функций гепатоцитов является функция детоксикации, которую обеспечивает система микросомального окисления, и в частности ключевой фермент цитохром P_{450} . В гепатоцитах после криоконсервирования по оптимизированной программе до -30°C под защитой 1,5 М ДМСО содержание цитохрома P_{450} и НАДФИ-цитохром-с-редуктаза в микросомах изменяется незначительно, хотя связывание билирубина и синтез белков значительно нарушается и составляет всего 18 % к контролю.

Следовательно, ферменты микросомального метаболизма ксенобиотиков довольно устойчивы к действию замораживания. Вместе с тем процессы конъюгации билирубина и синтез гликогена у быстрозамороженных клеток резко снижаются после отогрева даже в присутствии стимулирующих концентраций глюкозы. Это происходит, очевидно, в результате неспецифического гидролиза гликогена под воздействием лизосомальных гидролаз. Вместе с тем если гепатоциты крыс замораживать в эмбриональной бычьей сыворотке под защитой 10%-го ДМСО, то можно применить быстрые скорости замораживания ($200\text{—}300^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и выше). В таких быстрозамороженных суспензиях повреждения ультраструктуры клеток значительно меньше, а эффективность роста размо-

роженных клеток *in vitro* составляет 80 % (6500 кг/см²), тогда как для медленно замороженных клеток этот показатель равен 25 %. У быстрозамороженных клеток процесс глюконеогенеза и синтеза мочевины сохраняется на уровне 96 %. Сейчас разрабатывают методику замораживания гепатоцитов в виде гранул. Для этого полученные ферментативным методом изолированные гепатоциты инкубируют с 1,5 М ДМСО в течение 5 мин при 0 °С (плотность клеток меньше 10·10⁶ кл/мл), а затем замораживают до —6 °С в виде капель по 50 мкл, нанесенных на охлажденную полированную алюминиевую поверхность специального блока в программном замораживателе со скоростью 5 °С/мин. После индукции искусственной кристаллизации клетки выдерживают при этой температуре 3 мин, а затем охлаждают со скоростью 1 °С/мин до —35 °С, после чего погружают в жидкий азот. Отогревают клетки при температуре 37 °С в среде, содержащей 1 М раствор глюкозы, для предотвращения термально-осмотического шока при разведении суспензии. Криоконсервация таким методом обеспечивает получение около 70 % жизнеспособных клеток, измеренных по окраске трипановым синим, хотя их метаболическая активность колеблется приблизительно на уровне 20 % (рис. 65, б).

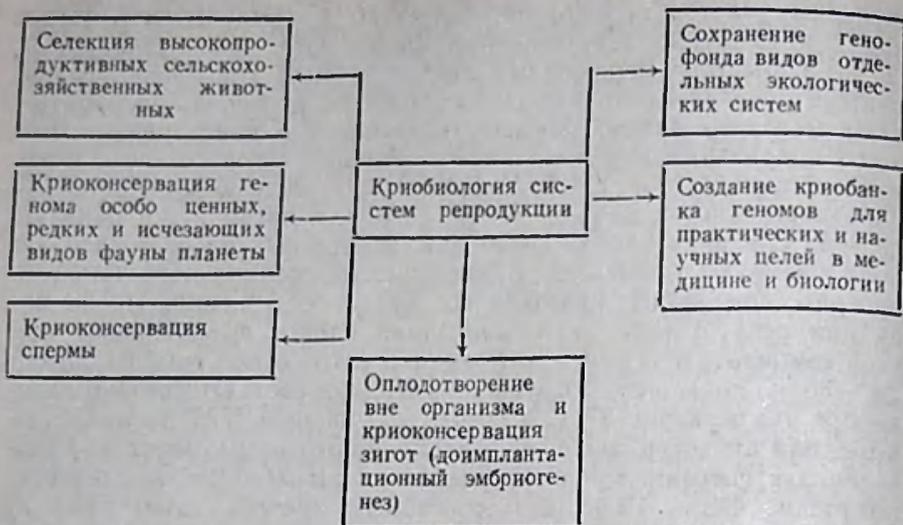
В последнее время деконсервированные гепатоциты применяют для лечения больных с различными видами поражения печени. Так, при внутриселезеночной трансплантации гепатоцитов увеличивается выживаемость у собак с индуцированной острой печеночной недостаточностью. Если, например, в течение 5 дней в контрольной группе остается в живых 33 % животных, то после имплантации криоконсервированных гепатоцитов — 75 %. Гистологическое исследование селезенки свидетельствует о том, что жизнеспособность гепатоцитов в течение 2 нед после трансплантации в паренхиме остается на довольно высоком уровне.

Область применения криоконсервированных изолированных паренхиматозных клеток печени для экспериментальных исследований и в практическом здравоохранении расширяется, поэтому в дальнейшем необходимо разрабатывать более простые методы криоконсервирования и долгосрочного хранения изолированных гепатоцитов.

Криоконсервация репродуктивных клеток животных

Успешная низкотемпературная криоконсервация зигот, яйцеклеток и спермиев животных и человека имеет большое научное, медицинское и народнохозяйственное значение, поскольку позволяет длительно сохранять половые продукты высококачественных пород сельскохозяйственных, промысловых, а также редких и исчезающих видов животных, т. е. эти вопросы имеют также большое экологическое значение.

Основные направления криобиологии в решении этих задач можно представить в виде следующих узловых проблем (схема):



Успешное низкотемпературное консервирование половых продуктов различного происхождения стало возможным в связи с открытием криозащитных свойств глицерина, ДМСО и других криопротекторов. Одним из первых объектов, замороженных под защитой криопротекторов, были сперматозоиды, которые удалось сохранить на протяжении длительного периода без потери их свойств. Это позволило создать соответствующие криобанки спермы наиболее ценных пород животных и дало возможность транспортировать ее на любые расстояния, явилось существенным достижением в сфере современного развития животноводства, поскольку обеспечило регулируемую искусственную инсеминацию миллионов голов скота.

В последнее время значительный прогресс достигнут также в области криоконсервации зигот сельскохозяйственных и других видов животных. Интерес к этой проблеме с каждым днем возрастает, поскольку появляется возможность увеличивать поголовье высокопродуктивных сельскохозяйственных животных путем трансплантации яйцеклеток, полученных от элитных животных, малопродуктивным реципиентам.

Таким образом, криоконсервация зигот открыла возможность сохранять коммерчески ценные эмбрионы крупного рогатого скота и получать многочисленное потомство, используя малоценные реципиенты для его вынашивания. В медицинской практике появилась возможность использования замороженных эмбрионов для лечения женского бесплодия.

В рамках Международного союза охраны природы в нашей стране функционирует группа по консервации геномов редких и исчезающих видов животных. С этой целью разработаны методики замораживания спермиев и эмбрионов различных животных и осуществляется их длительное хранение при температурах $-80...$

—196 °С. Так, в 1976 г. был опубликован факт получения живых телят после осеменения спермиями, подвергнутыми лиофилизации, однако эта проблема до настоящего времени окончательно не разработана.

Успехи, достигнутые в разработке методов криоконсервации зигот и эмбрионов, тесно связаны с исследованием механизмов криоповреждения и криозащиты этих клеток. Благодаря успехам в этой области в настоящее время удастся криоконсервировать с сохранением оплодотворяющей способности спермии многих видов млекопитающих, рыб, иглокожих, птиц, моллюсков, земноводных. Существенный вклад в сбережение генетических ресурсов отечественной фауны внесли профессор Б. И. Вепренцев и сотрудники, которые активно разрабатывали методы долгосрочного хранения различного генетического материала с целью его сбережения и воспроизведения. Эти разработки оказались весьма актуальными в связи с резким увеличением потерь генетического фонда фауны в последнее время.

В замороженном состоянии при температуре жидкого азота (—196 °С) такой генетический материал сохраняет свои биологические свойства в течение десятков и даже сотен лет. Например, потомство быков, сперма которых хранилась в течение 25 лет при —196 °С, развилось нормально.

Радиоактивный фон земли, как и другие источники ионизирующего излучения, оказывает сильное влияние на свойства репродуктивных клеток. Однако в условиях низких температур (—196 °С), по данным Мейзура, доза излучения, при которой выживает 37 % половых клеток, при существующем уровне радиации может быть накоплена только за 200 лет.

В природных условиях некоторые животные способны «консервировать» репродуктивные клетки и зародыши. Классическим примером так называемого бездействия яйцеклетки может быть олень. Оплодотворение у этого животного наступает в июле, яйцеклетка развивается до стадии бластоцисты и в таком состоянии сохраняется в полости матки без роста и развития до конца января. После 120-дневного периода гестации олененок рождается поздней весной, в конце апреля или начале мая. После спаривания летучих мышей осенью самки сохраняют сперму в матке или во влагалище. Спермии находятся при температуре тела животного в бездвиженном состоянии вплоть до окончания гибернации. У медоносных пчел время консервации спермиев в семенниках также довольно длительное.

Криоконсервация яйцеклеток и эмбрионов. В 1952 г. О. Смит удалось получить 1 % яйцеклеток кролика, которые оплодотворились и продолжали деление в питательной среде после замораживания и оттаивания. Таким образом, было доказано, что сверхнизкие температуры не являются несовместимыми с дальнейшим развитием яйцеклетки млекопитающих.

Одной из наиболее важных особенностей яйцеклеток млекопитающих является ее размер. Яйцеклетки по сравнению с другими

видами клеток имеют достаточно большие размеры, которые зависят от природы животных. У мышей они не превышают 70—80 мкм, а у овец и свиней достигают 130—150 мкм. Яйцеклетки хорошо гидратированы и содержат две оболочки — типичную плазматическую мембрану и внеклеточную оболочку, так называемую *zona pellucida*. В цитоплазме клеток содержатся ядро, митохондрии, лизосомы, хорошо развитый эндоплазматический ретикулум, много белковых и липидных включений (желток), а *zona pellucida* обогащена кислыми и нейтральными мукополисахаридами. В итоге слияния спермия и яйцеклетки на ранней стадии образуется многоклеточный зародыш, который представляет собой бластулу. После начала синтеза ДНК, РНК и белка начинается деление до стадии 2, затем 4, 8, 16, 21, 44—132 бластомеров, формируются морула и, наконец, бластоциста.

Работы по криоконсервации зигот, яйцеклеток, эмбрионов животных и человека получили интенсивное развитие лишь в начале 70-х г., когда удалось успешно заморозить эмбрионы мыши под защитой ДМСО.

Цитоплазма яйцеклеток, зигот и эмбрионов способна значительно переохлаждаться относительно внеклеточной среды, что связано с отсутствием в клетках активных центров кристаллизации и

свойством клеточных мембран препятствовать проникновению кристаллов внеклеточного льда. При росте внеклеточных кристаллов льда вне клетки концентрация осмотически активных веществ повышается, в результате чего на границе клетки с внешней средой появляется осмотический градиент, что приводит к дегидратации клетки. Степень дегидратации эмбрионов мышей в значительной мере зависит от концентрации солей в среде, температуры и времени экспозиции. Так, например, в 7,5 М растворе NaCl при температуре 37 °C объем яйцеклетки изменяется за 30 с на 40 % (рис. 66), а при снижении температуры до 0 °C темпы обезвоживания клетки существенно уменьшаются. Чем выше концентрация внеклеточного раствора, тем в большей степени клетка сжимается. Этот процесс будет протекать до тех пор, пока не уравнивается осмотическое давление между внутри- и внеклеточной средами.

На объем клеток значительное

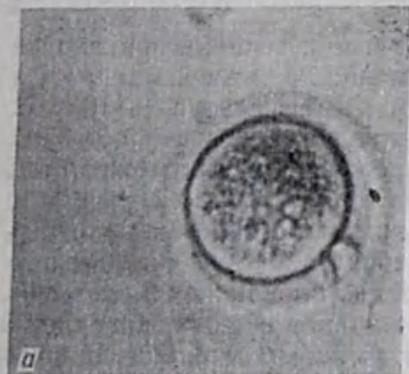


Рис. 66. Изменение объема яйцеклетки мыши в растворе (а) и инкубации при 37 °C (б)

влияние оказывают криопротекторы и температура. Объем яйцеклетки уменьшается под действием гипертонического раствора глицерина в меньшей степени при 4°C, чем при 22°C. Это происходит потому, что мембраны эмбриональных клеток, ооцитов и яйцеклеток экспериментальных животных значительно менее проницаемы для молекул воды при 4°C, чем мембраны других видов клеток животных.

При эквивалентности яйцеклеток в средах с криопротектором их объем изменяется в два этапа. На первом — клетки уменьшаются в объеме за счет выхода из них воды, на втором — концентрация веществ, растворенных вне и внутри клетки, выравнивается, в результате чего она выравнивает свой объем. Так, первый этап в среде 5%-го раствора ДМСО протекает за 60 с, а в 15%-м растворе — за 30 с. Процесс восстановления объема клетки при переносе ее в изотонические условия в первом случае завершается за 5 мин, во втором — за 2 мин.

Изменение объема яйцеклеток в зависимости от температуры происходит по-разному. Клеточный объем яйцеклетки мыши при 2°C изменяется более плавно и процесс дегидратации оканчивается примерно через 1—1,5 ч (рис. 66). При комнатной температуре этот процесс протекает значительно быстрее, однако дегидратация сопровождается более выраженными нарушениями. Из этого следует, что клетки с низкой проницаемостью для воды, высоким энергией активации этого процесса должны охлаждаться с более медленными скоростями охлаждения. Значительное переохлаждение эмбрионов при быстром снижении температуры может привести к формированию внутриклеточного льда, и в этом случае повреждение клеток произойдет в результате объемного расширения кристаллов льда (рис. 67). Поэтому для снятия переохлаждения яйцеклеток и эмбрионов на практике используют метод индуцированной кристаллизации.

Криоконсервация эмбрионов мышей. Для криоконсервации эмбрионов мышей при температуре —196°C обычно медленно прибавляют 1,5 М раствор ДМСО к клеткам при температуре 0°C, а затем со скоростью 1°C/мин либо медленнее замораживают до —80 или —196°C. При отогреве (37°C) отмывают криопротектор. При модифицированном способе наиболее высокая выживаемость эмбрионов сохраняется, если их выдерживать перед замораживанием в 0,1 мл среды Дюльбекко с 10%-м ДМСО и охлаждением со скоростью 0,5°C/мин. Иногда замораживают эмбрионы мыши под защитой этиленгликоля, хотя результаты криоконсервации очень не стабильны.

Криоконсервация яйцеклеток и эмбрионов кроликов. В 1953 г. было установлено, что оплодотворенные клетки кролика, хранящиеся при 10 и 0°C на протяжении 48 и 72 ч, могут сохранять оплодотворяющую способность на уровне 37—11% случаев после переноса их в фаллопиевы трубы.

Методика криоконсервации эмбрионов кролика породы шиншилла подобна криоконсервации эмбрионов мышей. Оптимальная

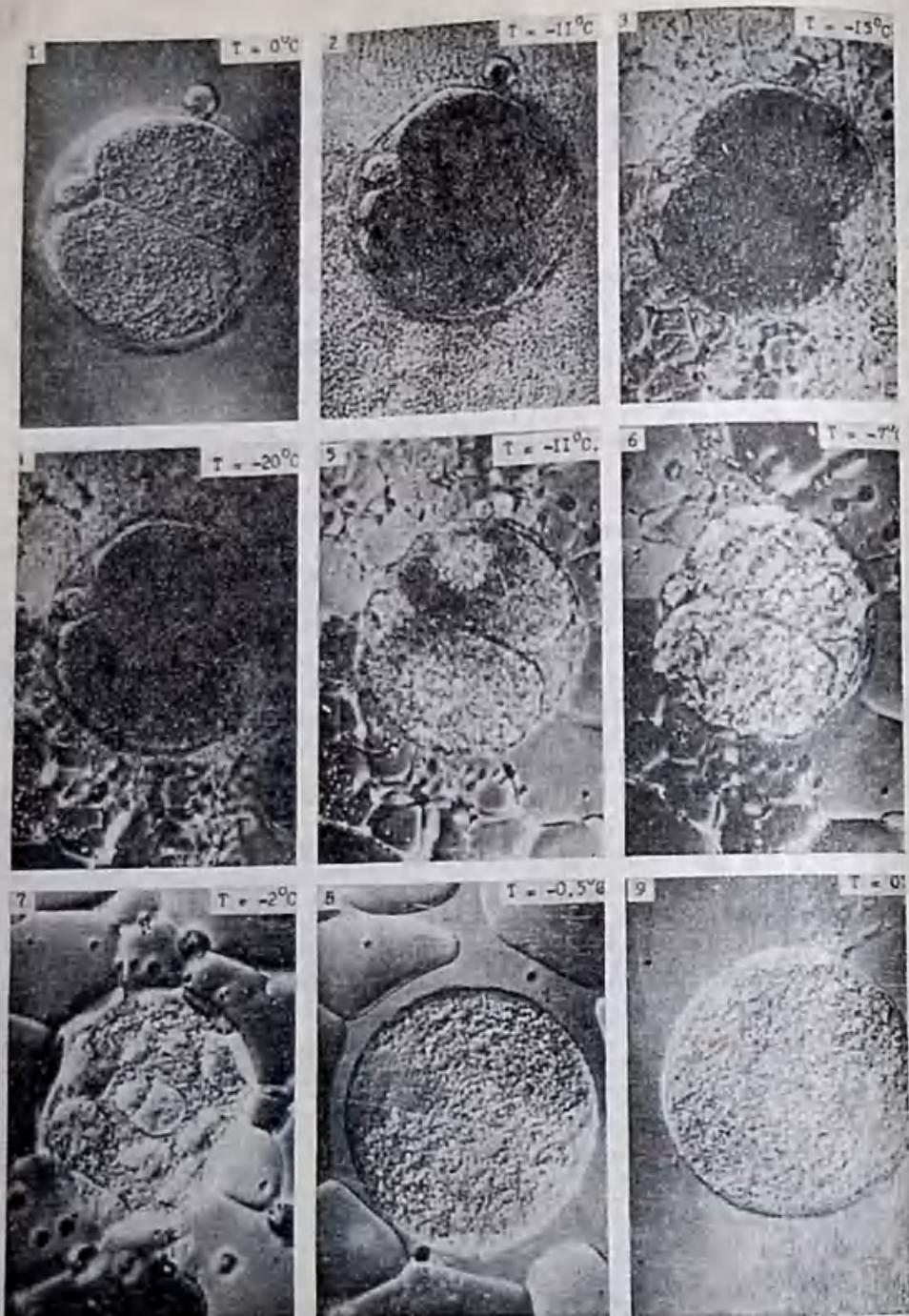


Рис. 67. Структурные повреждения эмбриона мыши на стадии 2-бластомеров при замораживании до различных температур (1—9)

скорость замораживания эмбрионов, предварительно инкубированных в среде Дюльбекко ДМСО при 0 °С и после ступенчатого добавления криопротектора до конечной концентрации 1600—1900 мосм, составляет при 1 °С/мин до —80 °С с последующим переносом в жидкий азот. Искусственная инициация льдообразования в этом случае производится при —5 °С, а отогрев со скоростью 5 °С/мин — до —5 °С, после чего эмбрионы перемещают в водяную баню при 37 °С. После размораживания криопротектор удаляют с помощью гипертонического раствора Дюльбекко.

При криоконсервации ранних морул новозеландских кроликов в среде Рангера или Дюльбекко используют охлаждение со скоростью 1 °С/мин до —76 или —80 °С с последующим переносом в жидкий азот и размораживанием от —80 до 0 °С со скоростью 4 °С/мин. Такая методика позволяет сохранить 24—82 % жизнеспособных клеток, которые в 33 % случаев развивались в культуре *in vitro*. Если в среду Дюльбекко дополнительно ввести 50 % кроличьей сыворотки, сохранность эмбрионов после криоконсервации увеличивается до 84—92 %. Оттаивание обычно производят со скоростью 8 °С/мин, а криопротектор удаляют ступенчато в 4 приема. Если после краткосрочного культивирования 85 % сохранившихся эмбрионов трансплантировать в матку псевдобеременных животных, то можно получить в 34 % случаев развитие эмбриона.

Если замораживать 8-клеточные эмбрионы кролика по такой методике, то это позволяет в 65 % случаев получить развитие клеток *in vitro* и продлить их жизнеспособность до стадии бластоцисты. Лучшие результаты в этом случае могут быть получены при использовании 1,6—1,9 М раствора ДМСО и предварительной эквивибрации клеток при 0 °С в течение 30 мин. При подготовке к криоконсервации морулы время экспонирования должно быть сокращено до 15 мин. Наиболее высокую сохранность эмбрионов после их криоконсервации можно получить на стадии морулы — 82 %. Для этого клетки помещают в забуферную среду Кребса-Рингера, содержащую белок сыворотки теленка в количестве 5 мг/мл и 5,5%-й раствор глюкозы.

Добавление ДМСО к эмбрионам осуществляют ступенчато при комнатной температуре, а замораживают со скоростью 0,2—0,5 °С/мин до температуры —25 °С, при которой их выдерживают в течение 15 мин перед погружением в жидкий азот. Инициацию кристаллизации лучше всего проводить при —7 °С. Максимальная выживаемость эмбрионов обычно наблюдается при скорости отогрева ~656 °С/мин. При осуществлении процесса криоконсервации эмбрионов мыши и кролика режимные параметры могут изменяться в зависимости от стадии их развития (табл. 36).

В последнее время для замораживания эмбрионов экспериментальных животных используют различные витрифицирующие среды. Например, эмбрионы кроликов на стадии 1—2—8 и 16 бластомеров, а также на стадии морулы или ранней бластоцисты помещают в витрифицирующую среду, содержащую 30%-й раствор 1,2-пропандиола и 30%-й раствор глицерина (среда I). Сре-

Таблица 36. Режимные параметры криоконсервации эмбрионов мыши и кролика в зависимости от стадии развития

Параметр криоконсервации	Мыши	Кролики	
	8-бластомеров	8-бластомеров	Морула
Размер эмбрионов, мкм	70	120	120
Концентрация ДМСО, М	1,0	1,6	2,0
Время, эквивалентности с ДМСО при 0 °С, мин	30,0	30,0	10,0
Температура кристаллизации, 0 °С	-3,5	-5,0	-7,0
Скорость охлаждения — 10... — 60 °С, °С/мин	0,4	1,0	1,1
Скорость отогрева в интервале — 10... — 60 °С, °С/мин	4,0—25,0	1,0—15,0	17,0
Тоничность среды разведенной фосфатно-солевым буфером	Изотонический р-р	Гипертонический р-р	Гипертонический р-р
Температура среды разведения, °С	0	37	37
Развитие <i>in vitro</i> , %	70	65	83
Рождение, %	2	15	26

да II содержит 35%-й раствор 1,2-пропандиола и 35%-й раствор глицерина. Витрификация достигается охлаждением эмбрионов в криоконсерванте до температуры жидкого азота. Удаление криопротектора осуществляют в 1 М растворе сахарозы. Сохранность эмбрионов в среде I на стадии 1—2 бластомеров, морулы и blastocysts после замораживания в среде составляет соответственно 8—16, 83 и 79 %. Клеточные эмбрионы на стадии 1—2 и 8—16 бластомеров сохраняются после витрификации в среде II на 20,0—43,8 и 92,9 %. Хотя замораживание эмбрионов ранних стадий развития под защитой витрифицирующих растворов дает вполне позитивные результаты, применение высоких концентраций криозащитных соединений может оказывать токсическое или сильное осмотическое воздействие, в результате чего клетки погибают.

Криоконсервация эмбрионов коровы. Первая успешная пересадка 12-дневного замороженно-оттаянного эмбриона коровы была вначале осуществлена в 1973 г., а затем в 1977 г. австралийскими исследователями Дж. Билтоном и В. Муром. Эмбрионы охлаждали в стеклянных пробирках или пластиковых соломах объемом 0,25 мл со скоростью 0,4 °С/мин до —35 °С, а затем погружали в жидкий азот. Лучше всего сохранялись пробы, если их оттаивали на воздухе со скоростью 10 °С/мин. Эмбрионы на стадии ранней blastocyst (7—8 дней) лучше переносят замораживание, чем на стадии морулы.

На этой стадии эмбрионы замораживают чаще всего в среде Дюльбекко, содержащей 1,5—2,0 М раствор ДМСО и гомологичную сыворотку, со скоростью охлаждения 0,2—0,3 °С/мин. При этом обязательно проведение индуцированной кристаллизации при —6... —7 °С перед замораживанием до —196 °С. Отогрев осуществляют со скоростью 8—12 °С/мин до —10 °С, а затем в водяной бане до 25 °С.

Если глубокое замораживание бластоцист коровы производить в 1,5 М растворе ДМСО, приготовленном на фосфатном либо физиологическом растворе, то на первом этапе надо снижать температуру до -36°C со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а затем до -60°C со скоростью $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ с последующим погружением в жидкий азот. При этом можно получить 73 % жизнеспособных клеток и их приживляемость в 42 % случаев при условии, если отогреть вначале производить со скоростью $4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а затем пробы перенести в водяную баню с температурой 20°C .

При охлаждении бластоцист от 20°C до -7°C со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а до -30°C — со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и до -40°C со скоростью $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ выживаемость эмбрионов может достигать 90 %, а приживляемость — 75 %. В этом случае отогреть образцов производят следующим способом: со скоростью $8^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -35°C , а затем с той же скоростью до -10°C . При достижении этой температуры пробы следует быстро отогреть в водяной бане с температурой 37°C .

Замена ДМСО на глицерин, растворенный в фосфатном буфере с добавлением 20 % сыворотки крови теленка, позволяет получать выживаемость бластоцист на уровне 44 %. Были разработаны и другие методики консервации эмбрионов.

Криоконсервация эмбрионов коровы на криоконсерванте, в котором содержатся эмбриональная сыворотка и газообразный CO_2 , дает лучшие результаты, так как эти компоненты среды влияют на развитие внутриклеточной кристаллизации (табл. 37). Видно, что в I группе, в которой использовали среду, не обработанную CO_2 , отмечалось потемнение бластомеров, т. е. в клетках быстро развивался процесс внутриклеточной кристаллизации. Во II группе также происходило разрушение бластомеров при температурах $-2...-5^{\circ}\text{C}$ до -15°C . В III группе потемнения клеток в процессе криоконсервации не происходило, а выживаемость составляла 56 %. Это свидетельствует, что газообразный CO_2 положительно влияет на процесс внутриклеточной кристаллизации.

Таблица 37. Результаты замораживания 6—7-дневных эмбрионов коровы и влияние на этот процесс газообразного CO_2

Условия криоконсервации	Криомикроскопические данные	Жизнеспособность, %
I. Экспонирование 5 ч без CO_2 ; многоэтапное замораживание в среде Хейкса-10, содержащей 10 % эмбриональной гомологичной сыворотки и 1,5 М глицерина; отогреть со скоростью $105^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	$-45...-55^{\circ}\text{C}$ быстрое потемнение бластомеров	14,0
II. Те же, что и в I группе, + среда Дюльбекко и 20 % эмбриональной сыворотки теленка	При $-2...-15^{\circ}\text{C}$ постепенное или быстрое потемнение клеток	20,0
III. Те же, что и в I группе + эмбрионы инкубировали 5 ч в атмосфере CO_2 с 20 % эмбриональной сыворотки теленка	Отсутствие потемнений	56,0

Таким образом, замораживание эмбрионов коровы имеет специфические особенности, которые следует учитывать при разработке технологических процессов их криоконсервации.

Криоконсервация эмбрионов овцы. Отличительной особенностью воздействия низких температур на эмбрионы овцы является существенное повреждение *zona pellucida*, которое особенно выражено при криоконсервации эмбрионов ранних стадий развития. Повреждение этой зоны ведет к тому, что эмбрионы теряют способность развиваться в матке реципиента.

Поэтому наиболее целесообразно криоконсервировать эмбрионы овцы на стадии ранней бластоцисты или поздней морулы под защитой 1,5 М растворов ДМСО, которые не оказывают цитотоксического действия на клетки. По своей устойчивости к осмотическим воздействиям эмбрионы овцы близки к эмбрионам коровы, причем как у тех, так и у других это свойство снижается от более поздних стадий развития к более ранним. Поэтому при криоконсервации 8-бластомерных эмбрионов овцы ДМСО добавляют поэтапно с интервалом 5 мин при нарастающей концентрации до 1,5 М. Таким же путем, поэтапно, снижая концентрацию криопротектора до 0,25 М, его удаляют из размороженных эмбрионов.

Наиболее эффективным вариантом криоконсервации и отогрева эмбрионов овцы является использование 1,5 М раствора ДМСО, скорость охлаждения — 0,3 °С/мин до —30 °С с последующим погружением в жидкий азот и отогревом в интервале от 4 до 360 °С/мин. При этом охлаждение обязательно должно сопровождаться процедурой инициации кристаллизации при температуре в интервале —1...—7 °С, поскольку сильно переохлажденные эмбрионы быстро подвергаются внутриклеточной кристаллизации. Если инициация осуществляется при —10 °С, то развитие размороженных эмбрионов *in vitro* не происходит.

Исследование различных факторов, влияющих на сохранность эмбрионов коровы, овцы и козы при криоконсервации, показывает (табл. 38), что эмбрионы коров на стадии поздней морулы и ранней бластоцисты хорошо переносят замораживание под защитой ДМСО и глицерина, в то время как эмбрионы овец и коз выживают исключительно после криоконсервации под защитой растворов ДМСО.

Криоконсервация эмбрионов свиньи. Чувствительность эмбрионов свиньи к охлаждению очень велика и находится в обратной зависимости от стадии развития. Так, эмбрионы на стадии 8-бластомеров в значительной степени повреждаются как при медленном, так и при быстром замораживании, начиная с —10 °С, а критической температурой для них является —15 °С. Однако некоторая часть бластоцистов может сохранять свои морфофункциональные свойства даже при замораживании до —15 °С и ниже. Электронно-микроскопические исследования показывают, что значительные изменения при замораживании эмбрионов свиньи происходят в липидных вакуолях, в которых выявляются выраженные фазовые переходы и нарушение структуры мембраны.

Таблица 38. Эффективность криопротекторов при медленном замораживании до — 196 °С эмбрионов коров, овец и коз

Концентрация криопротекторов, М	Стадия развития, дней	Результат
ОВЦА		
ДМСО — 1,5	Морула и ранняя бластоциста (5—6)	Родились ягнята
Сахароза, 0,3	Бластоциста (10—13)	<i>In vitro</i> не развился ни один эмбрион
КОРОВА		
ДМСО	Бластоциста (10—13)	Родился теленок
2,0	Морула и ранняя бластоциста (7—8)	Развитие <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>
1,5		
Глицерин, 1,0	То же	То же
КОЗА		
ДМСО, 2,0	Бластоциста (7)	Ограничение развития <i>in vitro</i>
Глицерин, 1,0		Отрицательные результаты <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>

Криоконсервация эмбрионов обезьян. Имеется сообщение об успешном рождении потомства после криоконсервации и переноса эмбрионов у бабуинов. Для этого была использована методика, разработанная для криоконсервации эмбрионов человека. Эмбрионы бабуинов на стадии 8-бластомеров или морулы переносили в модифицированную среду Тироде, содержащую 20 % инактивированной сыворотки крови из пуповины плода человека и 1,4 М раствора глицерина. После трехступенчатой эквilibрации в этой среде в течение 20 мин эмбрионы охлаждали со скоростью 2 °С/мин до —7 °С. После 5-минутной остановки инициировали кристаллизацию и эмбрионы замораживали до —30 °С со скоростью 0,5 °С/мин. Через 15—30 мин экспозиции при этой температуре контейнеры перенесли в жидкий азот. Оттаивание проводили в водяной бане при 20 °С в течение 10—15 с. Через 1 ч после оттаивания осуществляли перенос эмбрионов синхронизованным самкам-реципиентам. Опыт показывает, что при такой методике у одной из шести обезьян наступала беременность, закончившаяся рождением живого полноценного плода.

В результате проведенных исследований и прикладных разработок сформулирована принципиальная схема глубокого замораживания эмбрионов животных, которая предусматривает соблюдение нескольких обязательных процедур:

— получение и хранение эмбрионов при комнатной температуре возможно до 7 ч при условии, если эмбрионы инкубируют в фосфатной буферной среде Дюльбекко;

— эквilibрация эмбрионов при комнатной температуре раствором ДМСО должна осуществляться в три этапа по все возрастной концентрации криопротектора и выдерживании в этих рас-

творах определенное время: на первом этапе — выдерживание в растворе 0,5 М ДМСО на среде Дюльбекко в течение 10 мин, на втором — в 1,0 М ДМСО — 10 мин и на третьем — в 1,5 М ДМСО — 20 мин;

— охлаждение со скоростью $\sim 1^\circ\text{C}/\text{мин}$ от комнатной температуры до -6°C с последующей искусственной инициацией кристаллизации при $-6\text{...}-7^\circ\text{C}$ путем локального охлаждения стенки ампулы;

— замораживание со скоростью $0,3^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -36°C , затем до -60°C со скоростью $0,1^\circ\text{C}/\text{мин}$ и погружение в жидкий азот при -196°C ;

— медленное оттаивание со скоростью $4\text{—}25^\circ\text{C}/\text{мин}$ от -65 до -10°C , затем погружение в водяную баню с температурой 20 или 37°C ;

— удаление ДМСО путем ступенчатого разведения в средах с уменьшающейся концентрацией ДМСО по схеме: $1,5\text{ М} < 1,25\text{ М} < 1,0\text{ М} < 0,75\text{ М} < 0,5\text{ М} < 0,25\text{ М}$ и выдержкой эмбрионов по 10 мин на каждом этапе;

— перенос клеток в среду Дюльбекко на 20 мин для полного удаления из них криопротектора.

Криоконсервация ооцитов и эмбрионов человека. В клинической практике лечения бесплодия используются нативные или криоконсервированные спермии человека, ооциты и эмбрионы. Необходимость криоконсервации и длительного хранения в условиях криобанков указанных выше биообъектов связана с целым рядом клинических, моральных, этических и юридических факторов.

При этом можно осуществлять оплодотворение ооцитов спермой *in vitro* либо трансплантировать эмбрион на стадии дробления в матку реципиента. Экстракорпоральное оплодотворение является единственной эффективной мерой при трубном бесплодии у женщин.

Показаниями для проведения оплодотворения *in vitro* является бесплодие при ановуляции, выраженном спаечном процессе, риске передачи наследственных болезней женщиной, патологии цервикальной слизи, наличии антител к спермиям или неблагоприятном воздействии слизи на их жизнеспособность и др. Работы в области криоконсервации ооцитов и эмбрионов человека сложны, трудоемки и находятся в стадии своего развития.

Для защиты ооцитов и эмбрионов человека от разрушительного действия низких температур, как правило, применяются 1,0—1,5 М растворы глицерина, ДМСО, этиленгликоля и 1,2-пропандиола. Явное предпочтение отдается ДМСО, применение которого обеспечивает более устойчивые результаты. Обнаружено, что лучше всего выживают при замораживании эмбрионы человека на стадии 4—8-бластомеров.

В 1983 г. была получена первая успешная беременность после переноса замороженных — оттаянных эмбрионов человека в матку. Ооциты легче переносят замораживание, чем эмбрионы. Эти клетки на ранних стадиях развития обладают высокой осмотической

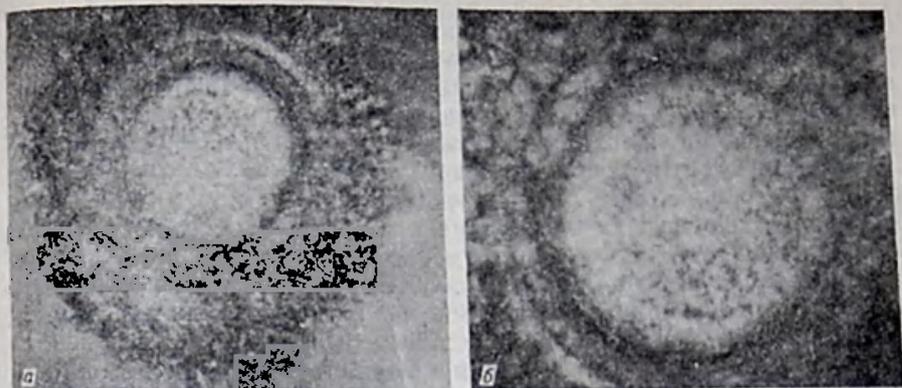


Рис. 68. Ультраструктура нативного ооцита человека (а) и после замораживания до -196°C под защитой 15 %-го раствора глицерина (б) ($\times 50\,000$)

резистентностью. Ооциты и эмбрионы человека ранних стадий развития криоконсервируют примерно по тем же принципам, которые разработаны и для аналогичных клеток лабораторных и сельскохозяйственных животных. Например, ооциты человека после 15-минутной эквilibрации при 0°C в 1,5 М растворе ДМСО, растворенном в 0,1 мл среды Дюльбекко, замораживают в 5 этапов. Первый — после постепенного охлаждения до -7°C , где осуществляют индуцированную кристаллизацию с температурной остановкой на 15 мин, затем охлаждают до -35°C со скоростью $0,3\text{--}0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ с последующим погружением в жидкий азот. После размораживания ооциты осеменяют спермой донора и после начала дробления на стадии 6—8-бластомеров трансплантируют в матку. Однако после глубокого замораживания ооцитов, сохраняемых на протяжении 2—6 мес в жидком азоте, большая часть размороженных клеток после инсеминации *in vitro* спермой не развивается до нужной стадии, в результате чего имплантация таких эмбрионов в матку женщинам дает очень низкий процент приживаемости (рис. 68).

Дальнейший прогресс в этой области криобиологии был достигнут благодаря глубоким исследованиям механизмов криповреждения и криозащиты ооцитов и эмбрионов различных животных, что позволило подойти к решению проблемы криоконсервации этого биоматериала на основе использования таких сложных витрифицирующих растворов, как смеси высоких концентраций ДМСО, ацетамида, 1,2-пропандиола, а также производных этиленгликоля, которые при замораживании формируют мелкозернистые кристаллы льда. При использовании подобного рода смесей скорость замораживания уже не играет такой решающей роли, как процесс отогрева, который должен быть достаточно быстрым, чтобы предупредить развитие процессов рекристаллизации. Поэтому отогрев клеток, замороженных под защитой витрифицирующих растворов, должен осуществляться со скоростью не менее $500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

В настоящее время имеются сообщения, что замороженные эмбрионы человека с учетом последних достижений, полученных при изучении механизмов криповреждений и криозащиты на других видах клеток, позволяют получать эффект в 7 случаях из одиннадцати трансплантированных криоконсервированных эмбрионов.

В 1984—1986 гг. сообщено о двух беременностях, наступивших после трансплантации криоконсервированных эмбрионов человека, причем в одном случае беременность двойней. Использование криоконсервированных репродуктивных клеток и эмбрионов человека, создание криобанка этих биообъектов открывает новые возможности для реальной помощи многим женщинам, еще и сегодня часто относящимся к группе абсолютно бесплодных. Совершенствование методов криоконсервации, разработка методики донации ооцитов и эмбрионов, коррекция гормонального статуса бесплодных женщин помогут многим из них перейти в группу излеченных, что является важной задачей криобиологии систем репродукции.

Криоконсервация спермы. Криоконсервация спермы животных имеет большое практическое значение для искусственного осеменения и качественного увеличения ценных пород животных.

Исследования по криоконсервации спермы ведутся с 1907., когда И. И. Иванову удалось заморозить спермии жеребца до -15°C с последующим восстановлением оплодотворяющей способности. После того как в 1972 г. было зарегистрировано открытие советских ученых И. И. Соколовского, В. К. Милованова и И. В. Смирнова о возможности сохранения генетического аппарата спермиев после замораживания, криоконсервация спермы стала использоваться как промышленная технология. Разработанная в 80-х годах харьковская технология внедрена в работу многих племенных предприятий. Она позволяет проводить все мероприятия по подготовке, взятию, обработке, замораживанию, хранению и использованию спермы по «закрытому» типу, т. е. исключая контакт спермы с внешней средой. Использование для этой цели обливанных гранул вместимостью 0,1—0,5 мл обеспечивает высокий санитарный, технический и экономический уровень.

Спермий (сперматозоид) представляет собой нитеобразную структуру, в которой различают головку, содержащую главным образом концентрированный ядерный материал, и акросому, шейку, тело и хвост (рис. 69). В этих частях спермиев находится много митохондрий, обеспечивающих энергией клетку, и сократительных фибриллярных белков, позволяющих ей передвигаться в спермальной жидкости, имеющей сложный белковый и липидный состав и содержащей микроэлементы, антитела. Все фрагменты спермия покрыты типичной мембраной, в которой сосредоточены липиды и холестерин, нонтранспортные и ферментные белки, регулирующие метаболизм и физиологические функции клетки. Шейка спермия и особенно акросома являются весьма чувствительными зонами к осмотическим и температурным воздействиям, замораживанию, так как покрыты неустойчивой тонкой мембраной. На физиологическое состояние спермиев большое влияние оказывают рН среды и тем-

пература. Как повышение, так и понижение этих показателей снижают подвижность клеток.

Процедуру криоконсервации спермиев, например, быка проводят с использованием быстрых режимов охлаждения во фруктозо-цитратно-желточной среде с глицерином и антибиотиками. Сейчас создаются криозащитные среды, которые позволяют после эквilibрации при температуре 4°C в течение 4–6 ч непосредственно переносить контейнеры со спермой в жидкий азот.

Получены хорошие оплодотворяющие результаты при использовании криоконсервированной спермы барана, хряка, жеребца и ряда других животных. Особо важное значение приобретает разработка методов длительного хранения спермы животных в глубоком замороженном состоянии для сохранения генофонда редких и исчезающих видов. Создание криобанков спермы преследует цель не только сохранять численность вида, но и поддерживать его генетическое разнообразие, необходимое для обеспечения стабильности вида. Принципиально цикл криоконсервации спермы включает следующие основные этапы: оценка качества и количества эякулята, разбавление спермы криоконсервантом, эквilibрация, замораживание в расфасованном виде, хранение и отогрев.

Оценка качества и количества эякулята. Поскольку конечный результат криоконсервации спермиев во многом зависит от качества исходной спермы, в ней должно быть не менее 70 % клеток, обладающих активным поступательным движением, причем после добавления криоконсерванта этот показатель должен снизиться не более чем на 15 % (табл. 39). Это является первичным показателем качества клеток, цитотоксичности криопротектора или криоконсерванта при правильно проведенном этапе его добавления к сперме (табл. 40).

Разбавление спермы криоконсервантом. Эта процедура осуществляется в зависимости от применяемого способа при температуре $37, 33$ или 5°C . Защитная смесь добавляется очень медленно и с должной предосторожностью с целью предупреждения развития осмотического шока клеток. В сперме быков, криоконсервированных и облицованных гранулами объемом 0,3 мл, после оттаивания

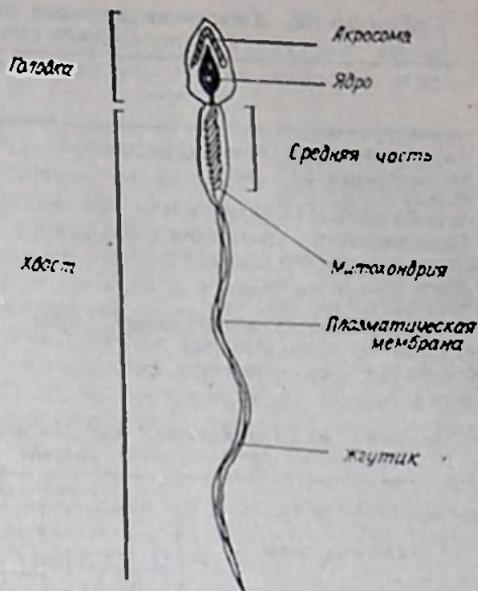


Рис. 69. Схема строения сперматозоида

Таблица 39. Допустимые первичные показатели спермы, предназначенной для глубокого замораживания

Показатель	Сперма быка	Сперма барана
Активность при получении, баллы	7,5	8,0
Концентрация 10°, мл	0,5	2,4
Живые спермии, %	75	80
Патологические спермии, %	18	14
Время редукции метиленовой сини, мин	5—11	3—7
Выживаемость при 38—40°С, ч	7	10
Объем эякулята, мл	2,0	0,5
Резистентность, усл. ед.	2,0	2,0
Активность перед замораживанием, баллы	6,0	7,0
pH свежеполученной спермы	6,0—6,8	6,0—8,0
Количество микроорганизмов, тыс.	5	5
Coli-титр	11	0

Таблица 40. Традиционный состав криоконсерванта для замораживания спермы

Компонент среды	Форма сред, используемых при разбавлении			Полимерные соломинки
	Гранулы не-облицованные	Гранулы облицованные с двухэтапным разбавлением		
		I вариант	II вариант	
Вода дистиллированная, мл	1000	630	1000	1000
Лактоза, г	115	70	60	80,5
Фруктоза, г	—	—	—	12,0
Рафиноза, г	—	—	—	1,8
Гидрат лимоннокислый, г	—	—	14,0	2
Сульфат магния, г	—	—	—	0,1
Желток, мл	200,0	300,0	—	200,0
Спермосан-3, усл. ед.	—	—	—	750 000
Глицерин, мл	50,0	70,0	50,0	50,0
Тетрациклин, усл. ед.	—	75 000	70 000	—

вания должно быть не менее 50—40 % активных спермиев. Концентрация спермиев в замораживаемом объеме влияет на результат криоконсервации. Например, для спермы человека минимальная концентрация должна быть не ниже 40 млн/мл, поскольку снижение числа клеток ухудшает процесс замораживания — оттаивания.

Эквилибрация спермы. Этот этап осуществляют при температурах 4—5°С, позволяющих адаптировать спермии к низким положительным температурам. Спермии некоторых видов животных весьма чувствительны к взаимодействию с криопротектором. Например, добавление к спермиям петуха более 2 % глицерина лишает их оплодотворяющей способности еще до замораживания. Это связано не столько с псевдотоксическим действием глицерина, сколько с резким изменением осмотического давления. Поэтому глицерин в составе криоконсерванта вводят путем его подслаивания под сперму при температуре 5°С и эквilibрируют 18—20 ч. Сейчас разработаны компенсированные среды, содержащие в

1,4 раза более высокую концентрацию осмотически активных компонентов по сравнению с изоосмией, в частности сахара, что позволяет одномоментно разбавить сперму, а эквilibрацию сократить до 6 ч.

Расфасовка спермы в упаковку и ее замораживание. Замораживают сперму в ампулах, соломинках, гранулах и минитюбиках. Форма упаковки оказывает влияние на скорость замораживания спермы, которая наиболее высока при использовании искусственных гранул. В течение первой минуты температура в них снижается в среднем на $29,3^{\circ}\text{C}$, в течение второй — на $48,7^{\circ}\text{C}$, в начале третьей — на 2°C , в дальнейшем до -79°C температура не изменяется. Самое медленное снижение температуры спермы отмечается при ее замораживании в тонкостенных полиэтиленовых капиллярах: в течение первой минуты — на 10°C , второй — на $7,5^{\circ}\text{C}$, а в последние 2 мин — на 40°C . В последующем для достижения температуры -110°C необходимо охлаждение в течение 8 мин. Если в гранулах процесс криоконсервации завершается за 2—3 мин, то в капиллярах — за 5,0—5,5 мин.

Замораживание спермодоз обычно осуществляется с помощью автоматических устройств с использованием в качестве хладагента сухого льда (-39°C) или жидкого азота (-196°C).

Оттаивание. Процесс отогрева осуществляется чаще всего на водяной бане при ее температуре $40-42^{\circ}\text{C}$. При быстром отогреве обычно удается избежать развития рекристаллизационных процессов.

Все стадии цикла криоконсервации имеют особенности для конкретного вида спермы и используемого криозащитного вещества.

Криоконсервация спермы быка. В 1951 г. Д. Стюартом впервые был получен теленок от коровы, осемененной спермой с помощью 16%-го раствора глицерина. Затем С. Полдж и Л. Роусон в 1952 г. разработали метод длительного хранения спермы, замороженной с использованием глицерина. По этой методике сперму разбавляют при температуре 28°C в соотношении 1:4 средой, состоящей из равных частей куриного желтка и 3,92%-го раствора цитрата натрия. Разбавленную сперму охлаждают при 5°C в течение 4 ч, после чего при этой же температуре к ней добавляют вторую среду в соотношении 1:1, приготовленную из 80%-го изотонического раствора цитрата натрия и 20%-го глицерина с таким расчетом, чтобы конечная концентрация глицерина составляла 10%. После 12—20-часовой эквilibрации сперму разливают в ампулы и замораживают на спиртовой бане от $-5...-15^{\circ}\text{C}$ со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и на втором этапе — от -15 до -79°C со скоростью $3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Оттаивают сперму на водяной бане при 40°C . Поскольку спермии весьма чувствительны к изменению осмотического давления, рекомендуют вводить глицерин в эякулят в составе охлажденной до 4°C гипертонической среды за 10—15 с до замораживания, что позволяет значительно улучшить результат криоконсервации. За это время криопротектор не проникает внутрь клеток, т. е. действует по типу экзоцеллюлярного вещества.

Таблица 41. Сравнительная эффективность сахаров как добавок в криоконсервант при их эквilibрации со спермиями быка

Наименование криоконсерванта	Подвижность спермиев, %
Желточно-глюкозный	26,6
Желточно-мальтозный	29,4
Желточно-сахарозный	33,4
Желточно-лактозный	37,2
Желточно-рафинозный	35,9

Среди различных сахаров, вводимых в состав криоконсерванта, предназначенного для замораживания спермы, лактоза и рафиноза обладают наиболее выраженными криозащитными свойствами по сравнению с глюкозой, мальтозой и сахарозой (табл. 41).

При указанном способе добавок в среду криоконсервации содержание глицерина может быть снижено до 3,5 %.

В соответствии с харьковским способом криоконсервации спермы быков полученную сперму вначале разбавляют лактозно-желатино-цитратно-глицериновой средой в соотношении 1 : 1, после чего добавляют безжелточный разбавитель, доводя концентрацию клеток до 10—20 млн активных спермиев в дозе 0,3 мл. Подобное разбавление получило название двухмоментного. Под трехмоментным подразумевают добавление среды в процессе оттаивания спермы.

В табл. 41 приведены компоненты, наиболее часто встречающиеся в прописях криоконсервантов для замораживания спермы. Наряду с ними в их состав включают также глюкозу, глицерин, снятое молоко, аминокислоты и трилон Б. Кроме глицерина, криозащитной эффективностью при замораживании спермиев обладают этиленгликоль, 2,3-бутандиоламин, N-метилацетамид, ДМСО, диэтиленгликоль, ПЭО-100. Криозащитная эффективность глицерина, ДМСО, ДМАЦ и этиленгликоля при замораживании спермы быков может быть повышена путем добавления в среду лактаты или сахарозы.

Криоконсервация спермы барана. Для замораживания спермы барана в 1955 г. впервые был использован 7,5%-й раствор глицерина, а в качестве среды — желточно-цитратный разбавитель. Хотя после размораживания подвижность спермиев сохранялась в пределах 30—50 %, их оплодотворяющая способность не превышала 4 %. Поэтому сейчас в состав сред замораживания включены сахара — глюкоза, рафиноза, лактоза, многоатомный спирт — маннит, молоко, глицерин, а из числа криопротекторов — этиленгликоль или ДМСО. При этом важен выбор не только криоконсерванта, но и времени эквilibрации. Поэтому при использовании глюкозо-цитратно-желточного разбавителя с различным содержанием цитрата натрия подвижность спермиев через 96 ч снижается в 2—3 раза.

Устойчивость спермиев барана к холодовому шоку выше, чем у спермиев быка. Поэтому оптимальный уровень желтка в разбавителе обычно не превышает 6 %. Для улучшения подвижности, выживаемости и оплодотворяющей способности замороженной и оттаянной спермы в криоконсервант вводят, кроме лактозы, и другие ди- и трисахара. Это обусловлено не только их метаболитическими

Таблица 42. Влияние различных сахаров на результаты замораживания спермиев барана

Сахар	Концентрация, %	Подвижность баллон	Жизнеспособность при 37 °С	Результаты осеменения		
				Осеменение маток	Объяснилось маток	Ягнение, %
Лактоза	12,3	5,0	2,25	20	11	38,0
Рафиноза	19,0	6,0	6,42	32	14	43,0
Лактоза + рафиноза	615	5,6	2,92	81	36	42,9
Лактоза + рафиноза + анализ спермы перед замораживанием	6,15	5,5	4,87	56	27	48,2

ским и энергетическим действием, но и осмотическим эффектом, направленным на снижение градиента потока воды и ионов и предупреждающим процессы набухания и разрушения клеток.

Из табл. 42 видно, что лактоза в смеси с рафинозой и предварительным анализом свежеполученной спермы барана способствует повышенной выживаемости и оплодотворяющей способности сперматозоидов. Наиболее высокой эффективностью при замораживании спермы барана обладают 4—6%-е растворы глицерина при скорости охлаждения клеток до 10—100 °С/мин. Для криоконсервации спермы барана используют также среды, содержащие желток и трис-буфер без криопротектора. Однако среды без криопротектора хотя и защищают акросому от разрушения при замораживании, но клетки теряют подвижность. Оказались также эффективными смеси 6%-го раствора ДМСО с 5%-м раствором глицерина либо 7%-го раствора глицерина с 1,5%-м раствором ДМСО.

Скорость отогрева спермы барана существенно влияет на исход ее замораживания. Если сперму под защитой 4%-го раствора глицерина охлаждать со скоростью 20 °С/мин (что является оптимальным вариантом криоконсервации) в 0,5-миллиметровых пластиковых трубках, а затем отогревать, то подвижность клеток и сохранность акросом повышается с увеличением скорости отогрева. В научно-исследовательском институте животноводства (г. Санкт-Петербург) применяют среду, состоящую из шести основных компонентов: сахарозы, комплексонов кальция, антиоксиданта, желтка куриного яйца, криопротектора и анабиотика. Сахара в этой среде составляют 80 %. Однако для криоконсервации спермы барана их содержание в среде снижают до 12 %, а комплексонов — до 0,3 %. В качестве антиоксиданта применяют обычно дитрет-бутилкрезол в количестве 0,05 г или эхинострол в дозе 0,0005 г/100 мл. Желток и глицерин составляют в таком криоконсерванте 4—5 %. Замороженная в пропиленовых соломинках либо в гранулах сперма

содержит после размораживания 50 % подвижных клеток, а для инсеминации используют образцы с подвижностью не ниже 40 %.

Криоконсервация спермы хряка. Принципиальная возможность замораживания спермы хряка с сохранением ее функциональных свойств появилась в 1970—1972 гг., когда после осеменения яйцеклеток *in vitro* было получено более 80 % оплодотворенных яйцеклеток, а затем родились поросята от самки, осеменной криоконсервированной спермой хряка. Одной из существенных причин, влияющих на результаты криоконсервации спермы этого вида животных, является секрет добавочных половых желез, который *in vivo* смешивается со спермиями и влияет на их функциональную активность.

Для уменьшения отрицательного влияния секретов добавочных половых путей на спермии эякулят подвергают обработке газообразным CO_2 либо вводят в него вещества, связывающие кислород, например соли ЭДТА, образующие с железом, медью, цинком, свинцом и ртутью устойчивые комплексы. Из числа сахаров в криоконсервант целесообразно вводить глюкозу и фруктозу, а также сахарозу и лактозу. В качестве электролитов широко применяют цитратные и трис-НСI-буферы.

В Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте животноводства разработана среда для криоконсервации спермы хряка. В ее состав входит: сахароза — 50,0 мл, глюкоза 8,0 мл, фруктоза — 2,0 мл, сульфат аммония 2,0 мл, глицерин 40,0 мл, желток куриного яйца 20,0 мл, ЭДТА 4,0 мл, тринатрийцитрат 5,5-водный 3,0 мл, трис-НСI-буфер 0,6 мл, бидистиллированная вода 1000 мл.

Спермии хряков обычно замораживают под защитой 2—4%-го раствора глицерина с использованием быстрых скоростей охлаждения. Для сохранности свойств мембраны спермиев оптимальной температурой фторопластовой пластины, на которую накапывают разбавленную сперму, является температура -85°C . Можно использовать брикеты сухого льда (-79°C), в лунки которого вносят сперму. После замораживания спермы на фторопластовой пластине или сухом льде ее переносят на хранение в жидкий азот. Единой технологии замораживания — оттаивания спермы хряков пока нет. Размораживание осуществляют дозированно, поскольку спермии хряка очень чувствительны к перепаду осмотического давления. Оплодотворяемость свиноматок, осемененных замороженно-оттаянной спермой, составляет 65—66 %.

Криоконсервация спермы жеребцов, котов и собак. Спермии кота весьма чувствительны к температурному шоку, поэтому их обычно охлаждают до 0°C в среде, содержащей яичный желток, с достаточно низкими скоростями. Замораживание проводят под защитой растворов глицерина по двухэтапной программе: вначале медленно до -15°C , а затем со скоростью 30—4 $^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -80°C .

Сперму собаки перед замораживанием обычно концентрируют до содержания $100 \cdot 10^6$ живых спермиев в 0,25 мл для того, чтобы

ресуспендировать в разбавителе, содержащем 20 % желтка и 11 % лактозы. Смесь со средой встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 23—34 мин, после чего образцы помещают в холодильник при температуре 5 °С на 90 мин для эквilibрации перед замораживанием. Встряхивание проб проводят в течение всего периода эквilibрации. Через 30 мин добавляют равный объем охлажденного до такой же температуры разбавителя, а через 60 мин в сперму вводят еще $\frac{1}{3}$ ее первоначального объема. Образцы замораживают в полистироловых соломинках или в виде гранул, которые хранят в жидком азоте. Оттаивают замороженную сперму в 0,5 мл раствора 0,9%-го хлористого натрия, нагретого до температуры 37 °С. Оплодотворяющая способность составляет 92 %.

Для криоконсервации спермы жеребца применяют среду, содержащую лактозу, ЭДТА, яичный желток, глицерин в концентрации 4 %. Как и в случае спермы собаки, сперму жеребца вначале суспендируют в цитратной среде путем центрифугирования затем ресуспендируют в указанном криоконсерванте до концентрации $50 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл. Замораживание осуществляют в поливинилхлоридных соломинках со скоростью 20 °С/мин от 20 до -15 °С и со скоростью 25 °С/мин от -15 до -120 °С. Хранят дозы спермиев в жидком азоте. После оттаивания при 75 °С, проводимого в течение 7 с, подвижность составляет 34 %. Для данного вида спермы этот результат является удовлетворительным, так как в других случаях подвижность бывает значительно ниже.

Криоконсервация спермы птиц. Возможности селекционно-генетической работы, создание банков спермы птиц для последующего использования могут быть реализованы только при разработке методов криоконсервации этих клеток. На данном этапе развития методических возможностей низкотемпературная консервация яиц птиц пока не решена.

Создание низкотемпературных банков спермы птиц в замороженном состоянии является очень важным, так как исключает необходимость завоза, карантинизации и акклиматизации птиц для получения межпородных или межлинейных гибридов. Особую роль криобанки приобретают для хранения запаса спермы от самцов исчезающих, низкопродуктивных, ценных и редких пород сельскохозяйственных и диких птиц.

В настоящее время используется главным образом два метода хранения спермы птиц: во-первых, аэробный гипотермический метод, который позволяет хранить биоматериал при температуре 2—4 °С до 4—6 ч, и, во-вторых, длительное хранение криоконсервированной спермы при температуре -78 или -196 °С.

Особенностью спермы птиц является быстрая потеря оплодотворяющих свойств как при комнатной температуре, так и при температурах, близких к 0 °С. Криоконсерванты оказывают повреждающее действие на барьерные свойства мембраны спермия петуха уже в период эквilibрации. Например, после инкубации клеток в растворах этиленгликоля в течение 1 ч при температуре 4 °С происходит нарушение калий-натриевого баланса, что отражается на

активности внутриклеточных ферментов и процессов биосинтеза и биоэнергетики.

На исход криоконсервации этих клеток оказывает влияние как состав среды, так и ее осмотичность. Обычно используется слабогипертоническая по отношению к определенному виду спермы среда. Например, у гусakov концентрация осмотически активных веществ в сперме составляет 230—280 мосм/л, а осмолярность среды должна быть в пределах 325—395 мосм/л. У петухов осмолярность спермы выше — 320—340 мосм/л и соответственно осмолярность среды должна быть увеличена примерно на 100 мосм/л за счет увеличения содержания фруктозы (на 1,8 г) или лактозы (3,6 г).

Для криоконсервации спермы птиц используют чаще ДМСО, этиленгликоль и ДМФА. При разбавлении спермы птиц добавлять криопротекторную среду к сперме необходимо постепенно, за 3—4 приема. Конечная концентрация диметилформамида в разбавленной сперме не должна превышать 5 %, а этиленгликоля — 7,5 %. Глицерин как криопротектор пока не находит широкого применения при криоконсервации сперматозоидов птиц, так как он требует удаления из клеток, что ведет к их гибели. Повреждение спермиев происходит чаще всего именно на начальном этапе эквilibрации в растворах криопротекторов, когда осмотическое несоответствие защитной среды приводит к повреждению или отслоению акросом, и хотя спермий продолжают интенсивно двигаться, однако полностью утрачивают оплодотворяющую способность еще до замораживания. Слишком быстрое охлаждение до 0 °C вызывает температурный шок спермиев и потерю их оплодотворяющей способности. Поэтому для предотвращения холодового шока мембрану клеток стабилизируют с помощью желтка либо безжелтковых сред, содержащих сахара: глюкозу, сахарозу, натрия глюконат, аминокислоты, многоатомные спирты и ряд других компонентов.

В качестве криопротектора используют этиленгликоль, глицерин, ДМСО, ДМФА и диметилацетамид. Сперму петуха выдерживают 15 мин при температуре, близкой к 0 °C, в среде, содержащей 85 частей 5%-й глюкозы, 15 частей желтка, или в безжелтковом разбавителе, состоящем из 5%-го раствора глюкозы. Обе среды содержат 7 % глицерина в конечной концентрации. Сперму, расфасованную в полиэтиленовые соломинки по 0,2 мл, замораживают путем инкубации в парах азота при температуре —110 или —120 °C в течение 5 мин и затем хранят в жидком азоте. Оттаивают сперму путем помещения соломинок в водяную баню при температуре воды 5 °C, после чего переносят в воду, нагретую до 20 °C. Подвижность спермы петуха, замороженной в желточном криоконсерванте, — 73,9 %, а в безжелточном — 85,6 %. Оплодотворяющая способность яиц в первую неделю яйцекладки достигает соответственно 52,9 и 74,0 %. В Научно-исследовательском институте животноводства (г. Санкт-Петербург) используют в качестве криопротектора этиленгликоль либо диметилацетамид.

При криоконсервации спермы гусakov применяют 10%-е растворы этиленгликоля, вводимого в среду, содержащую глюкозу,

дигидрат натрия, лимонную кислоту, снятое молоко, АТФ-динатриевую соль и воду. Сперму замораживают путем накапывания по 0,1—0,5 мл на охлажденную до $-60...-75^{\circ}\text{C}$ фторопластовую пластинку. Оттаивание гранул производят в пенциллиновых флаконах путем погружения их в воду при температуре $70-75^{\circ}\text{C}$ на 7—10 с.

Весной после осеменения гусынь внутривлагалищной дозой замороженной спермы по 0,2 мл можно получить до 78,5 % оплодотворенных яиц.

Консервация спермы рыб. Использование низких температур для консервации половых продуктов рыб позволяет решить такие важные вопросы, как, например, избирательное разведение, улучшение породы и разведение местных (региональных) видов; сохранение генофонда ценных и редких пород рыб, защита генетического материала от влияния внешних факторов среды; эффективная гибридизация рыб из разных ареалов обитания и нерестающихся в различное время года.

В связи с наружным (экстракорпоральным) оплодотворением у некоторых видов рыб защита их генетического материала зависит от состояния плазматической мембраны спермиев.

Исход криоконсервации спермиев рыб во многом определяется качеством исходного материала, правильным выбором среды, режимами консервации, деконсервации и осеменения. Традиционная добавка в криозащитные среды желтка куриного яйца оказывается полезной для осетровых, карповых и некоторых других видов рыб. При замораживании спермы лососевых и осетровых используется в качестве криопротектора ДМСО, для спермы карпа — этиленгликоль, для спермы рыб, нерестающихся в соленой воде, — глицерин. Таким образом, для каждого вида рыб необходим подбор криопротектора, а также режим криоконсервации, методика разбавления, температура и соотношения компонентов разбавителя. Так, например, к спермиям карпа и севрюги, чувствительным к осмотическому шоку, разбавитель следует добавлять медленно, а процесс разбавления лучше проводить при температуре 5°C .

Процесс охлаждения спермы рыб до -196°C имеет несколько критических этапов. Во-первых, спермии рыб весьма чувствительны к температурному шоку, поэтому на первом этапе замораживания от 5 до -10°C скорость охлаждения должна быть ниже, чем на последующем. Во-вторых, увеличение скорости охлаждения на втором этапе (ниже температуры плато кристаллизации) снижает отрицательное влияние концентрированных растворов на спермии. Преждевременное повышение скорости охлаждения нежелательно, поскольку увеличивается вероятность внутриклеточной кристаллизации клеток. Оттаивание спермы карпа лучше осуществлять в тонкостенном стакане, погруженном в воду с температурой 20°C , при постоянном перемешивании до появления жидкой фазы. Для спермы осетровых максимальное число спермиев с поступательным движением может быть получено при оттаивании в водяной бане с температурой 40°C . Для предупреждения перегрева образцов пос-

ле появления жидкой фазы дальнейшее оттаивание осуществляется в бане со льдом.

Основным тестом эффективности криоконсервирования спермиев рыб является их оплодотворяющая способность. Подвижность нативных спермиев рыб и их оплодотворяющая способность взаимосвязаны, хотя после криоконсервации подвижные спермии не всегда оплодотворяют икру. Обычно после программного замораживания сперматозоидов рыб происходит снижение скорости и продолжительности их движения, а также числа подвижных клеток. Кроме того, они становятся более чувствительны к перепаду осмотического давления среды. Поэтому при использовании криоконсервированной спермы рыб необходимо обращать особое внимание на условия оплодотворения.

Сейчас успешно используются различные среды и технологические схемы криоконсервации спермы таких видов рыб, как карп, севрюга, осетр, лосось, камбала. Созданы коллекционные производственные криобанки спермы карповых рыб, что открывает перспективу создания новых высокопродуктивных пород рыб. Проводятся исследования по криоконсервации спермиев редких и исчезающих видов рыб.

Вопросы криоконсервации икры носят пока поисковый характер и требуют дальнейших углубленных исследований.

Криоконсервация спермы человека. Попытки криоконсервировать сперму человека были предприняты более 200 лет назад. Однако эта проблема получила успешное развитие после внедрения глицерина как криопротектора в криобиологическую практику.

Основные этапы развития криоконсервации спермы человека представлены в табл. 43. Шерман в 1963 г. добился 60%-й выживаемости спермиев после криоконсервации клеток под защитой глицерина до -75°C , охладив их со скоростью $25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а затем до температуры жидкого азота (-196°C) (табл. 43).

Основным критерием эффективности криоконсервации спермиев является их оплодотворяющая способность. Сейчас инсеминация криоконсервированной спермой мужа или донора получила широкое распространение и стала реальным методом лечения бесплодия, поскольку опасения, что замораживание может вызвать генетические мутации, оказались совершенно необоснованными. Анализ 571 рождения детей после использования криоконсервированной спермы при сроках хранения до 10 лет показал, что только в 7 случаях происходили отклонения в нормальном развитии (1%), что значительно ниже средней частоты аномалий у новорожденных в общей популяции (6%).

Применение размороженных спермиев в клинической практике выдвигает ряд требований к криоконсервированному биоматериалу. Во-первых, необходимо не только обеспечить высокую подвижность спермиев после деконсервации, но и сохранить оплодотворяющие свойства. Подвижность клеток отображает в основном показатель сохранности функции митохондрий, а оплодотворяющая способность связана с ферментами акросом — образованием, кото-

Таблица 43. Основные этапы развития проблемы криоконсервации спермы человека

Исследователи, год	Результат
Спалланцани, 1876	Первые наблюдения за свойствами спермиев при низких температурах
Дженелл, 1938	Обнаружена выживаемость спермиев при -196°C и хранении при -79°C
Хонгланд, Пинкус, 1942	Создание принципа витрификации и замораживания спермиев в вене
Польдж, Смит, Паркер, 1949	Открытие свойств глицерина как криопротектора
Бунге, Кэттель, Шерман, 1953—1955	Первая беременность после использования криоконсервированных спермиев
Шерман, 1963	Консервация спермы в парах жидкого азота
Перлафт, Штейнбергер, Шерман, 1964	Получено 4 новорожденных после применения метода криоконсервации спермы в жидком азоте
Баркэей, 1982	Предложено новое устройство для криоконсервации человека
В. И. Грищенко, Ю. С. Парашук, 1982	Впервые в СССР получена беременность после использования криоконсервированной спермы

рое является очень чувствительным к действию кристаллов льда и «эффекта раствора», т. е. спермии могут обладать достаточной подвижностью, но оплодотворяющая способность их полностью подавлена.

Во-вторых, к криоконсервации репродуктивных клеток человека предъявляются повышенные требования с генетической точки зрения, поскольку ядро спермия является носителем генетической информации, передающейся будущему ребенку. Следовательно, замораживание — оттаивание не должно вызывать изменения в наборе, структуре и функции хромосом, поскольку это опасно развитием аномалий у плода. В-третьих, методика криоконсервации должна обеспечить сохранение стерильности биологического материала на всех этапах, начиная от получения семенной жидкости до ее практического применения. Это связано с тем, что семенная жидкость после деконсервации вводится во внутренние половые органы совершенно здоровой женщины и несоблюдение условий стерильности может повлечь развитие заболеваний, опасных для ее здоровья. В процессе цикла криоконсервации происходит повреждение определенной доли спермиев, поэтому уже в процессе получения эякулята и на первых этапах его подготовки, т. е. при охлаждении спермиев до околонулевых температур ($0-4^{\circ}\text{C}$), возможно развитие температурного шока. Для его предотвращения используют антишоковые компоненты в составе криопротекторных сред.

Для замораживания спермиев человека наиболее эффективным являются глицерин либо оксипирильные производные глицерина с разной степенью полимеризации, способные изменять гидрофильно-гидрофобные взаимодействия. Использование криоконсервиро-

ванной спермы для искусственного осеменения по сравнению с пассивной оказалось более рациональным и эффективным, поскольку при этом происходит селекция эякулятов. Поэтому число детей, рожденных с врожденными уродствами, после инсеминации криоконсервированной спермой в 6 раз меньше, чем после инсеминации нативной спермой.

Сейчас для консервации спермиев человека разработаны многокомпонентные криоконсерванты, включающие биокатионы (Mg^{2+} , K^+), антишоковые вещества (желток куриного яйца), регуляторы изоосмоси и рН среды (углеводы, лимонно-кислый натрий и солевые буферы), антибиотики.

При замораживании спермиев следует осуществлять искусственную холодовую адаптацию при $0-5^{\circ}C$ на протяжении 45—50 мин, что позволяет существенно повысить выживаемость спермиев в процессе замораживания.

После адаптации клеток их замораживают обычно со скоростью $1^{\circ}C/мин$ до $-196^{\circ}C$. Это позволяет получить выживаемость замороженно-оттаянных спермиев в пределах 67,7%. Спермии можно охлаждать также в два этапа: на первом со скоростью $1^{\circ}C/мин$ до $-15^{\circ}C$, экспонирование при этой температуре 30 мин и далее со скоростью $25^{\circ}C/мин$ до $-196^{\circ}C$. При таком режиме консервации отсутствуют существенные повреждения основных структурных элементов спермиев: головки, шейки, тела, хвоста и плазматической мембраны. Они имеют обычную форму и строение после криоконсервации по оптимальному режиму охлаждения с предварительной адаптацией. Типичный консервант для замораживания спермиев человека имеет следующий состав: раствор 5%-го глицерина — 1,25 мл, 3%-й раствор цитрата натрия — 4 мл, яичный желток — 4,0 мл.

Наряду с желтком в состав криоконсерванта часто вводят фолликулярную жидкость человека и АТФ.

В последнее время предложен криоконсервант, в который наряду с указанными выше компонентами введен холин — хлорид, являющийся одной из фракций лецитина. Этот препарат, благодаря наличию в его молекуле заряженной группировки и гидроксильной группы, способен достаточно прочно связывать свободную воду. Поэтому структура раствора изменяется таким образом, что он замерзает аморфно, без формирования гексагональных кристаллов льда. Холин — хлорид оказывается более эффективным при комбинированном использовании с другими соединениями (например, дитиотреитол и другие антиокислители), в том числе криопротекторами.

Сперму смешивают с криоконсервантом в соотношении 1 : 2 — 0,8 и замораживают быстро до -78 или $-196^{\circ}C$ в форме гранул или во фторопластовых соломинках. Для повышения подвижности и оплодотворяющей способности спермиев используют кофеин в концентрации 7 мМ, который добавляют к оттаянной сперме. За период с 1974 по 1979 г. при использовании кофеина беременность наступала у 69,5% женщин, а без добавления — у 55,9%.

В современной криобиологии качество спермы человека оценивают с помощью компьютерного анализа ее образцов по следующим критериям: подвижность (%), скорость движения (мкм/с), индекс движения (мкм/с), плотность подвижности ($\times 10$ мг). Подвижность спермиев человека можно определять как методом лазерной велосимметрии Доплера, так и с помощью световой микроскопии после окрашивания клеток эозинингрозином.

Клиническим тестом на оплодотворяющую способность является способность спермиев проникать в цервикальную слизь и оплодотворять яйцеклетки хомяка.

Область практического использования криоконсервированных спермиев в первую очередь относится к проблеме бесплодного брака, когда возникает необходимость искусственного оплодотворения. Показания к данной манипуляции могут быть самыми разнообразными и обусловлены патологией репродуктивных путей женщины при наличии антисперминовых антител в слизи цервикального канала, которые препятствуют продвижению спермиев в верхние отделы внутренних половых органов, и при наличии у мужчины патологической спермы с пониженным содержанием половых клеток, уменьшением степени их подвижности, увеличением числа форм с измененной морфологией.

Криоконсервация спермиев человека может носить и профилактический характер. В частности, в настоящее время существуют такие отрасли производства, как атомная энергетика, химическая промышленность с источниками излучения и токсических веществ, для работников которых желательно иметь запасы криоконсервированной аутоспермы, поскольку репродуктивные клетки очень чувствительны к воздействию лучевых факторов.

Низкотемпературная консервация микроорганизмов и низших эукариот

В настоящее время методы низкотемпературного хранения микроорганизмов все шире внедряются в сферу микробиологической промышленности, поскольку это позволяет длительно хранить полезные штаммы клеток, полученные с помощью селекции и генетической инженерии. Развитие данной области криобиологической науки имеет также большое теоретическое значение с учетом того, что микроорганизмы являются удобной криобиологической моделью для исследования механизмов криоповреждений и криозащиты клеток, поскольку среди огромного многообразия микроорганизмов имеются виды с выраженной высокой и низкой холодостойкостью.

Существует четыре основных метода консервации низших эукариот и микроорганизмов: метод высушивания, когда используются естественные и искусственные осушители (силикагель, хлористый кальций и т. д.) и штаммы клеток хранятся при пониженных температурах; метод лиофилизации, т. е. высушивание микроорга-

низмов из замороженного состояния; криоконсервация и комбинированные методы.

Высушивание под вакуумом как метод консервации микроорганизмов имеет тот недостаток, что при этом очень часто возникают генетические изменения и культуры теряют важные свойства.

Лиофилизация значительно упрощает условия хранения культур при 4°C , однако многие микроорганизмы не выживают при использовании этого метода, поскольку в процессе лиофилизации клетки многих штаммов гибнут.

Криоконсервирование — наиболее эффективный метод хранения большинства штаммов микроорганизмов и простейших. В зависимости от температуры (-196 или -80°C) микроорганизмы полностью или частично сохраняют свои свойства на протяжении от десятков до сотен лет. Метод криоконсервирования имеет тот недостаток, что для его реализации в большинстве случаев требуются программные замораживатели, специальные хранилища, в которых поддерживается необходимая температура с помощью хладагента. Например, хранение различных видов стрептомицетов при -20°C под защитой 10%-го раствора глицерина позволяет получить в 5—10 раз больше жизнеспособных клеток по сравнению с другими методами. При температурах порядка $-196...-150^{\circ}\text{C}$ также можно длительно хранить различные виды стрептомицетов, дрожжей, простейших и других бактериальных культур. Например, если жизнеспособность дрожжей родов *Sacharomyces*, *Candida* и *Bzellanomyces* после криоконсервации составляет соответственно 65,73 и 64 %, то сразу после лиофилизации — 5,13 и 2 %.

Комбинированные методы консервирования микроорганизмов предусматривают использование различных приемов, например предварительного обезвоживания клеток с последующей криоконсервацией или лиофилизацией. К таким приемам, в частности, относится иммобилизация клеток на сухих матриксах — носителях. Иммобилизованные или оптимально дегидратированные клетки микроорганизмов гораздо лучше переносят воздействие различных экстремальных факторов, в том числе и повторное замораживание, по сравнению с предварительно не подготовленными клетками. Высшие эукариоты очень плохо переносят лиофилизацию и другие виды высушивания.

Криоконсервация микроорганизмов. Разнообразное строение и химический состав микроорганизмов обуславливает широкий спектр наблюдаемых у них изменений при действии охлаждения и замораживания. Замораживание микроорганизмов вызывает в первую очередь локальные повреждения ДНК и РНК, что изменяет свойства микроорганизмов и способствует формированию мутантных форм.

Так, например, при замораживании *Sacharomyces oviformis* до $-180...-190^{\circ}\text{C}$ и оттаивании возникают мутанты с измененными морфологическими и биохимическими свойствами. Один из таких штаммов приобретает свойство осуществлять брожение при температурах $11-12^{\circ}\text{C}$ и улучшать качество виноматериалов за счет

увеличения синтеза эндогенных антиоксидантов. После замораживания *E. Coli* наблюдается фрагментация генома, что сопровождается трансформацией свойств клеток, а также деградация макромолекул РНК, которые после 1—2 нед хранения замороженных до -25°C бактерий выходят из клеток в окружающую среду. Подобные изменения свойств отдельных штаммов микроорганизмов происходят также после лиофилизации.

Наряду с характерным для всех микроорганизмов снижением функции генома в клетках очень часто нарушаются процессы эндогенного дыхания и энзиматической активности, особенно в случае неадекватных условий низкотемпературного воздействия. У дрожжей, например, происходит задержка роста, уменьшение выхода фагов, а у молочнокислых бактерий — снижение кислотообразующих свойств и дегидрогеназной активности.

Плазматические мембраны микроорганизмов так же, как и при низкотемпературном консервировании других клеток, являются первичной мишенью действия факторов замораживания. Большую роль в стабильности мембран микроорганизмов играет холестерин, локализованный в липидном слое мембран. В мембранах микроорганизмов, например *E. Coli*, обедненных холестерином, фазовые переходы липидов и латеральная сепарация белково-липидных комплексов происходят уже при 0°C , что приводит к формированию ТМД и лизису клеток. Замораживание *Tetrahymena pyriformis* до -8°C и выдерживание в течение 1 ч приводит к потере жизнеспособности более чем 90 % клеток, поскольку мембраны клеток этого простейшего содержат очень мало холестерина. Аналогичные микроорганизмы, мембрана которых содержит мало холестерина, подвергаются холодовому шоку уже при температурах, близких к 0°C .

В суспензии микроорганизмов всегда присутствуют субпопуляции чувствительных и малочувствительных к шоку и замораживанию клеток. Чувствительность или нечувствительность к температурному шоку и замораживанию прежде всего зависит от архитектоники и состава цитоплазматических мембран и степени обводненности микроорганизмов. При многократном обезвоживании-регидратации *S. cerevisiae* происходит не только снижение уровня жизнеспособности, но и потеря клетками сухих веществ, белков и фосфорсодержащих веществ (рис. 70). При этом в клетках заметно изменяется архитектоника внутриклеточных органелл и хроматина (рис. 71). Степень гидратации-дегидратации во многом зависит от состава среды и скорости охлаждения, а также длительности действия этих условий.

Повреждения плазматической мембраны после замораживания микроорганизмов проявляются прежде всего в нарушении барьерных свойств клеточных мембран, в результате чего они теряют субстраты, ионы, структурные и каталитические белки, нуклеотиды. Потеря некоторых структурных белков мембран сильно снижает выживаемость клеток. Например, замораживание — отогрев *E. Coli* сопровождается уменьшением количества антигенных детерминант на внешней мембране, а также значительным изменением

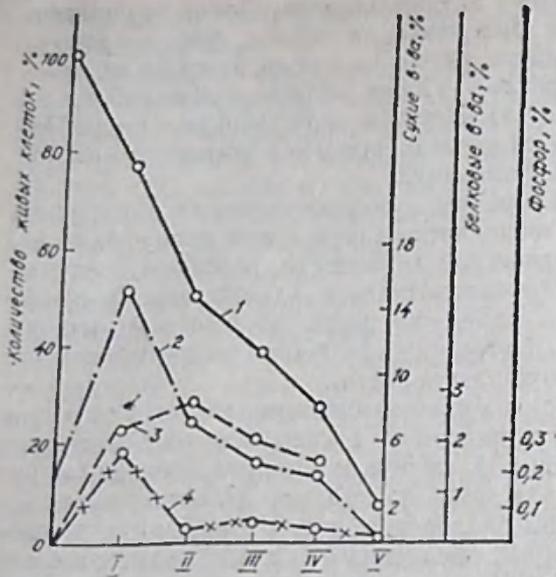


Рис. 76. Выживаемость и проницаемость дрожжей при многократном обезвоживании — регидратации:

1 — выживаемость; 2 — потери сухого вещества; 3 — потери белковых веществ; 4 — потери фосфорсодержащих веществ

молочнокислых стрептококков выражается в том, что они теряют способность объединяться в цепочки.

На жизнеспособность криоконсервированных микроорганизмов влияют различные факторы: различная организация мембраны и природа и стадия развития микроорганизмов, состав защитной среды, скорость замораживания и др. При изучении состава микрофлоры, сохранившейся в зоне вечной мерзлоты в течение очень длительного периода времени, выявлено, что в почвах доминируют в основном коринеформные бактерии, неспоровые палочки и крайне редкоактивные формы актиномицетов. Среди простых форм микроорганизмов, например бактериофагов, наряду с криоустойчивыми формами существуют и криолабильные, у которых криовоздействие вызывает необратимые повреждения мембраны и структур цитоплазмы. Высокой криоустойчивостью обладают споровые формы актиномицетов, а также примитивные микоплазмы, среди которых 17 видов и 2 рода очень хорошо переносят замораживание под защитой ДМСО или глицерина независимо от скорости охлаждения и времени хранения в жидком азоте.

Криоустойчивость *E. Coli* в очень большой степени зависит от состава ее наружной мембраны. Существуют субпопуляция *E. Coli* с цитоплазматической мембраной, чувствительной к холодовому шоку, и субпопуляция мутантных штаммов, которые в мембране содержат большое количество ненасыщенных жирных кислот, что

цитоскелетных белков. Значительные изменения при замораживании происходят также в липополисахаридном слое мембраны. Так, у *E. Coli* и лактобацилл в результате изменения липополисахаридного компонента снижается отрицательный поверхностный заряд мембраны, изменяется конформационное состояние интегральных белков, происходит потеря внутриклеточного Ca^{2+} . В результате этого повышается чувствительность микроорганизмов к действию дезоксхоласта, лизоцима и дезоксилизина. Изменение поверхностных свойств мембран



Рис. 71. Форма ядра дрожжей до (а) и после (б) обезвоживания ($\times 61\ 000$) делает их более устойчивыми к замораживанию — оттаиванию. Целлюлозный слой, входящий в состав клеточной стенки некоторых видов бактерий, также является хорошим барьером между средой и цитоплазмой и препятствует инициации внутриклеточного замерзания воды.

Микроорганизмы хуже переносят процесс лиофилизации, чем криоконсервацию. Так, криоустойчивые коринебактерии после

8-летнего хранения в лиофилизированном состоянии теряют вирулентность в половине изолятов, а из 10 культур бифидобактерий и молочнокислых бактерий сохраняют свои свойства после лиофилизации только две.

Из микроскопических грибов наиболее изученными в отношении их криоустойчивости или криолабильности являются дрожжи. Опыт показывает, что из 269 штаммов после быстрого замораживания до -196°C под защитой 10%-го раствора глицерина 255 штаммов сохраняют хорошую выживаемость с сохранением специфических свойств. Более криочувствительными видами микроскопических грибов являются *Lipomyces* и *Metschnikow*. При консервации дрожжей типов *Saccharomyces cerevisiae* и *S. vini* лучше использовать двухэтапную программу замораживания с применением глицерина либо другого проникающего криопротектора. Среди штаммов *Saccharomyces cerevisiae* выявлены криостабильные (ЛО-2, ЛС-5) и криолабильные формы (Л-1 дрожжевая, Томская-7 и др.).

Некоторые штаммы дрожжей, например 235 и 269, а также грибы — продуценты целлюлоз хорошо переносят лиофилизацию и длительное хранение. В зависимости от возраста одни и те же культуры микроорганизмов отличаются различной криочувствительностью. Например, споры стрептоцистов и дрожжей-липомитетов, в отличие от молодых культур, хорошо переносят быстрое замораживание путем погружения их в азот под защитой криопротекторов и даже без них, а также процесс лиофилизации. Значительно более криоустойчивы микроорганизмы в стационарной фазе роста по сравнению с логарифмической. Например, лактобациллы, молочнокислые стрептококки *E. Coli*, дрожжи рода *Saccharomyces* и психрофильные *Cryptococcus laurentii* достаточно криолабильны в фазе логарифмического роста.

При консервировании смешанных культур, используемых прежде всего в пищевой промышленности, следует учитывать требования, предъявляемые к каждой культуре. У многих штаммов микроорганизмов отсутствует высокая избирательность к условиям криоконсервирования, и это позволяет создавать эффективные промышленные способы хранения смешанных культур. Так, хранение лиофилизированных кефирных заквасок, включающих гомоферментативные молочнокислые стрептококки, цитратферментирующие стрептококки, лактобациллы и дрожжи, обеспечивает однородность активности всех популяций микроорганизмов, их стабильность и стандартизацию качества конечной продукции.

Для благоприятных исходов криоконсервации микроорганизмов большую роль играет метод их культивирования, поскольку более устойчивы к замораживанию те культуры, которые выращены в оптимальной для каждой из них среде и при оптимальных температурах. Например, среда МРС-1 для лактобацилл, среда с гнином-80 для хлебопекарских дрожжей и т. д. Более перспективным является такой метод консервации, при котором выращивание микроорганизмов осуществляется предварительно в более суровых

низкотемпературных условиях, способствующих их адаптивной перестройке. Так, психрофильные дрожжи *Cryptococcus laurentii* приобретают максимальную устойчивость к замораживанию — оттаиванию после выращивания их на минимальной среде в околонулевой области температур.

При выборе среды культивирования в целях повышения экономичности метода необходимо учитывать срок сохранения жизнеспособности микроорганизмов. Если методы лиофилизации музейных и производственных штаммов бифидобактерий, обеспечивающие их жизнеспособность в течение 10 лет и более, предусматривают выращивание их в печеночной среде, то для препаратов бактериальной терапии, не рассчитанных на хранение более 1 года, достаточны более дешевые и доступные среды — молочная, гидролизно-молочная и другие.

Для хорошего сохранения микроорганизмов, подвергаемых криоконсервированию, существенную роль играет плотность клеток в суспензии. Высокие концентрации клеток в суспензии ($\approx 10^{12}$ - 10^{11} кл./мл) позволяют получать выживаемость микроорганизмов после криоконсервирования и лиофилизации, близкую к 100 %.

На результаты криоконсервирования большое влияние оказывает скорость охлаждения, поскольку она регулирует уровень дегидратации, степень кристаллообразования, фазовые переходы липидов в мембранах и т. д. При охлаждении для каждого вида клеток существует своя оптимальная скорость, которая во многом обусловлена проницаемостью плазмолемы для воды, а также размерами клеток и их формой. Поскольку проницаемость мембран большинства микроорганизмов для воды низкая, хорошие результаты при их криоконсервации могут быть получены при медленных скоростях охлаждения. В случае, если при замораживании применяются криопротекторы, это расширяет диапазон допустимых скоростей охлаждения. Некоторые виды микроорганизмов, например бифидобактерии, дрожжи и шистозомулы, хорошо переносят быстрое охлаждение в присутствии 35%-го раствора этандиола или 10%-го раствора глицерина.

Более эффективными являются ступенчатые режимы замораживания микроорганизмов с медленной скоростью охлаждения на первом этапе с последующим погружением в жидкий азот. Например, такие режимы эффективны при использовании 20%-го раствора ПЭО-400 при криоконсервации водородокисляющих бактерий и микроводорослей типа хлореллы, инфузорий *Colpoda*, дрожжей. Подобный режим консервации с температурной остановкой при -30°C на 2 ч оказался также эффективным для 153 рас 15 родов дрожжей.

Для большинства исследованных микроорганизмов эффективны медленные или ступенчатые режимы замораживания, хотя при консервации с криопротекторами хорошие результаты для некоторых микроорганизмов могут быть получены и при достаточно быстром замораживании.

Криопротекторы и более сложные защитные среды являются в настоящее время основным средством предотвращения поврежденных микроорганизмов при замораживании — оттаивании. Особенно эффективны криопротекторы, которые осуществляют свое действие на коллигативной основе. Так, ДМСО, глицерин и декстран, ДМСО в комбинации с глюкозой, увеличивая количество связанной воды в замороженной суспензии клеток, сдвигают зону повреждений в область более низких температур и во многом устраняют повреждающее действие «эффектов раствора».

Растворы, содержащие глутамат и некоторые полиспирты, обладающие значительной влагоудерживающей способностью, при добавлении в среду лиофилизации повышают выживаемость молочнокислых бактерий. Присутствие вязких защитных сред, уменьшающих долю свободной воды в лиофилизированной вирус-вакцине против Ньюкастльской болезни птиц, увеличивает инфекционность вирусов. Такие мембраноактивные вещества, как диаминобутан и диаминопентан, также могут повышать жизнеспособность некоторых видов микроорганизмов при замораживании.

На практике при криоконсервировании микроорганизмов (бактерии, микоплазм грибов и др.) наиболее хорошо зарекомендовали себя растворы глицерина с различного рода добавками либо без них. Для криоконсервации фагов, микоплазм простейших, дрожжей и ряда видов грибов, спорочист, шистозом широко используют растворы ДМСО, сахараоза оказывается эффективной при криоконсервации бактерий и грибов. Другие сахара (раffinоза, маннит), не кристаллизующиеся при достаточно низких температурах, хорошо предохраняют от криповреждений различные виды дрожжей. Полимерный криопротектор ПЭО с М. м. 400 эффективно защищает криолабильные формы фагов и бактерий. Некоторые виды бактерий и дрожжей успешно консервируют под защитой 35%-го раствора этанола, который используют также в сочетании с гидролизатом лактальбумина. Для морской диатомовой водоросли наилучшие показатели жизнеспособности (50 %) получены при использовании в качестве защитных сред 2 М раствора метанола в сочетании с 1 М раствором пролина.

При лиофилизации хорошие результаты дают многокомпонентные защитные среды, включающие и криопротекторы. Так, сахарозо-желатиновая среда эффективна для защиты бактерий, сахарозо-желатиновый агар — для спор дрожжей-липомисетов. Обезжиренное молоко также с успехом используют при лиофилизации многих групп микроорганизмов, хотя оно неэффективно при консервации лучистых грибов. При лиофилизации гонококков оптимальной защитной средой является сыворотка с добавкой 5%-го инозитола, а в случае водородных бактерий — раствора альбумина. Бактериофаги сохраняют активность после лиофилизации с ПЭО-400 лучше, чем с ДМСО.

Использование различных по своему составу специфических защитных веществ селективного действия позволяет осуществлять лиофильную сушку некоторых видов микроорганизмов. Скорость и

температура высушивания при лиофилизации микроорганизмов оказывают большое влияние на их жизнеспособность. Для большинства видов оптимальными являются медленные скорости сублимации льда, которые продолжаются 48--72 ч в зависимости от температуры сублимации, хотя водородные бактерии можно замораживать более быстрыми темпами — от 8 до 10 ч при $-45\text{...}-55\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Температуру высушивания обычно выбирают достаточно низкой (ниже эвтектической области) с тем, чтобы исключить нагрев и вспенивание суспензии клеток во время сушки, т. е. в диапазоне $-30\text{...}-55\text{ }^{\circ}\text{C}$. При $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ потеря клеток молочнокислых стрептококков всегда более значительна, чем при -30 или $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. При этом необходимо в конце лиофилизации повышать температуру до $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ с целью повышения жизнеспособности бактерий.

Остаточная влажность после лиофилизации микроорганизмов в значительной степени определяет их жизнеспособность при длительном хранении. Например, при лиофилизации *E. Coli* более высокая сохранность клеток наблюдается в тех образцах, в которых удалена вся объемная и частично связанная, но сохранена прочно связанная фракция воды. Физиологические значения этих фракций воды отличаются у различных видов. Поэтому, например, для гонококков оптимальное содержание остаточной влаги может достигать не более 1 %, водородных бактерий — 2,3, а лактобацилл — 4 %. Среди различных штаммов дрожжей *Saccharomyces vini* и *S. oviformis* лучше сохраняются после лиофилизации те популяции, которые содержали больше связанной фракции воды. Поэтому необходимо сохранять остаточную влажность в дрожжах в пределах 3—4 %, при которой жизнеспособность достигает 33 %.

Лиофилизированные препараты микроорганизмов обычно хранят в атмосфере азота или вакуума, так как кислород воздуха вызывает повреждение клеточных структур. Музейные и производственные штаммы рекомендуется хранить в вакууме в запаянных ампулах, что обеспечивает многолетнее сохранение жизнеспособности. Лечебно-профилактические препараты также целесообразно хранить в атмосфере азота в герметически закрытых емкостях, хотя при этом и происходит снижение жизнеспособности микроорганизмов. С понижением температуры все физические и химические процессы в микроорганизмах, которые приводят к их повреждению, замедляются и ниже $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ практически сводятся к нулю. В почвах зоны вечной мерзлоты при температурах $-40\text{...}-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ хорошо сохраняются бактерии, морфологически подобные *Arthro-bacter* и *Corinebacterium*.

На практике чаще всего применяется искусственное консервирование при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ в жидком азоте или в его парах, что позволяет сохранять в течение длительного времени практически без потерь свойства многих бактерий, микоплазм, дрожжей и личинок трихинелл. Эффективным способом, не требующим постоянного пополнения испаряющегося жидкого азота, является хранение лиофилизированных микробных препаратов при пониженных темпера-

турах. При 4 °С хорошо выживают на протяжении до 3—5 лет споры дрожжей-липомиестов, инактивированный вирус ящура, противоящурная вакцина. Лиофилизированные винные дрожжи при 4 °С можно хранить до 3 лет. Другие виды лиофилизированных микроорганизмов не способны в течение такого срока поддерживать свою жизнеспособность.

Процесс восстановления свойств криоконсервированных микроорганизмов является чрезвычайно важным, поскольку именно в этот период проявляются полученные при охлаждении и низкотемпературном хранении повреждения. С этой целью необходимо выполнять некоторые условия, повышающие жизнеспособность микроорганизмов в деконсервационный период. Так, скорость отогрева замороженных культур микроорганизмов выбирают в зависимости от использованной скорости охлаждения. Если клетки быстро замораживали, то скорость их отогрева должна быть достаточно высокой для избежания повреждений, вызванных рекристаллизацией внутриклеточного льда. Например, после замораживания плазмодиев в составе эритроцитов со скоростью 3600 °С/мин оптимальной скоростью отогрева является 120 000 °С/мин. После замораживания шистозом в тонком слое между фольгой в жидком азоте используют отогрев за 10 с. После более медленных скоростей охлаждения, например 300—400 °С/мин, уже достаточно отогрев со скоростью 150—200 °С/мин, а для микоплазм — даже 20—30 °С/мин. Все же и после медленного охлаждения необходимо выбирать достаточно быстрый режим отогрева с целью уменьшения времени воздействия такого повреждающего фактора, как «эффекты раствора».

Регидратацию клеток необходимо проводить таким образом, чтобы предотвратить осмотический шок, действие высоких концентраций растворенных веществ и сдвига pH.

Восстановление жизнеспособности микроорганизмов во многом зависит от времени, температуры и среды регидратации. Так, для лиофилизированных молочнокислых стрептококков хорошие результаты обеспечивает холодная 30-минутная регидратация в 10%-м восстановленном молоке, а в случае хлебопекарских лактобацилл эффективна экспозиция в воде при 40 °С в течение 10 мин. Минеральная среда Шлагеля также обеспечивает высокую выживаемость при регидратации водородных бактерий. При добавке серотонина к среде оттаивания криоконсервированных шистозомул улучшается их созревание до взрослых особей, а эмбриональная сыворотка теленка замедляет проявление в них латентных повреждений. После криоконсервирования плазмодиев в составе эритроцитов наилучшие результаты при отмывании криопротектантов получены при использовании 15%-й глюкозы.

Репарация криоповреждений после отогрева определяется функциональным включением различных систем надежности клетки (ДНП, мембраны, дыхательная цепь), роль которых в этих процессах практически малоизучена. Поэтому необходимо максимально оптимизировать условия процессов репарации, что практически

сводится к выбору адекватного состава среды, температуры и продолжительности культивирования. При этом в зависимости от тяжести повреждений удается частично восстановить различные структурно-функциональные параметры клеток. Опыт показывает, что спустя час после оттаивания лиофилизированных бактерий в солевой среде восстанавливается синтез ДНК и белков до исходного уровня после некоторого периода ингибирования скорости этого процесса. Это сопровождается частичной репарацией деградированной ДНК в клетке. В глюкозо-минеральной среде М-9 при 37°C за 60 мин у деконсервированных бактерий частично восстанавливается также синтез АТФ. Причем восстановление синтеза АТФ в цитоплазме, например *E. Coli*, частично зависит от скорости синтеза липидов. Положительное влияние на репарацию микроорганизмов оказывают некоторые биокатионы.

Реактивация микроорганизмов после их отогрева из деконсервированного состояния предполагает полное восстановление всех функциональных свойств и скорости роста. Обычно эти процессы происходят после репарации криповреждений, когда в цитоплазме накапливается достаточное количество синтезируемых функциональных и пластических белков, т. е. восстанавливается синтез ДНК, РНК и белков, выполняющих транспортные, энергетические, ферментативные и динамические функции. Поэтому скорость восстановления роста культур в лаг-фазе, образование инфекционных фаговых частиц и выход фага происходят с некоторой временной задержкой. Эти процессы, например, после замораживания у криолабильных дрожжей происходят в течение двух недель, а после лиофилизации они более пролонгированы. В аспекте процессов репарации барьерных свойств мембраны, которые весьма чувствительны к действию факторов криоконсервации, у чувствительных к холодному воздействию некоторых субпопуляций *E. Coli* эти свойства мембран восстанавливаются сразу после отогрева у значительной части клеток.

Восстановление многих свойств наружной оболочки бактерий после замораживания, в том числе барьерных, связано с репарацией липополисахаридного слоя. Например, если на протяжении 60 мин инкубировать размороженную суспензию *E. Coli* при 37°C в глюкозо-минеральной среде М-9, то титр антигенных детерминант и зарядовые характеристики оболочки восстанавливаются на 60%. В процессах репарации деконсервированных клеток большую роль играет восстановление процессов субстратного фосфорилирования и генерации энергии, что способствует поддержанию величины разности электрохимического потенциала протонов на мембране.

Устойчивость к повторным температурным или осмотическим воздействиям микроорганизмов еще малоизучена, хотя предполагают возможность развития адаптационных явлений у одних видов и повышенной чувствительности у других. Например, чувствительность к повторному замораживанию культур *E. Coli* и *Serratia marcescens* после их криоконсервирования практически не изменяется. При разработке метода консервирования штаммов микро-

организмов необходимо учитывать многие параметры: эффективность различных скоростей замораживания — отогрева, природу и стадию развития, состав сред и т. д.

В связи с этим по чувствительности к различным методам консервирования микроорганизмы можно условно разделить на 3 группы. Первая — это микроорганизмы, которые переносят охлаждение с криопротекторами или без них до температур -40°C , в том числе и на носителях с возможной последующей их лиофилизацией. Такие режимы хорошо выдерживают некоторые бактериофаги, например *Pycocyanus aeruginosa*, многие бактерии *Bacillus*, *Acetobacter*, подобные *Arctobacter* и *Corynebacterium*, хлебопекарские лактобациллы, водородные (*Pseudomonas thermophila* и *Alcaligenes entrophus*), гонококки *Neisseria gonorrhoeae*, а также отдельные грибки, например продуцент целлюлозы *Trichoderma* и личинки трихинеллы. При этом следует учитывать, что споры многих микроорганизмов не выдерживают медленного замораживания.

Ко второй группе можно отнести микроорганизмы, которые хорошо переносят быстрое замораживание только с криопротекторами в жидких хладагентах с последующим хранением в них или лиофилизацией. К числу этой группы могут быть отнесены такие микроорганизмы, как вирус ящура, микоплазмы родов *Mycoplasma* и *Acholeplasma*, многие бактерии (*E. Coli*, *Serratia marcescens*), энтеробактерии, бифидобактерии, молочнокислые стрептококки, споры стрептомицетов, большинство дрожжей, споры липомицетов, шистозомы микрочервей трематод.

Третья группа требует индивидуального подбора криопротекторов и программных режимов замораживания — оттаивания. Сюда входят такие микроорганизмы, как бактериофаг T₄, водородокисляющие бактерии *E. Coli* с рекомбинативными ДНК и плазмидами, многие простейшие *Amoeba proteus*, *Giardia*, инфузории *Colpoda*, паразитирующие типа *Plasmodium chabaudi*, микроводоросли (хлорелла, диатомовая *thalassira weissflogii*), отдельные виды дрожжей (*Lipomices*, *Metschnikowa*, *Saccharomyces vini*), гриб *Fusarium moniliforme*, спороцисты шистозом.

При консервации микроорганизмов часто используют такой хорошо зарекомендовавший себя метод, как предварительное обезживание на носителях, например на полиакриламидных гелях и целлюлозных дисках, позволяющее улучшить способы хранения многих микроорганизмов и простейших.

Замораживание — оттаивание оказывает повреждающее действие на систему хроматина микроорганизмов. Поэтому замораживание иногда используют как один из способов получения мутантов в целях отбора и создания холодоустойчивых популяций.

Консервация низших эукариотических организмов. Загрязнение водоемов и почв отходами химического и радиоактивного производства существенным образом подавляет экологию водных и почвенных биоценозов, что нарушает естественный баланс и кругооборот живых систем в природе. Такие представители низших эукариот, как хламидомонады, хлорелла, эвглена и др., широко при-

меняются в лабораториях для решения различных фундаментальных проблем биологии, молекулярной генетики и т. д. Фотосинтезирующие формы низших эукариот, например фототропные одноклеточные, используются как объекты биотехнологии. Так, хлорелла и сценедесмес при культивировании дают 50 % сухого кормового белка, который содержит большое количество незаменимых аминокислот. Одноклеточные пресноводные водоросли могут быть продуцентом ряда биоактивных соединений.

Внутриклеточная кристаллизация у низших эукариотов вызывает летальные повреждения структур микроорганизмов. Если внутриклеточное замерзание происходит у микроорганизмов или простейших с высоким содержанием воды в цитоплазме, например у амеб, то они всегда разрушаются. Однако при двухэтапном замораживании инфузорий *Colpoda* под защитой криопротекторов внутриклеточная кристаллизация воды не столь опасна.

Важная роль в криоповреждении простейших принадлежит белкам цитоскелета. При быстром замораживании амеб до -10°C происходит мгновенное сокращение гранулоплазмы, однако плазма молема макроскопически не повреждается. С помощью электронно-микроскопических наблюдений выявлено, что в клетках цитоплазматические филаменты агрегируют за счет поперечного связывания σ -актина, которым богаты более чувствительные к холодovому шоку амебы. Наиболее выраженные повреждения белков мембранного скелета в клетках происходят после медленного замораживания, когда клетка чрезмерно дегидратируется (рис. 72).

С повреждениями мембранного скелета связаны и такие морфологические изменения микроорганизмов, как трансформация их формы. Эти изменения достаточно хорошо выявляются при замораживании — отогреве различных эукариотических клеток организмов.

Снижение температуры в осенне-зимний период индуцирует у таких одноклеточных, как, например *Chlamidomonas reinhardii* и *Chlamidomonas nivalis*, формирование зиготы, которая может легко переносить действие отрицательных температур, и даже при -196°C число жизнеспособных особей сохраняется на уровне 60 %. Vegetативные формы этих клеток обладают определенной криорезистентностью и способны переохладиться до температур $-6...-7^{\circ}\text{C}$. Однако при формировании льда на внешней стороне мембраны они погибают при $-2,5^{\circ}\text{C}$. Аналогичная криоустойчивость обнаружена у некоторых штаммов хлореллы, например *Chlorella prothothecoides*, которая может выживать при замораживании до -196°C . Vegetативные клетки мезофильного вида *Chlorella emersonii* совершенно не переносят воздействие низких температур. К числу криоустойчивых видов относится также *Scenedesmus quadricauda*, которая при замораживании сохраняет свою жизнеспособность в 50 % случаев.

Существует целый ряд морских водорослей типов *Phaladactylum tricornatum*, *Nannochloris adamasii*, *Dunaliella quartolecta*, которые сохраняют в 40—60 % случаев свою жизнеспособность при

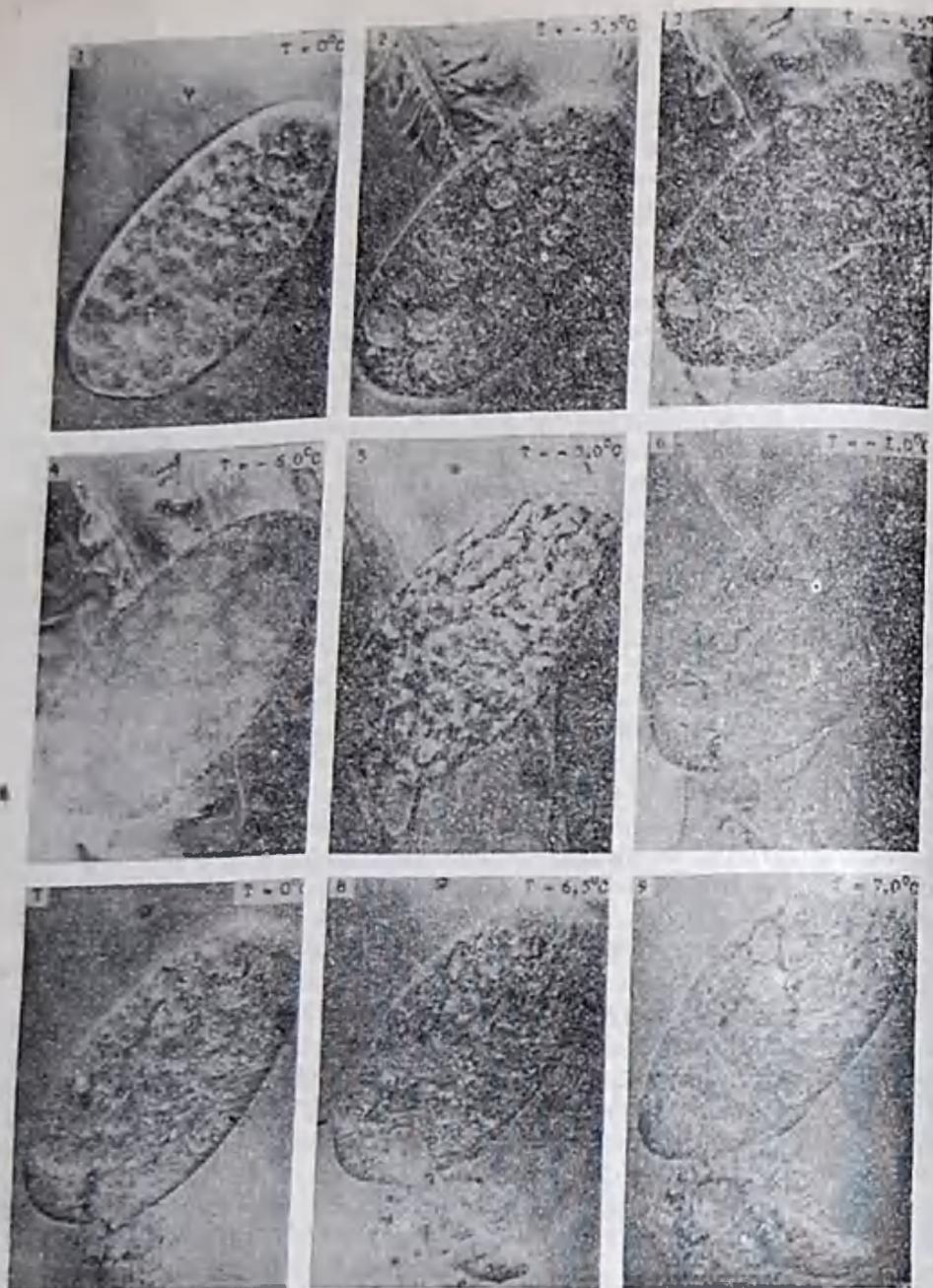


Рис. 72. Характер низкотемпературного повреждения инфузории *Paramecium aurelia* при различных температурах (1—9)

медленном замораживании до -196°C в средах без криопротективных добавок и в 100 % в среде 5%-го раствора глицерина. Другие штаммы морских водорослей (например, *Cylindrotheca closterium* и др.) выносят замораживание только после их обработки 5%-ми растворами ДМСО или глицерина и очень медленного

($\sim 1^\circ\text{C}/\text{мин}$) охлаждения. В то же время практически все виды пресноводных одноклеточных водорослей (например, 26 штаммов *Euglena gracilis*, *Protheca*, 300 штаммов *Chlorococcales* и др.) погибают (кроме зиготных форм), если в среде замораживания отсутствует криопротектор и не соблюдена оптимальная программа охлаждения.

Наиболее эффективным криопротектором при замораживании пресноводных водорослей является метанол, который позволяет сохранять до 30 % жизнеспособных клеток. Другие криопротекторы — ДМСО, глицерин и ПВП — обеспечивают выживаемость клеток в пределах до 10 %.

На выживаемость данных клеток большое влияние оказывают стадия их жизненного цикла, возраст, уровень метаболической активности, способность к адаптации. Например, если вегетативные клетки *Ch. emersonii* и *Protheca chlorroides* культивировать при температуре 20°C , то они не выдерживают процедуру замораживания. Однако после их предварительного культивирования при $3\text{--}4^\circ\text{C}$ на протяжении двух недель их криорезистентность существенно увеличивается (до 30—40 %), если замораживание осуществляли со скоростью более $10^\circ\text{C}/\text{мин}$. Другие виды клеток в аналогичных экспериментальных условиях выживают, если скорость охлаждения не превышает $0,1\text{--}1^\circ\text{C}/\text{мин}$. Повышение жизнеспособности клеток после их выдерживания при $3\text{--}4^\circ\text{C}$ происходит в результате их синхронизации до стадии G_2 , при которой более активно протекают процессы репарации.

Однако предварительная холодовая акклимация не всегда способствует повышению устойчивости одноклеточных водорослей к замораживанию. Например, штамм *Ch. riinhardii* после двухнедельной акклимации при 4°C полностью разрушается при замораживании, независимо от режимных параметров охлаждения и вида криопротектора. Если содержать *Chlorella protothecoides* на ауτροφном питании при 20°C , то они в 100 % случаев хорошо переносят замораживание до -196°C без каких-либо криопротективных добавок. При переводе этих клеток на гетеротрофный способ питания их криорезистентность меняется в сторону снижения.

Такие клетки, как *Chlorella emersonii*, *Ch. marina*, *Ch. salina*, *Ch. ovalis* и другие штаммы, повышают свою устойчивость от 0 до 40—50 % после культивирования в средах с пониженным содержанием нитратов или фосфатов, в которых клетки теряют способность к делению. Снижение криорезистентности при переходе на гетеротрофный способ питания объясняется тем, что в клетках активизируется функция сократительной вакуоли. Штаммы одноклеточных, например *Ch. protothecoides*, не содержащих сократительной вакуоли, практически хорошо переносят замораживание до -196°C .

Сократительная вакуоль у одноклеточных представляет собой скопления актиноподобных белков, которые регулируют форму и барьерные свойства внешней мембраны для воды и ионов. При хорошо выраженной и функционирующей вакуоле проницаемость

внешней мембраны для молекул воды снижается, и клетка с трудом теряет воду осмотическим путем при ее эквilibрации с защитными средами перед замораживанием. Остающаяся в ней жидкость в чистом виде при замораживании быстро переходит в твердое состояние и инициирует формирование внутриклеточных кристаллов, являющихся летальными факторами для клетки.

Роль липидов заключается в том, что при замораживании активируются внутриклеточные фосфолипазы и процессы ПОЛ, которые нарушают структурно-функциональное состояние сократительных белков вакуолярного аппарата за счет появления токсических продуктов гидролиза липидов (лизолецитины, альдегиды и т. д.).

Вопросы криоконсервации одноклеточных морских и пресноводных организмов до конца не выяснены и требуют более активных исследований по выяснению механизмов их криоповреждений и криозащиты.

Методы оценки жизнеспособности деконсервированных клеток

Для определения степени сохранения свойств клеток после замораживания — отогрева существуют биохимические, морфологические, физико-химические и физиологические методы оценки. В процессе эквilibрации клеток в осмотически активных средах при 0—4 °С и особенно после замораживания — отогрева возникают различной степени и распространения повреждения плазматических мембран, внутриклеточных органелл и ядерного аппарата. Все методы оценки структурно-функционального состояния клеток, тканей и органов условно можно разделить на два вида. Это, во-первых, экспресс-методы, позволяющие быстро и в общем виде оценивать состояние биообъекта после замораживания — отогрева. К их числу чаще всего относят микроскопические методы с использованием суправитальных красителей. Во-вторых, методы, позволяющие оценивать специфические структурные и функциональные изменения в биообъекте с помощью более тонкого биохимического, физиологического, биофизического и электронно-микроскопического тестирования биообъектов.

Одним из наиболее часто применяемых методов оценки состояния клеток после замораживания — отогрева является исследование проницаемости плазматической мембраны для различных веществ, и в частности для красителей. Для этого используют чаще всего красители типа трипанового синего и эозина, а для растительных клеток — ацетокармин. Такие методы суправитального окрашивания основаны на том, что через неповрежденную плазматическую мембрану краситель не проникает внутрь клетки и, наоборот, в случае нарушения барьерных свойств мембраны краситель проходит в цитоплазму. Например, для суправитального окрашивания гепатоцитов трипановым синим на предметном стекле клетки смешивают с 0,6% -м раствором красителя, приготовленным

на 0,15 М NaCl, в соотношении 1 : 1, после чего экспонируют 1—2 мин. Нативные клетки с неповрежденной плазматической мембраной под микроскопом имеют желто-зеленоватую непрокрашенную цитоплазму с четкими контурами плазматической мембраны. Методы суправитального окрашивания часто используют для тестирования клеток костного мозга, клеток крови и любых других. В этих случаях клетки окрашивают эозинном или люминисцирующими красителями (акридиновый оранжевый, тетрациклин).

Достаточно информативным методом оценки состояния деконсервированных клеток является культивирование *in vitro*, что позволяет определить степень сохранения их специфических свойств (например, колониеобразующая способность млекопитающих, синтез специфических веществ, ферментативная активность и т. д.). Для определения жизнеспособности клеток и тканей может быть использован ряд биофизических методов: криомикроскопия, рентгенография, вискозиметрия, термография, электрометрия, ЯМР высокого разрешения, ЭПР-спиновых меток и зондов, электропроводность, ψ -потенциал. Ценность этих методик заключается в том, что ряд из них позволяет исследовать состояние биообъекта при отрицательных температурах, без его отогрева, т. е. не нарушая целостности клеток. Например, способом ^{31}P -ЯМР можно исследовать динамику распада макроэргов в замороженных до различных температур клетках, не разрушая их. Методика ЭПР-спиновых меток позволяет в аналогичных условиях низких температур определять динамику структурных изменений белков и других биополимеров.

Для выявления уровня сохранения функции генетической системы клеток, биосинтеза специфических белков и нуклеиновых кислот применяют соответствующие меченые предшественники и по уровню их включения судят о нарушениях в обмене белков, нуклеиновых кислот либо других биополимеров в размороженной клетке в динамике и таким образом выясняют уровень и глубину повреждения генетического аппарата. Достаточно информативным является автордиографический метод специфического мечения тех или иных структур в клетках, срезах, тканях с помощью ^3H -предшественников, позволяющих проявить треки с помощью фоточувствительной эмульсии. Путем микроскопического подсчета числа треков судят о функциональной активности ДНК, РНК или белков.

Для оценки деконсервированных клеток можно использовать такие критерии жизнеспособности, как дыхание и окислительное фосфорилирование, в качестве показателей сохранения структурно-функциональной полноценности митохондрий, обеспечивающих генерацию и трансформацию энергии в клетке. При подавлении этих процессов в клетках не осуществляются такие важные метаболические функции, как синтез белков, нуклеиновых кислот, транспорт веществ и др.

Для выявления специфических криоповреждений мембран клеток исследуют активность мембраносвязанных маркерных ферментов. Например, такими маркерными ферментами при оценке замороженно-отогретых эритроцитов могут быть холинэстераза, кото-

рая локализована в поверхностном слое мембраны, либо $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ АТФ, пронизывающая весь липидный бислой. О состоянии нарушения пассивного транспорта ионов или метаболитов можно судить о выходе в супернатант K^+ , АТФ и т. д. Эти методы в сочетании с суправитальной окраской могут оказаться весьма информативным диагностическим приемом при оценке состояния деконсервированных клеток и указывать на глубину и топографию клеточных криповреждений. Например, появление в супернатанте размороженных клеток большого числа лизосомальных гидролаз свидетельствует о разрушении лизосом и выходе гидролитических ферментов в цитоплазму. Появление в супернатанте размороженных клеток повышенного количества K^+ может свидетельствовать о нарушениях регуляции таких важных функций в клетке, как синтез белков, ДНК и РНК, биоэнергетика клетки и работа транспортных АТФаз.

Степень, размеры и глубину криповреждений внутриклеточных структур можно определять с помощью гистологических, гистохимических и особенно электронно-микроскопических методов, которые позволяют селективно выявлять характер повреждения внутриклеточных структур и оценивать степень их глубины и распространенности.

Для выявления степени структурно-функциональной полноценности и специфических свойств определенного вида деконсервированных клеток, например миеокариоцитов или эритроцитов, оценивают их активность *in vivo*. В этих случаях на мышах чистых линий можно, например, определять колониеобразующую способность после трансплантации клеток костного мозга либо исследовать жизнеспособность эритроцитов в кровотоке, предварительно меченных ^{54}Cr -радиоактивным изотопом. Выбор тех или иных методов определения жизнеспособности *in vivo* зависит от конкретного объекта. Если клетки в цикле криоконсервирования хорошо сохраняются, то для их оценки достаточно метода суправитальной окраски, определения специфической функции и эффективности после трансплантации. Такое состояние деконсервированных клеток обычно возникает в случае, если повреждаются только плазматические мембраны и для выявления степени нарушения можно ограничиться соответствующими методами по суправитальному окрашиванию. В случае повреждения внутриклеточных структур и оргanelл, приводящего к нарушению процессов биосинтеза и энергетики, более эффективными являются методы биохимии и цитохимии. Поэтому в каждом конкретном случае следует вычлнить круг подходящих тестов для определения степени нарушения свойств деконсервированных клеток.

Лучше всего использовать комплексный подход в оценке размороженного материала, применяя светооптические, биохимические, морфологические и другие методы исследований, что позволит достаточно полно оценить характер первичных и вторичных повреждений в клетках, тканях либо органах. Необходимо учитывать, что криповреждения для одних клеток не имеют решающего

значения, а для других указывают на потерю важнейших функциональных свойств. Например, разрушение системы микросомального окисления в деконсервированных гепатонитах свидетельствует о потере важнейшего свойства этих клеток — их способности к трансформации ксенобиотиков.

Методы отогрева замороженных биообъектов

Существует три основных метода отогрева замороженных объектов: отогрев способом теплоподвода, например с помощью нагретой водяной бани, воздуха или другого теплоносителя; отогрев в сверхвысокочастотном электромагнитном поле (СВЧ, УВЧ) и отогрев биообъектов под давлением.

Отогрев с помощью теплоподвода в виде водяной бани в настоящее время наиболее широко применяются в практике криоконсервации различных биообъектов. В зависимости от вида биообъекта используют различные температуры (37, 40 °C и выше) и скорости перемешивания теплоносителя. Однако такой способ отогрева имеет ряд недостатков. К их числу можно отнести возникновение значительного перепада температур у стенок и внутри размораживаемого контейнера, плохую управляемость процессом отогрева, поскольку осуществлять регулировку поступающего к образцу теплового потока сложно, отсутствие равномерного температурного поля по объему образца, в результате чего возникают локальные перегревы размораживаемого биообъекта.

Теоретический и экспериментальный анализ процессов, протекающих в биообъектах при их замораживании методом внешнего контактного теплоподвода, показывает, что более перспективным является индукционный нагрев с помощью энергии электромагнитного поля. При этом можно получить высокие скорости повышения температуры и добиться ее равномерного распределения по образцу. Нагрев биообъектов таким способом хорошо управляем, поскольку можно программно изменять мощность электромагнитного излучения. Однако для получения оптимальных результатов необходимо предварительно выяснить характер изменения диэлектрических свойств биообъекта в зависимости от частоты и мощности его СВЧ-нагрева, выявить характер распределения поглощенного излучения и особенно фазовых переходов в твердом образце в процессе отогрева. Таким образом, несмотря на перспективность метода, он требует предварительных глубоких экспериментальных исследований для разработки оптимальных режимных параметров нагрева с учетом особенностей излучения и природы биообъекта, его массы, архитектоники, плотности и т. д. Практически это означает, что в каждом отдельном случае необходимо проводить индивидуальные расчеты мощности СВЧ-излучения для отогрева определенного вида биообъекта. Кроме того, оборудование для СВЧ-нагрева является достаточно дорогостоящим и далеко несовершенным в аспекте получения однородного темпера-

турного поля в размораживаемом объекте, что крайне необходимо при разработке метода СВЧ-отогрева. Получение однородного поля является очень важным, поскольку неоднородный поток излучения в виде пятен, проникающий внутрь объекта, способен концентрироваться в отдельных точках и вызывать сильные локальные перегревы, что приводит к необратимым повреждениям биоструктур в процессе отогрева. Следовательно, проблема отогрева биообъектов с помощью СВЧ-нагрева во многом остается нерешенной и требует дальнейших разработок.

Третий способ размораживания биообъектов теплопередачей под давлением предусматривает изменения одновременно температуры образца и давления, при котором вода не кристаллизуется несмотря на понижение температуры. Практически это означает, что микроокружение биообъекта в условиях высоких давлений остается в жидком состоянии при отрицательных температурах. Появляются перспективы консервирования не только клеточных суспензий, но и сложных тканей и органов в жидких, сильно переохлажденных системах. Это является важным, поскольку составляющие компоненты тканей и органов не переносят внутритканевую или внутриорганическую кристаллизацию жидкой части, в результате чего они подвергаются механическому разрушению по объему массы ткани. Данный метод замораживания — отогрева наряду с положительными сторонами и перспективностью использования имеет существенные негативные стороны. Во-первых, высокие давления сами по себе могут оказывать отрицательное воздействие на структурно-функциональное состояние биообъекта, исходы которого не всегда можно предсказать. Во-вторых, методические и технические сложности этого способа консервации биообъектов не позволяют широко использовать его на практике.

Вместе с тем каждый описанный способ отогрева может быть достаточно эффективным. Так, нагрев биообъектов механизмом теплопроводности эффективен в твердой фазе, СВЧ-нагрев — в жидкой, и с помощью высокого давления можно осуществить быстрый переход из твердой фазы в жидкую.

Глава 10

КОНСЕРВАЦИЯ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ

В основе гипотермической консервации тканей и органов лежит принцип применения средств и условий, максимально ингибирующих процессы аутолиза клеток. Криочувствительность биологических объектов на эволюционной лестнице различна. Чем выше организована живая система, тем выше ее чувствительность к воздействию низких температур. Если, например, бактерии, простейшие, грибки, ряд низших растительных объектов хорошо переносят воздействие низких и ультранизких температур, то по мере усложнения систем организма температурная граница жизни изменяется и уже такие высокоорганизованные животные, как лягушки, рыбы, ящерицы и гибернанты, способны выживать только при охлаждении тела до 0°C или в крайнем случае до $-1,5...1,8^{\circ}\text{C}$. При адаптации этих животных к неблагоприятным температурным условиям формируются очень сложные структурные и метаболические механизмы, которые обеспечивают их устойчивость к воздействию низких температур.

Для успешного решения проблемы криоконсервации различных органов и тканей, например кусочков эндокринных желез, кожи, роговицы, костной и других тканей, необходимо учитывать особенности их биологической организации. В противоположность клеточным суспензиям в органичных и тканевых структурах высокая плотность клеток, которые по своей структуре, возрасту и степени функционирования достаточно разнородны. Поэтому проникновение и распределение криопротекторов, а также фронта кристаллизации в ткани происходят неравномерно, что обуславливает появление градиента осмотического давления и фронта распространения температуры. Особенно это характерно при криоконсервации крупных по объему органов и тканей.

Поскольку ткани или органы обычно содержат клетки с различными морфофункциональными потенциями, оптимальные условия их выживания в процессе криоконсервации будут различными, так как они по-разному будут реагировать на сдвиг температуры, природу и концентрацию криопротекторов, сложных консервантов и т. д. Наряду с необходимостью сохранения структурно-функциональной полноценности клеток, входящих в состав ткани или органа, следует всегда помнить о важной роли систем гормональной регуляции и авторегуляции, которые сообщают им специфическую функцию после ее трансплантации.

Существует два эффективных способа консервирования органов и тканей: гипотермическое хранение ($0-4^{\circ}\text{C}$) и перевод тканей в состояние глубокого анабиоза ($-80...-196^{\circ}\text{C}$). Такой вид консервирования тканей животных и человека, как, например, лиофилизация, позволяющий сохранить их специфические и функциональные свойства, в полном объеме пока не разработан.

Гипотермическая консервация тканей

При понижении температуры от 37 до 0°C интенсивность биохимических процессов в клетках тканей снижается в $7-10$ раз, что позволяет хранить их $6-72$ ч. Протекающие при этом в тканях процессы аутолиза на протяжении этого времени не достигают критических величин и позволяют использовать ткани для трансплантации. Более длительное выдерживание тканей при гипотермических температурах ведет к необратимым структурным изменениям в цитоплазме и плазматических мембранах, митохондриях, лизосомах, генетическом аппарате, мембранах ЭПР в результате углубления процессов ишемии. Факторы, возникающие в ходе этих процессов, ведут к дезинтеграции процессов синтеза веществ и генерации энергии в клетке, потере клеткой ионной асимметрии и разбалансировке ферментативных и регуляторных процессов.

При разработке краткосрочных методов холодовой консервации тканей необходимо учитывать роль указанных выше процессов ишемии в развитии деструкции клеток, и в соответствии с этим разрабатывать такой состав сред и скорость охлаждения, при которых развитие ишемического синдрома тормозилось бы. Эти условия могут быть достигнуты несколькими способами, и один из них — гипотермическое консервирование тканей в жидких средах или во влажной камере, насыщенной инертными газами. Преимущество консервации тканей во влажной камере с регулируемой газовой средой заключается в том, что системы тканевого обмена подвергаются гораздо меньшим изменениям, чем при консервации в жидких средах. Более того, во влажных камерах можно регулировать атмосферное давление и напряжение газовой смеси. Например, трансплантаты кожи и роговицы лучше переносят консервирование во влажной камере по сравнению с другими видами.

Гипербария тканей инертными газами как метод гипотермической консервации тканей основана на принципе более глубокого торможения метаболических процессов, и в частности процессов перекисного окисления липидов в мембранах клеток и внутриклеточных органеллах, что способствует их лучшему сохранению. Однако методы гипотермического консервирования тканей с применением газовых смесей пока недостаточно совершенны и требуют дальнейшего усовершенствования, поскольку остаются невыясненными такие вопросы, как, например, режимные параметры температуры консервации и хранения в условиях гипоксии или гипероксии. Следует учитывать, что газы лучше растворяются в жидкостях при пониженных температурах, чем при комнатной

температуре, т. е. их утилизация при гипотермических и комнатных температурах тканями будет различной. Существенным фактором, влияющим на результаты гипотермического хранения тканей, является концентрация в смеси CO_2 , так как это влияет на величину рН среды. Так, при 20°C и максимальном насыщении среды газовой смесью рН сдвигается до 5,0, а при 10°C — только до 7,0. Парциальное давление CO_2 в консервирующей жидкости следует строго контролировать, учитывая при этом, что ткани обладают определенной буферной емкостью, которая на первых этапах гипотермического хранения компенсирует сдвиги рН за счет эндогенных субстратов. Однако по мере накопления недоокисленных продуктов обмена в клетках и внеклеточной среде буферная емкость ткани резко падает, что ведет к снижению внутри- и внеклеточного рН. Скорость аутолитических процессов зависит от вида ткани, ее структуры, температуры и состава среды. В случае, если рН среды плохо удерживается на постоянном уровне, следует использовать такие буферные смеси, как, например, фосфатный, карбонатный или *трис-НСI* буферы.

Для гипотермической консервации тканей применяют в основном три вида сред: искусственные, естественные и комбинированные. Во всех случаях в таких средах строго контролируются физико-химические и бактериологические показатели, которые могут резко изменяться в результате жизнедеятельности клеток. Поэтому консервирующие среды необходимо заменять свежими, более активными. Для поддержания нужных показателей на должном уровне в среды вводят различные сбалансированные солевые растворы, поддерживающие осмотические свойства клеток, энергетические, пластические и антибактериальные препараты, обеспечивающие регуляцию метаболических процессов и подавление развития патогенной микрофлоры. В связи с этим метод гипотермического консервирования тканей в жидких средах имеет недостатки в том смысле, что в процессе хранения тканей идет накопление продуктов метаболизма, отрицательно влияющие на их жизнедеятельность и выживаемость. Замена «старых» консервирующих сред новыми должна строго регламентироваться, так как в процессе очень частых смен происходит быстрая потеря клетками витаминов, биостимуляторов и антиоксидантов, регулирующих жизнедеятельность тканей.

В настоящее время разработано большое число жидких сред (Рингер-Локка, Тироде, Хенкса, Игла, Дюльбекко и др.), содержащих сбалансированные концентрации катионов, анионов и микроэлементов, которые являются регуляторами энзиматических реакций или входят в состав ферментов. Разработаны жидкие среды, по своему составу близкие к составу внеклеточной жидкости (например, раствор Робинсона), среды, содержащие различные активные белковые и небелковые вещества (эмбриональная сыворотка теленка, растворы альбумина, активные полипептиды, витамины, антиоксиданты), среды, обогащенные K^+ (среда Коллинза) и другими соединениями.

В последнее время для криоконсервирования тканей используют в основном сложные многокомпонентные среды, которые наряду с растворами ионов и кристаллоидов содержат также вязкие вещества типа глицерина, полиэтиленоксидов. Например, положительное влияние на результаты консервирования кожи оказывает жидкая среда, в которой содержится 5 % глицерина, а при консервации роговицы — забуференный раствор декстрана и трис-НСI-буфера с рН 7,4 и осмотическим давлением 306—309 мосм. Выраженной эффективностью обладает среда М-199, содержащая набор незаменимых аминокислот с добавками сыворотки или плазмы крови, которые хорошо поддерживают осмотическое и онкотическое давление и стабилизируют структуры клеток в процессе аутолиза.

Для консервирования тканей применяют также различные традиционные растворы с добавками биологически активных соединений. Например, среда Эрлиха, а также среда Паркера с добавкой сыворотки и антибиотиков оказываются эффективными для гипотермического хранения дермо-эпидермальных трансплантатов кожи в течение двух месяцев, а среда Игла, в состав которой введена эмбриональная сыворотка, глютамин и антибиотики, — для консервации сосудов человека при температуре 0—4 °С на протяжении 3—4 нед. Модифицированная среда М-199 с добавками ПВП, глюкозаминогликанов, аденозина и аденина оказывает положительное влияние на роговицу при ее хранении в условиях гипотермических температур. Аналогично влияет на сохранность роговицы среда М-К на основе раствора М-199, которая имеет рН 7,4 и содержит 10%-ный раствор декстрана с М. м. 40 000, а также антибиотики. Эта среда обеспечивает сохранность свойств роговицы на протяжении 12—14 дней при 0—4 °С.

Наряду с синтетическими средами для гипотермической консервации тканей используют также естественные тканевые жидкости и их компоненты, модифицированные различными добавками ионов и органических компонентов. Например, для гипотермического хранения сосудистых трансплантатов используют среды, обогащенные эмбриональными экстрактами, а в случае амниотической оболочки человека — одногруппную кровь и ее компоненты. Однако кровь в качестве консервирующей среды применяется очень редко, так как при гипотермических температурах эритроциты теряют способность транспортировать O_2 к клеткам тканей из-за упрочения связей O_2 с гемоглобином. При этом гемоглобин теряет свою буферную емкость, удаление CO_2 из среды нарушается, возникает алкалоз, при котором создаются условия для развития инфекции.

В качестве добавки к сбалансированным солевым растворам часто используют гомогенную сыворотку или плазму, с хорошей буферной емкостью и способностью удерживать осмотическое и онкотическое давление в клетках тканей. Однако сыворотка обладает тем отрицательным свойством, что ее состав очень вариабелен и колеблется в зависимости не только от вида, но и от осо-

бенностей того или иного индивида. С целью повышения активности плазмы как буферной системы и консерванта тканей ее следует очищать от фибриногена и γ -глобулина, а также сывороточного комплемента и вирусов. Такие растворы плазмы хорошо поддерживают осмотическое и онкотическое давления в клетках тканей, не содержат групповых агглютининов, жиров и цитотоксических антител.

В сложном очищенном растворе альбумина, содержащем соли, глюкозу, антибиотики, антиоксиданты и белковый гидролизат крови телят, можно с успехом консервировать при 0°C кожные и сухожильные трансплантаты, роговицу и другие ткани на протяжении до 30 дней. Кроме антиоксидантов, активность протеаз эффективно ингибируют растворы хлорофилла в сочетании с ϵ -аминокапроновой кислотой. Поэтому их следует вводить в состав консервирующих сред, особенно при хранении биообъектов, характеризующихся высоким уровнем перекисного окисления липидов. Соединения типа кортикостероидов, а также такие фармацевтические агенты, как хлоропромазин, ацетилсалициловая кислота, являются стабилизаторами цитомембран, особенно мембран лизосом, в связи с чем их добавление в консервирующие растворы — целесообразная мера в борьбе с процессами «лизосомального гидролиза» биополимеров клетки.

Для гипотермической либо низкотемпературной консервации опорных тканей (кости, хрящи, роговица, нервные стволы, кожа) можно использовать различного рода гидрофобные покрытия типа пластмасс или текучего парафина, которые продлевают срок хранения трансплантатов при температуре от 2 до -2°C на протяжении нескольких месяцев. Например, роговица консервирования во влажной камере в парафиновом масле сохраняет свои свойства на протяжении 20 дней при 4°C , нервные стволы — нескольких недель, а твердая мозговая оболочка — до трех месяцев. Парафиновая пленка также защищает ткани от развития процессов ПОЛ, резкой дегидратации и бактериального заражения. Однако недостатком этого способа консервирования является тот факт, что парафин необходимо удалить перед трансплантацией биоматериала, так как он обладает канцерогенными свойствами. Поэтому в последнее время применяют различные малотоксичные полимерные покрытия, которые обладают способностью рассасываться в организме без каких-либо последствий после пересадки трансплантата.

Главный недостаток методов гипотермической консервации тканей заключается в том, что биоматериалы можно хранить только краткий период времени. При более длительном хранении трансплантаты могут подвергаться модификации, в результате чего их свойства изменяются. Поэтому с точки зрения создания запасов тканевых трансплантатов целесообразней разрабатывать методы низкотемпературной консервации, при которых свойства биоматериала можно сохранять в течение нескольких лет.

Пересадка аллогенов, консервированных при гипотермических или ультранизких температурах, тесно связана с проблемой транс-

плантационного иммунитета, в которой необходимо решать такие важные вопросы, как подбор пар донор — реципиент и способы иммунодепрессии, повышающие «переносимость» пересаженного трансплантата. После пересадки замороженных кожных трансплантатов, как правило, наблюдается некоторая задержка в клеточной реакции иммунокомпетентных систем организма в ответ на криоконсервированный трансплантат. Этот феномен «запаздывания» клеточных реакций расценивается как временная потеря иммунных свойств криоконсервированным трансплантатом в результате нарушения структуры рецепторных белковых детерминант, воспринимающих внешние раздражения. Кроме того, деконсервированные трансплантаты, пересаженные в ложе реципиента, васкуляризируются несколько позже, чем нативные, в результате чего восстановление взаимодействия иммунных систем реципиента и донора запаздывает.

При трансплантации консервированных биоматериалов развиваются локальные местно-тканевые реакции, в которых активное участие принимают макрофагально-моноцитарные формы клеток. При этом содержание гистоцитов, лимфобластов и особенно макрофагальных клеток в ложе реципиента после пересадки консервированного трансплантата значительно ниже, чем после пересадки нативного биоматериала. Биохимические и гистохимические исследования процессов биосинтеза ДНК и динамики лизосомальных ферментов подтверждают, что после пересадки деконсервированного трансплантата тканевые процессы синтеза и распада выражены менее интенсивно, чем после пересадки нативного трансплантата. В конечном итоге в процессе перестройки трансплантата тканевые процессы в ложе реципиента выравниваются и завершаются подобно тому, как это происходит при пересадке нативного биоматериала. В результате накопления в криоконсервированном трансплантате биоактивных веществ («некрогормонов») они оказывают стимулирующее действие на тканевые процессы регенерации и приживления.

До настоящего времени природа, химический состав и механизм действия биостимуляторов не известны, однако можно думать, что это разнородная группа веществ, состоящих из низкомолекулярных белков и их комплексов, нуклеиновых кислот и гликопротеинов, которые, воздействуя на клетки, окружающие трансплантат, активизируют процессы дифференцировки и пролиферации. Интересен тот факт, что «низкотемпературные» биостимуляторы индуцируют несколько иной ход репаративных процессов в тканях, чем, например, «высокотемпературные» или «химические», что способствует истинной регенерации тканей без формирования выраженных рубцовых тканей.

Консервация фрагментов щитовидной железы. Важное значение в способности щитовидной железы поддерживать свои функциональные свойства после пересадки имеют биогенные моноамины и особенно катехоламины (норадреналин и адреналин). Клетки щитовидной железы экспериментальных животных и человека

хорошо переносят криоконсервирование, если в среде присутствуют такие проникающие криопротекторы, как ДМСО, димексид либо 1,2-пропандиол. При этом в клетках железы на достаточно высоком уровне сохраняются процессы аккумуляции и окисления нодулов, созревания тринодитиронина и освобождения тироксина в кровь. Хорошо сохраняются также процессы рецепторного и нереперторного связывания адреналина тиреотропными гормонами и другими неспецифическими факторами, влияющими на гормонопоэз. После криоконсервации не нарушается функция аденилатциклазной системы, ее рецепторной, сопрягающей и каталитической частей в том числе и формирование вторичных мессенджеров цАМФ, цГМФ.

Высокая криостабильность клеток щитовидной железы после замораживания связана с особенностями ее биологической организации, и в частности с тем, что она содержит коллоид, образованный тиреоглобулином — белком с высокой молекулярной массой, соединительно-тканную капсулу и значительное число липидов в жидкокристаллическом состоянии. Это в совокупности формирует систему с низким содержанием воды и устойчивыми темпами метаболических процессов.

Для гипотермического хранения фрагментов щитовидной железы чаще всего используют сбалансированные солевые растворы Рингер-Локка с добавлением антибиотиков, стандартный стабилизатор крови — ЦОЛИПК-7 «Б» (глюкозо-цитратный раствор с антибиотиками), одноклеточную кровь с антибиотиками и гепарином либо другие составы. Эти составы применяют для пульсирующей перфузии железы, которая имеет преимущества по сравнению с ее простым гипотермическим хранением в сбалансированных солевых растворах, поскольку позволяют более длительное время сохранять свойства щитовидной железы при 4 °С. При дозированной перфузии щитовидной железы в сбалансированную среду Рингер-Локка вводят глюкозу, АТФ, цитрат натрия, димедрол, гидрокортизон, гепарин и пенициллин. При таком способе перфузии в тироцитах обычно хорошо сохраняются гликолитическая активность, тканевое дыхание, их фолликулярное строение и способность к гормонопоэзу. Чем короче сроки гипотермического консервирования щитовидных желез, тем меньше выражены в них деструктивные изменения, и после пересадки они функционируют более длительное время. Как бесперфузионные, так и перфузионные методы консервации щитовидной железы позволяют пролонгировать ее жизнеспособность на время, достаточное для иммунологического типирования биоматериала и селекции пары донор — реципиент.

Создание банков щитовидных желез на основе гипотермической консервации нецелесообразно, поскольку позволяет лишь кратковременно сохранять свойства железы. Поэтому более эффективным является метод криоконсервации под защитой проникающих криопротекторов — глицерина, ДМСО, димексида и пропиленгликоля. Трансплантаты щитовидной железы крысы, криоконсервированные

медленно ($1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) под защитой 15%-го глицерина до -80°C достаточно хорошо приживляются в 70 % случаев. Спустя 1—8 нед хранения в жидком азоте ткань железы сохраняет способность реагировать на тиреотропный гормон увеличением образования внутриклеточного цАМФ, продуцировать соответствующие активные начала. Для криоконсервации железы можно также применять 1,0 М раствор глицерина в сочетании с 1,4 М раствором ДМСО, а ткань медленно замораживать. При таком методе лучше сохраняется захват и освобождение ^{131}I на протяжении двух месяцев после хранения в жидком азоте. Такие криопротекторы как ПВП с М. м. 12600 и ПЭО с М. м. 400, также эффективны подобно глицерину и обеспечивают сохранение функции тиреоидной паренхимы кролика и собаки, в частности поглощение ^{131}I и рост тироцитов в культуре ткани. Растворы оксэтилглицерина в сочетании с ПЭО с М. м. 400 в высоких концентрациях хотя и эффективны при криоконсервации фрагментов щитовидной железы, однако использовать их надо с осторожностью, так как они могут вызывать денатурацию тиреоидной паренхимы и тироцитов.

Наиболее эффективными криопротекторами при замораживании щитовидной железы являются ДМСО и димексид. После криоконсервации фрагментов щитовидной железы под защитой 10 % димексида сохраняется способность к гормонообразованию и секреции, а также росту и размножению тироцитов в культуре ткани. Трансплантация фрагментов железы, консервированных по такому способу, осуществляемая больным через 2—4 мес. после резекции щитовидной железы на фоне развития гипотериоза и не компенсируемая заместительной гормональной терапией, показывает, что при этом тиреоидный аутоимплантат сохраняет специфические свойства и способность к накоплению ^{131}I .

Консервация парашитовидной железы. Необходимость пересадки этой железы возникает в случае паратиреоидэктомии либо в результате ее первичной или вторичной гиперплазии. Замораживают парашитовидные железы в среде, содержащей 10 % сыворотки крови, 80 % культуральной среды и 10 % ДМСО, при скорости охлаждения $1-4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -80°C с последующим погружением в жидкий азот. Такая методика обеспечивает после 9 мес хранения жизнеспособность 80 % трансплантатов. Замораживание желез крыс в культуральной среде, содержащей 15 % глицерина, со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -4°C и с последующим погружением в твердую углекислоту (-79°C) или жидкий азот (-196°C) позволяет также хорошо сохранить их способность поддерживать необходимый уровень Ca^{2+} в крови. Эффективны также растворы этиленгликоля, которые в ряде случаев оказывают более выраженное криозащитное действие, чем глицерин.

Функционирование деконсервированной ткани железы в организме реципиентов после ее трансплантации сохраняется в среднем от 70 до 160 дней. Однако при быстрых режимах замораживания до -196°C ее функция снижается и сохраняется только на протяжении 21 дня. Это связано с тем, что при быстром сни-

жения температуры возникает шок клеток, который наиболее опасен в зоне 0—4 °С и —4...—6 °С.

Трансплантация криоконсервированных фрагментов железы человеку эффективна как мера временного устранения симптомов паратиреоидной недостаточности.

Консервация ткани поджелудочной железы. Гипотермическое хранение ткани поджелудочной железы позволяет сохранять функцию β -клеток только на протяжении короткого периода времени. При 4 °С островки поджелудочной железы крысы способны сохранять способность выделять инсулин в присутствии глюкозы после 4 ч хранения в бикарбонатной среде или до 48 ч экспонирования в растворе Хенкса. После интрапортальной трансплантации крысам таких клеток явления диабета в значительной мере снижаются. Подобные результаты получены также после аутотрансплантации собакам β -клеток, хранившихся в культуре ткани при 4 °С на протяжении 24 ч. После пересадки фрагментов железы концентрация сахара в крови снижалась до нормальных величин. Однако если железу хранить при 4 °С в течение 48 ч, то после пересадки у собак наблюдается гипергликемия.

В принципе подготовка кусочков тканей поджелудочных желез к гипотермическому консервированию производится по той же методике, что и других тканей, и включает на первых этапах промывку их сбалансированным солевым раствором при 4 °С. Следующий этап — хранение железы — зависит от состава среды. Так, хранение ткани железы в растворе Рингера, содержащем лактат, вызывает нарушение ее функции через 24 ч, а в растворе Колинза, в состав которого включены низкомолекулярные фракции селикагеля, — через 48 ч. Метод пульсирующей перфузии поджелудочных желез собак криоосажденной плазмой в течение 24 ч в условиях гипотермии оказывается эффективным в том случае, если в состав перфузата ввести 5—7 г/л декстрозы, 200 мл/л альбумина крови человека, метилпреднизолон как мембранстабилизирующее вещество, а осмолярность среды довести до 300—310 мосм/л.

Для удлинения времени сохранения тотальной консервации трансплантата, способного нормально функционировать после пересадки, разработаны клинические способы дренирования поджелудочного сока в гастроинтестинальный тракт в виде кожного лоскута, что продлевает жизнеспособность трансплантируемого органа до 3—5 нед. Более успешным решением проблемы явился способ уретрального анастомоза, который позволяет пролонгировать жизнеспособность трансплантированной панкреатической железы у собаки в течение двух лет. Однако перевязка протока панкреатической железы человека вызывает появление фистул, развитие панкреатита и некроз ткани.

Для длительного хранения поджелудочной железы и ее использования в клинической практике разработаны методы ее замораживания. Существует несколько вариантов криоконсервации клеток поджелудочной железы. Например, криоконсервацию β -клеток

можно успешно осуществлять при охлаждении в среде с 7,5%-м или 10%-м раствором ДМСО со скоростью 0,5—0,7 °С/мин до —100 °С, затем со скоростью 20 °С/мин до —150 °С, после чего погружать в жидкий азот. При использовании этой методики выработка инсулина деконсервированными клетками в культуре ткани и в организме реципиентов находится почти на уровне контрольных величин. Наиболее эффективным для замораживания β -клеток является раствор ДМСО, который в сочетании с медленными скоростями дает вполне удовлетворительные результаты.

Клиническое использование ткани поджелудочной железы в определенной мере тормозится иммунологической несовместимостью, хотя предварительная перфузия либо отмывка в культуральных средах несколько снижает ее антигенные свойства, а пассивирование ткани в таких средах уменьшает концентрацию на поверхности клеток некоторых видов антигенов, снижая иммунный ответ ткани. Для понижения иммуногенности β -клеток используют метод культивирования в сочетании с другими приемами иммунодепрессии. Например, введение реципиентам антилимфоидной сыворотки способствует тому, что клетки не отторгаются в течение 100 дней после их предварительного культивирования в газовой атмосфере CO_2 и O_2 . Аллотрансплантация β -островков после их культивирования без предварительного введения антилимфоидной сыворотки эффективна лишь в течение 24 дней.

Консервация овариальной ткани. Ткани яичника применяются для лечения больных с нарушением эндокринной функции этого органа, развившейся в результате таких врожденных его аномалий, как аплазия, гипоплазия, воспалительные процессы, новообразования и ряд других причин. При аллотрансплантациях яичники обычно функционируют короткий отрезок времени и, как правило, отторгаются из-за антигенной активности трансплантата. Для устранения этого явления овариальную ткань в случае кратковременного использования можно консервировать в парафине или в диффузионных камерах из амниотических оболочек с целью уменьшения контакта трансплантата с ложем реципиента. Подготовленные таким образом кусочки яичника трансплантируют в предбрюшинную клетчатку больных с тяжелыми формами аминорен и гипоменструального синдрома, что обеспечивает восстановление менструальной функции, а у некоторых пациентов способствует наступлению беременности. Несмотря на то что трансплантация овариальной ткани является эффективным методом немедикаментозного лечения гипоменструального синдрома, аминорен, посткастрационного климактерического синдрома и бесплодия или невынашивания беременности эндокринного генеза, она не нашла широкого клинического применения из-за отсутствия возможностей надежного способа ее хранения и подбора ткани по группе крови, резус-фактору и другим показателям, необходимым для трансплантации.

Разработка метода криоконсервирования яичников животных показала, что овариальную ткань в этих условиях можно длитель-

но сохранять без потери ее жизнеспособности и гормонального статуса. Фрагменты овариальной ткани человека можно консервировать под защитой криопротекторов ПЭО с М. м. 400 либо ДМСО. При этом ткань сохраняет свои свойства в течение 4 лет и способность к пролиферации, характерную для нативной ткани.

При пересадке криоконсервированной ткани человеку наиболее выраженный клинический эффект отмечен у пациентов, страдавших гипоменструальным синдромом, у которых в 92 % случаев наступает нормализация менструального цикла. Менее выраженный терапевтический эффект отмечен у больных, страдающих тяжелыми длительными аминореями. Длительность клинического эффекта трансплантата криоконсервированной овариальной ткани зависит от ряда причин: гормонального фона, на котором сделана операция, длительности заболевания и интенсивности лечения, выраженности нарушений нейро-гуморальной системы в регуляции менструального цикла, а также дистрофических изменений эндометрия. Повторную трансплантацию проводят больным через 1,5—2 года. Можно комбинировать пересадку консервированных тканей яичника с парентеральным введением гормонов.

Криоконсервация эмбриональных тканей. Криоконсервация и клиническое применение эмбриональных тканей являются перспективной областью криобиологии, так как эти ткани относительно хорошо переносят цикл замораживания — отогрева и отличаются пониженной иммунологической компетентностью.

Известно, что большим препятствием к клинической апробации клеток костного мозга является их высокая иммунологическая реактивность. Поэтому сейчас предлагают в качестве источника стволовых кроветворных клеток эмбриональную ткань печени человека, выполняющую в организме эмбриона кроветворную функцию вплоть до 24 нед развития плода. Опыты на лабораторных животных показывают, что аллогенные клетки эмбриональной печени могут защищать животных от гибели при летальном облучении, восстанавливать гемопоэз и иммунокомпетентность у реципиентов с глубокой аплазией кроветворения.

Поэтому эмбриональные ткани могут оказаться эффективными при лечении острой апластической анемии, лейкоза, тяжелой иммунологической недостаточности, а также при необходимости коррекции врожденных нарушений метаболизма. Для более широкого применения в клинической практике эмбрионального материала сейчас разработаны способы его криоконсервации. Забор целой печени и приготовление суспензии необходимо осуществлять как можно быстрее, а хранение ткани печени или целого эмбриона в условиях гипотермии не должно превышать 4—6 ч, так как процессы аутолиза быстро разрушают клетки. Криоконсервацию клеток эмбриональной печени следует осуществлять под защитой 15%-го глицерина или ДМСО, что позволяет сохранять жизнеспособность клеток на уровне 80 %. Результаты криоконсервации клеток эмбриональной печени будут лучше, если их замораживать

в сложной среде, содержащей 80 % раствора Хенкса, гемолитическую сыворотку и 10%-й раствор ДМСО.

Однако проблема осложняется тем, что эмбриональная печень содержит гетерогенный набор клеток, которые по-разному реагируют на воздействие низких температур. Поэтому после их деконсервации необходимо проводить широкое морфологическое и биохимическое тестирование, в частности на способность клеток-предшественников формировать колонии и кластеры при культивировании на полутвердых агаровых средах. Можно криоконсервировать гемопоэтические клетки эмбриональной печени человека под защитой 0,4—0,7 М раствора ДМСО с искусственной индукцией кристаллообразования, что обеспечивает 78 % сохранности клеток-предшественников.

Отдельные эмбриональные органы на очень ранних стадиях развития достаточно устойчивы к действию низких температур по сравнению с постнатальными органами. В частности, сердце эмбриона курицы на очень ранних стадиях полностью возобновляет сокращения после замораживания под защитой 30%-го раствора этиленгликоля или ДМСО.

Активность эмбриональных панкреатических клеток значительно выше, чем неонатальных, что объясняется их более высоким функциональным потенциалом, связанным с бурным ростом и развитием. Поэтому пересадка эмбриональных поджелудочных желез вызывает более выраженный клинический эффект у больных диабетом, чем пересадка зрелой железы. Например, 3—4 поджелудочные железы 18-дневных эмбрионов крыс могут полностью скорректировать диабет у взрослых животных, которым для этой же цели необходимо трансплантировать несколько десятков поджелудочных желез взрослых особей.

Эмбриональные панкреатические железы по сравнению с неонатальными более устойчивы к действию криопротекторов и замораживанию. Оценка сохранности 16,5- и 17,5-дневных эмбриональных панкреатических желез, проводимая путем ввода в культуру ткани меченных по ^{14}C аминокислот, показывает, что лучшие результаты могут быть получены при замораживании этих желез в среде с 2,0 М ДМСО и скоростью охлаждения 0,5—0,3 °C/мин и последующем размораживании их при 20 °C в растворе 0,75 М сахарозы. После пересадки таких деконсервированных эмбриональных трансплантатов под капсулу почки пяти реципиентам-диабетикам у трех из них в течение 2 нед отмечались нормогликемия и физиологический объем выделяемой мочи. Высокая криостабильность эмбриональных поджелудочных желез, их функциональная активность и низкая иммуногенность показывают перспективность дальнейшей разработки этой проблемы для клинической практики.

Консервация роговицы. Постоянно существующая и все возрастающая потребность в кератопластике связана с необходимостью создания запасов и длительного хранения роговой оболочки. Предложенный в 30-х годах академиком Филатовым метод хранения

роговицы при температурах, близких к 0 °С, который применяется и в настоящее время, позволяет сохранять биологическую полноценность этой ткани не больше 2 сут. Продлить срок хранения роговицы до 3—4 сут при 0 °С можно при использовании более сложных сред, например среды 199, содержащей коллоидные добавки, с осмолярностью 290 мосм/л и рН 7,4 с дополнительной оксигенацией. Кератопластика роговиц, хранившихся в этих условиях 24, 48 и 72 ч, дает прозрачные приживления в 87,6; 84,0 и 66,9 % случаев.

Глицерин как криозащитный агент эффективно предохраняет лишь клетки переднего эпителия, а ДМСО — клетки заднего эпителия роговицы. Сейчас чаще всего используют метод криоконсервации роговицы, при котором концентрация ДМСО в эквilibрационной среде повышается постепенно от 2 до 7,5 %, а для стабилизации клеток добавляют 25 % сывороточного альбумина и сахарозу, в которой роговица выдерживается не менее 10 мин при комнатной или гипотермической температуре (0—4 °С).

При замораживании можно использовать двухступенчатую скорость охлаждения: вначале 1—3 °С/мин до —14...—15 °С, а затем 5 °С/мин до —80 или —60 °С с последующим погружением в жидкий азот. Для удаления криопротектора из размороженной роговицы применяют растворы альбумина либо отмывают ее в средах без криопротектора. Недостатком способа криоконсервации роговицы под защитой ДМСО является то, что при этом все же повреждаются клетки заднего эпителия. Поэтому целесообразно комбинировать замораживание роговицы с применением 10%-х растворов глицерина или диметилацетамида, при котором клетки заднего эпителия лучше сохраняются, чем при индивидуальном применении ДМСО.

Хорошие результаты дает способ длительного хранения роговицы при —196 °С под защитой 10%-го полиэтиленоксида с М. м. 400, поскольку он стабилизирует плазматическую мембрану клеток и на два порядка уменьшает размеры кристаллов льда. С помощью ³H-тимидина доказано, что криоконсервация роговицы под защитой ПЭО-400 позволяет осуществить истинное приживление заднего эпителия в трансплантированных фрагментах, т. е. разработанная методика криоконсервации роговицы человека с использованием ПЭО-400 по своим трансплантационным свойствам почти не уступает нативной роговице, что позволяет создавать ее запасы и при необходимости осуществлять быстрый отбор ее из криобанков.

Консервация кожи. Кожа является универсальной полуфункциональной системой организма, и ее трансплантация после различного рода повреждений предотвращает испарение влаги организмом, потерю белков, ионов, стимулирует образование фагоцитов, способствует удалению некротических остатков и препятствует микробному загрязнению раны. Биологической повязкой может быть криоконсервированная, или лиофилизированная, кожа. Из числа биологических заменителей кожи в настоящее время

с наибольшим успехом используют хориоамнион, который получают из плаценты. Кожные лоскуты, взятые от донора, можно хранить при 4 °С от нескольких недель до двух месяцев в среде 199 с добавленным 10%-й эмбриональной сыворотки теленка.

Длительность сохранения кожи в замороженном состоянии зависит во многом от температуры хранения, а время эквilibрации — от вида применяемого криопротектора и толщины кожного лоскута. Чаще всего используют сбалансированные солевые растворы Рингера — Локка либо другие, содержащие 15%-й глицерин или 10%-й ДМСО. После медленного (5—10 °С/мин) замораживания кожи до —196 °С ее можно сохранять в жизнеспособном состоянии длительное время. Хранение кожи в замороженном состоянии при температуре —30 °С дает значительно худшие результаты, так как разрушается ее структура. В случае применения таких медленно проникающих криопротекторов, как, например, ПЭО с М. м. 400 или ПВП, требуется более длительная, чем в растворах глицерина и ДМСО, эквilibрация образцов. Этиленгликоль и диэтилацетамид для криоконсервации кожи оказались малоэффективными. Лучше всего кожу эквilibрировать с криозащитными веществами при температуре не выше 4 °С, поскольку при этой температуре криопротекторы в концентрации до 2,1 М не оказывают повреждающего действия на клетки. Кожные трансплантаты можно замораживать программно: двухэтапно с остановками и без них, трехэтапно и т. д. Например, при замораживании кожи под защитой ПЭО с М. м. 400 на первом этапе образцы охлаждаются со скоростью 3—4 °С/мин до 0 °С, на втором — со скоростью 20—30 °С/мин до —80 °С, а затем погружают в жидкий азот. Оттаивание образцов осуществляют на водяной бане при температуре 40 °С. При использовании этого метода приживляемость криоконсервированной кожи достоверно не отличается от приживления нативной, а трансплантированная на раневые поверхности сохраняет свои свойства в течение более чем 30 сут, т. е. является эффективной биологической повязкой.

Криоконсервирование лоскутов кожи в разных криоконсервантах по-разному влияет на их иммуногенность, особенно аллогенных трансплантатов. Изучение антигенных свойств замороженной с глицерином или ДМСО и лиофилизированной кожи показывает, что при этих способах консервации активность трансплантационных антигенов одинакова. Однако криоконсервация аллотрансплантатов кожи с 15 % ПЭО с М. м. 400 снижает иммуногенность в сравнении с нативной.

Стремление оптимизировать способы длительного хранения кожи привело к появлению всевозможных их разновидностей, отличающихся сроком хранения и объемом восстановления после криоконсервации. Исследования свойств кожи после криоконсервации под защитой 15%-го глицерина или ДМСО показывают, что последний является более предпочтительным криопротектором, хотя это справедливо не во всех случаях. Поэтому при криоконсервации дермо-эпидермальных лоскутов под защитой глицерина или ДМСО

в состав криозащитной среды целесообразно включать также различные энергетические соединения, коллоидные добавки и ингибиторы метаболизма.

Консервация костей и хрящей. Консервация костей и хрящей при температурах 0—8°C способствует их хранению примерно 2—3 нед.

Существуют методики замораживания и хранения костей и хрящей при минусовых температурах —10, 30, 70, 80, 183 и 196°C, которые позволяют сохранять эти биоматериалы от 2 нед до нескольких лет. При температурах —20...—30°C в клетках костно-хрящевой ткани возникают физико-химические процессы, которые ухудшают качество трансплантатов, поскольку при этом полностью разрушаются хондроциты и остеобласты. Это происходит в результате того, что при температурах —20...25°C в закристаллизованной матрице сохраняются жидкие микрофазы, содержащие концентрированные растворы солей, которые оказывают отрицательное влияние на состояние плазматической мембраны клетки и мембраны внутриклеточных органелл. Поэтому костные или хрящевые трансплантаты в настоящее время консервируют в жидких средах, в состав которых входят чаще всего такие криопротекторы, как глицерин или ДМСО в 15%-й концентрации. Эффективностью также обладают витрифицирующие растворы на основе ДМСО, глицерина, 1,2-пропандиола и ацетамида. Обычно фрагменты либо цельные костно-хрящевые эксплантаты замораживают в таких криопротекторных смесях с использованием быстрых скоростей и хранят при температурах —80 или —196°C.

Костные эксплантаты можно консервировать также методом лиофилизации при температурах —25...—70°C. Процедура лиофилизации костной ткани продолжается несколько суток, в результате чего биоматериал теряет около 90% воды и приобретает высокую устойчивость при хранении в герметизированной таре в асептических условиях при температуре —25°C. Это позволяет создавать большие запасы костной ткани, поскольку в высушенном состоянии она хорошо и длительно сохраняется.

Гипотермическая консервация органов

Консервация органов может быть осуществлена несколькими способами. Во-первых, способом нормотермической перфузии с помощью биологически активных смесей, которые способствуют сохранению функций клеток на протяжении нескольких часов. Во-вторых, путем их охлаждения до 0—4°C в сложных растворах, содержащих биологически активные вещества, пролонгирующие уровень метаболизма в клетках. Однако такие методы позволяют сохранять орган от 2 до 12 ч, поскольку не обеспечивают однородного проникновения защитных растворов внутрь тканей органов и эффективно не предотвращают в них аутолитические процессы. В-третьих, способом, сочетающим охлаждение до 0°C и

непрерывную перфузию органов, что позволяет их хранить более длительный период времени (12—72 ч).

Проблемы ишемии при консервации органов. Во всех случаях консервации изолированных органов одной из важных задач являются профилактика и торможение процессов аутолиза тканей, которые активируются при развитии и углублении их ишемии.

Разные органы в изолированном виде по-разному реагируют на развитие ишемии. Например, кадаверная почка переносит ишемию в течение 1,5—2,0 ч при температуре 18—20 °С. Через 1,5 ч в такой почке снижаются дыхательный коэффициент и соотношение АТФ/О, одновременно нарастают процессы анаэробного гликолиза. Однако на протяжении этого времени почки еще сохраняют свои функциональные свойства (выделение мочи, сохранение эффективного почечного кровотока, регуляция уровня мочевины, K^+ и Na^+ в крови и моче). При температурах 0—4 °С уровень функциональных свойств тканей органа существенно удлиняется — 12 ч и несколько больше.

Предельно допустимый срок ишемии выделенного при 22 °С легкого экспериментальных животных также колеблется от 1,5 до 2 ч, а при охлаждении до 0—4 °С в условиях гипербарической оксигенации его функция может быть сохранена до 12 ч, хотя в клетках уже происходит нарушение процессов биосинтеза, биоэнергетики и ионного транспорта. При этом через 30 мин после развития ишемии наблюдается необычный пик активности функциональных возможностей ткани легкого, при котором оно еще хорошо выполняет роль оксигенатора.

В случае забора печени при 22 °С через 30 мин ее функциональная активность снижается в незначительной степени, однако при этом энергообмен, биосинтез белков и нуклеиновых кислот начинают снижаться, т. е. нарушаются процессы обмена веществ.

Печень человека и различных животных по-разному чувствительна к действию факторов ишемии. Печень человека выдерживает гипоксию при комнатной температуре до 30 мин, собаки — 1 ч, крысы — 2 ч. В гипотермических условиях сроки «переживания» печени несколько увеличиваются.

Сохранение свойств органа при консервации во многом зависит от его размера и особенно природы. Например, миокард более чувствителен и не выдерживает гипотермическое хранение более 12 ч, в то время как почка хорошо сохраняет свои свойства в течение 24 ч и даже более продолжительное время и при температурах 0—4 °С.

В нормально функционирующем организме или органе существует равновесие между кровотоком и потребностью органов в кислороде и метаболитах. При искусственной гипотермии органа это равновесие нарушается, в результате чего в клетках развиваются процессы распада внутриклеточных структур и лизис клеток. Триггером в этой цепочке является недостаток кислорода, снижение содержания которого в органе вначале тормозит, а затем полностью блокирует работу митохондрий. В таких условиях энерго-

обеспечивающая функция митохондрий нарушается, и количество макроэргов резко падает. Возникший дефицит АТФ, АДФ, креатининфосфата и других видов макроэргов приводит к нарушению ряда эндергонических процессов. Например, в миокарде изменяется сократительная функция, нарушаются транспорт ионов и метаболитов через мембраны СПР, ионный гомеостаз, структура и функция митохондрий и лизосом, а также других клеточных органелл. Наряду с недостатком кислорода в охлажденных органах нарушается баланс притока и оттока метаболитов. Если приток метаболитов в условиях их органического окисления не очень отражается на дальнейшем развитии нарушений, то накопление продуктов анаэробного метаболизма в ишемическом органе ведет к углублению аноксии, дезинтеграции структур и их аутолизу. К числу продуктов, оказывающих токсическое воздействие на структуры клеток, следует отнести снижение величины внутриклеточного рН и накопление недоокисленных радикалов в цикле ферментативных реакций, в частности фосфолипидного гидролиза фосфолипидов, а также перекисного окисления липидов. Одним из существенных факторов повреждения при ишемии органа являются лизосомальные гидролазы, которые начинают накапливаться в свободном виде в цитоплазме клеток.

Для предотвращения развития и углубления ишемического синдрома в тканях консервируемого органа в настоящее время используют различные сложные перфузионные растворы, в которые вводят биоэнергетические вещества, ингибиторы метаболизма, антиоксиданты, сбалансированные солевые растворы, буферные системы, необходимые для поддержания рН, коллоидно-осмотические соединения, используемые в качестве противоотечных средств, а также фармакологические препараты типа глюкокортикостероидов, диуретиков, вазодилататоров, мембранных стабилизаторов. Из числа диуретиков наиболее часто применяются фурасемид, который увеличивает выделение почками Na^+ . Кортикостероиды, стабилизируя мембраны клеток, предупреждают разрушение лизосом и вместе с тем подавляют иммуногенность тканей. Поэтому гипотермическое хранение крупных по размеру органов зависит как от способов перфузии, так и от состава перфузата. При этом выбор состава перфузата имеет решающее значение.

Успех гипотермической консервации органов в определенной степени также зависит от предварительной обработки донора фармакологическими растворами, и в частности фурасемидом, приготовленным на среде Коллиза. Однако в условиях гипотермии реакция клеток органа на действие различных биопрепаратов не адекватна их действию в нормально функционирующих органах, поскольку при снижении температуры органа существенно преобладает функция клеточных рецепторов, например адренорецепторов, а также других рецепторов, снижается выработка АТФ и модифицируется барьерная роль мембраны.

Одним из опасных осложнений при гипотермическом хранении органов является их отек, связанный с потерей барьерных свойств

клеток эндотелия сосудов, чувствительных к понижению температуры и концентрации АТФ. Для предупреждения развития отека удаленный из организма орган обычно промывают сбалансированными солевыми растворами, содержащими экстрацеллюлярные коллоидные компоненты, например декстран, гидрооксизтилкрахмал, сыворотку крови, гемацель, альбумин или манитол. Для перфузии сердца обычно используют раствор Рингера и Кребса, а почки — гипертонический раствор Коллинза. Модифицированные растворы Коллинза содержат ряд фармакологических препаратов, например феноксибензамина и альбумина, а также флюокарбон для снижения дефицита O_2 . В качестве перфузата для консервации почек иногда используют сбалансированные солевые растворы, содержащие в своем составе преципитированную сыворотку, применение которой сочетается обычно с оксигенацией перфузата.

Состав растворов и все параметры процесса гипотермической перфузии органа должны быть рассчитаны на однородное распределение перфузата во всех элементах, поэтому такие параметры, как скорость потока и давление раствора перфузата, должны быть адекватны величинам нормального кровотока.

В последнее время для консервации крупных органов (почка, сердце, печень) с успехом начал применяться сложный перфузионный раствор, созданный в Висконсинском университете (США), который обозначается как *UW*. Существуют две основные модификации раствора: *UW-L* и *UW-G*, т. е. лактобионатный и глюконатный. Состав *UW-L* следующий: K^+ — лактобионата — 100 мМ; KH_2PO_4 — 25 мМ; $MgSO_4$ — 5 мМ; раффинозы — 30 мМ; гидроксизтилкрахмала — 50 г/л; аденозина — 5 мМ; глутатиона — 3 мМ; инсулина — 100 *ie/l*; пенициллина — 100 *ie/l*; дексаметазона — 8 мг; аллопуринола — 2 мг. Гипотермическая перфузия этими растворами позволяет сохранять функцию сердца до 24 ч, а почки — до 72 ч. Для гипотермической консервации почки при 4 °С английские исследователи предлагают также использовать так называемый гипертонический раствор HP-16, который по эффективности не уступает *UW*-среде и содержит в своем составе коллоидные желатинизированные полипептиды, например гемацель, продукты гидролиза крахмала как осмотические буферы, а также ингибиторы Ca^{2+} , фосфолипаз и протеаз (бензанидин, мерсалил).

Гипотермическая консервация крупных по размеру органов (печень, сердце, почка) в настоящее время проводится главным образом с использованием перфузионных растворов довольно сложного состава, поскольку проблема их криоконсервации пока находится в стадии экспериментальных поисков. Криоконсервация крупных по размеру органов невозможна по той причине, что они достаточно обводнены и кристаллизация воды сопровождается их механическим разрывом и необратимым повреждением первоосудистого комплекса.

Консервация органов при температурах 0—4 °С позволяет более продолжительное время, чем при 22 °С, поддерживать их жизнеспособность, поскольку подавляет развитие в них процессов ише-

личных добавок, которые в совокупности образуют сложные многокомпонентные эвтектические смеси.

Температура, при которой вся вода биоматериала кристаллизуется, называется температурой полного затвердевания $T_{\text{н}}$, и она может служить нижней границей при расчете температурной зоны замораживания. Для большинства биоматериалов $T_{\text{н}}$ находится в диапазоне от -40 до -60 °С, а в некоторых случаях — от -70 до -90 °С. Температура, при которой биоматериал начинает размораживаться, определяется как температура начального плавления кристаллов льда $T_{\text{п}}$. При этом $T_{\text{п}}$ значительно выше $T_{\text{н}}$, поскольку образующиеся в процессе замораживания эвтектические смеси переохлаждаются и задерживают процесс кристаллизации в разных температурных зонах, т. е. такую систему можно переохлаждать до более низких температур. При этом замороженные смеси будут плавиться при более высоких температурах. Если биоматериал в процессе сушки выдерживать при температуре ниже $T_{\text{н}}$, то продолжительность этой процедуры значительно увеличивается, а себестоимость готовой продукции возрастает. Поэтому на практике весь процесс сушки проводят при более высокой, максимальной температуре начального плавления кристаллов льда.

Единого мнения о влиянии скоростей замораживания на эффективность цикла сублимационной сушки до настоящего времени не существует. С одной стороны, полагают, что лучшие результаты сублимационной сушки могут быть достигнуты при медленном замораживании, с другой — наоборот, более предпочтительно быстрое замораживание. Вопрос этот довольно сложный, если учесть всю сложность первого этапа — процесса криоконсервирования, который состоит, по крайней мере, из трех основных стадий: эвклибрационной, когда биоматериал инкубируют со сложными компонентами криозащитных и стабилизирующих растворов; стадии замораживания, при которой с помощью скоростей охлаждения регулируют оптимальную степень дегидратации клеток, а также характер кристаллизационных процессов, и, наконец, стадии отогрева, на которой путем регидратации биоматериалов регенерируют их свойства.

На всех указанных выше стадиях цикла криоконсервирования происходят потери клеток. Так, на первой стадии клетки могут разрушаться в результате температурного шока, если скорость охлаждения и тоничность среды не будут достаточно оптимизированы. Эта стадия может внести большой вклад в сохранение (или несохранение) структурно-функциональных параметров биоматериалов, подготавливаемых для лиофилизации.

На стадии замораживания также происходят потери клеток в результате действия «эффекта растворов» или внутриклеточных кристаллов льда. При этом характер формируемых в системе кристаллов льда будет зависеть от скорости охлаждения, природы и концентрации защитных компонентов. При медленном замораживании основная масса окружающего клетку раствора замерзает

раньше, чем находящегося непосредственно внутри клетки, т. е. клетки, окруженные внешним льдом, содержат внутри квазикристаллическую смесь при температурах $-5...-7^{\circ}\text{C}$. При высоких скоростях замораживания и температурах $-25...-30^{\circ}\text{C}$ около 80—85 % воды внутри клетки кристаллизуется, остальная доля незакристаллизованной воды замерзает при температурах $-40...-70^{\circ}\text{C}$.

В зависимости от реализации того или иного механизма кристаллизации возникают различные криповреждения, степень выраженности которых зависит от природы биоматериала, и в частности от структуры и барьерных свойств мембран клеток, составляющих ту или иную ткань или орган. Например, быстрое замораживание говяжьего мяса со скоростью $70-80^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ способствует увеличению его жесткости и уменьшению сочности продукта, в то время как после более медленного охлаждения со скоростью $\sim 10-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры $-70...-80^{\circ}\text{C}$ потеря экстрактивных веществ резко снижается и органолептические свойства продукта сохраняются в полной мере. Однако замороженное филе мяса не рекомендуется хранить при $-15...-20^{\circ}\text{C}$, поскольку оно утрачивает способность удерживать экстрактивные внутриклеточные вещества и подвергается холодной денатурации ввиду увеличения времени экспонирования биообъекта в зоне температур, когда наиболее выражено действие «эффектов раствора».

Если лиофилизировать продукт из такого состояния, то он потеряет свои ценные питательные качества и свойства, так как денатурированные белки плохо регидратируются и быстро разрушаются под влиянием протеолитических ферментов, которые активируются в тканях после замораживания. Повреждение белков при медленном охлаждении начинает развиваться уже при температурах $-3...-5^{\circ}\text{C}$, когда в микрофазах льда существенно изменяются рН и ионная сила раствора. Так, если суспензию молока медленно замораживать до -30°C , то рН в ней при температуре -5°C снижается с 7,0 до 5,8.

Увеличение тоничности среды с понижением температуры разрушает структуру связанной воды, что ведет к изменению нативной конформации белков, липидов и других биоконплексов. Поэтому в цикле лиофилизации для защиты биоматериалов от повреждений широко используют различные криопротекторы (глицерин, ДМСО, полиэтиленгликоли), мембранные стабилизаторы, ингибиторы метаболизма, различные соли и буферные растворы. Однако такая сложная многокомпонентная смесь, хорошо защищающая биоматериалы от разрушения на стадии замораживания, может оказать негативное влияние на ход второй стадии — сублимационной сушки, поскольку, например, глицерин либо полиэтиленгликоли плохо поддаются сушке, т. е. такая смесь не лиофилизируется. Поэтому перед реализацией процесса сублимационной сушки биоматериала необходимо экспериментально разработать такой состав криозащитного коктейля либо криопротектора, который способен хорошо сублимироваться.

Непосредственный цикл сушки включает три основные стадии. Первая связана с генерированием энергии, мощностью которой должна быть равной (либо несколько больше) скрытой теплоте сублимации. Источниками энергии может быть подвод с помощью излучения, например оптическими квантовыми генераторами, СВЧ-излучением, методом кондукции или конвекции. Интенсивность и кинетика процесса сублимации зависят от вида и темпов энергоподвода, а также создания вакуума в сублиматоре и постоянного отвода из камеры образующегося пара путем применения сорбентов, вакуум-насосов или вымораживанием пара. При непрерывном подводе тепла в условиях вакуума молекулы жидкого вещества отрываются от поверхности кристаллов льда и возгоняются. Интенсивность и глубина процесса возгонки определяется размером кристаллов и естественной пористостью льда.

При сублимационном обезвоживании влагосодержащих материалов водные пары при сублимационной сушке возгоняются не с геометрически правильных поверхностей, а с закристаллизованных структур льда и биообъекта, которые имеют сложно-коллоидное строение, в котором находятся извитые каналы, микротрещины, из которых возгонка паров затруднена. Наоборот, в биоматериалах с пористой структурой (например, белковые гели) интенсивность сублимации влаги выше, чем в биоматериалах с коллоидной структурой.

При сублимации основной массы закристаллизованной влаги часть ее — прочно связанная фракция — остается в жидком состоянии в процессе сублимационной сушки и в таком небольшом количестве ($\sim 1-2\%$) остается в биообъекте. Сохранение фракции прочно связанной воды в биоматериалах в процессе сублимационной сушки является важным, так как позволяет поддерживать нативную конформацию биополимеров, которые после регидратации не теряют своих биологических свойств.

В процессе сублимационной сушки эвакуация парогазовой смеси через извитые каналы и из сублиматора зависит от степени его вакуумирования, уровень которого характеризуется критерием Кнудсена, представляющим собой отношение средней длины свободного пробега молекул газа λ_c к характерному размеру канала, по которому идет перемещение газа: $K_n = \frac{\lambda_c}{L}$. При $\lambda_c \ll L$ режим движения называется ламинарно-вязкостным, или диффузионным; при $\lambda_c \gg L$ — молекулярным или эффузионным, при $\lambda_c \sim L$ — эффузионно-диффузионным или скользящим. Если давление в сублиматоре достигает 133,3 Па, то эвакуация парогазовой смеси носит молекулярный или молекулярно-вязкостный характер. Режимные параметры транспорта и эвакуации парогазовой смеси в извитых каналах, которые практически влияют на исходы сублимационной сушки, имеют важное значение в теории и практике лиофилизации биоматериалов.

Вторая стадия сублимационной сушки включает непосредственный процесс возгонки кристаллической фазы из биоматериалов в условиях вакуума. Большинство частиц твердого тела не может мгновенно переходить в пар с одинаковыми скоростью и вероятностью. В процессе сублимационной сушки вначале молекулы H_2O начинают перемещаться в поверхностные слои льда, а затем, мигрируя по поверхности матрицы, переходят в поверхностный адсорбционный слой и возгоняются в виде пара.

Перенос энергии в твердых телах происходит сложнее, чем в жидкостях, поскольку в твердом веществе радиус упорядоченного взаимодействия молекул значительно выше, чем в жидкости. Поэтому для преодоления сил взаимодействия молекул, покидающих поверхность испарения, требуется значительно больше энергии, чем для отрыва таких же частиц с поверхности жидкости. При этом затрата энергии идет не только на десорбцию отдельных молекул, но и на разрушение кристаллов льда. Поэтому процесс отрыва молекул в сублиматоре может осуществляться только в условиях регулируемого вакуума, поскольку для осуществления непрерывного процесса сушки требуется постоянный отвод оторвавшихся молекул пара из объема сублиматора.

Если постоянный отвод парогазовой смеси не будет осуществляться, то процесс сублимации вначале замедлится, а затем прекратится, поскольку возникает феномен «возвращенных молекул» на поверхности сублимации, который приобретает циркулярный характер. Для отвода парогазовых смесей из сублиматора чаще всего пользуются методом их вымораживания, т. е. перевода в конденсированное, твердое состояние.

Третьей стадией сублимационной сушки является процесс регидратации биоматериала из высушенного во влажное состояние. Эта стадия достаточно важна, так как темпы, характер и способ гидратации сублимационного объекта сильно влияют на свойства биоматериалов.

Продолжительность первичной сушки обычно не превышает 15—20 мин и зависит от объема, мощности вакуум-насосов установки, а также природы, условий, характера и интенсивности подвода энергии в зону сублимации.

Технологический процесс сублимационной консервации

Технологический процесс сублимационной консервации биоматериалов включает следующие этапы: отбор и предварительную подготовку биоматериалов; замораживание, сублимационную сушку, упаковку и хранение; регидратацию сублимированных биоматериалов.

Упаковка и хранение имеют важное значение в связи с особенностями свойств высушенных биоматериалов, поскольку сублимированные биоматериалы представляют собой пористые системы, обладающие большой адсорбционной способностью. Часто такие

биоматериалы сублимируют в стеклянной или другой таре, а затем герметизируют. На свойства хранящихся лиофилизированных биоматериалов оказывают влияние температура, атмосфера хранения и величина остаточной влажности. Поэтому хранить лиофилизированные препараты целесообразно при температурах 0...—5 °С.

Упаковка сублимированных биоматериалов должна надежно обеспечивать изоляцию их от воздействия CO_2 , воздуха и света, предотвращать сорбцию влаги из внешней среды. При этом упаковочные материалы должны надежно предотвращать потерю естественного аромата и цвета биоматериалов, а также защищать их от механических повреждений.

Поэтому хорошие результаты могут быть достигнуты в том случае, если упаковку сублимационного биоматериала проводить в бескислородной среде. Снижение содержания O_2 в упаковке достигается различными способами. Для этих целей используют, например, инертные газы (N_2 , CO_2), соединения палладия, которые катализируют взаимодействие O_2 с H_2 , либо фермент глюкозооксидазы, ускоряющий реакцию окисления глюкозы молекулярным O_2 . Содержание O_2 в смеси газов не должно превышать 1 %. Хотя CO_2 и способствует сохранению органолептических и биологических свойств биоматериалов, однако его длительное присутствие в упаковочной таре нежелательно, так как вызывает ухудшение их физико-химических параметров (табл. 45). Как видно, спустя 7 мес хранения в атмосфере CO_2 кусочки мяса потеряли ряд своих свойств, несколько изменился вкус, повысилась жесткость и снизились остальные показатели.

Таблица 45. Физико-химические и органолептические свойства сублимированного мяса после различных сроков хранения в атмосфере CO_2 при 30 °С

Показатель	2 нед			7 мес		
	1	2	3	4	2	2
Вкус	4,84	4,92	4,92	5,25	5,08	4,82
Мягкость	3,67	3,50	3,52	3,33	3,00	2,64
Степень восстановления, %	96,6	84,0	77,6	81,5	81,1	70,2
Показатель цветности (по шкале калориметра)	6,3	6,5	12,3	9,9	8,5	8,8

Примечание. Содержание O_2 в упаковке: 1—2 %; 2—0,1 %; 3—90 %.

В настоящее время для хранения сублимационных продуктов используется жестяная, стальная и алюминиевая тара, а также композитные полимерные материалы. Стеклоянная тара применяется только в отдельных случаях. Однако полимерная тара в ряде случаев пригодна только для кратковременного хранения биоматериалов. Так, в таре из двухслойной пленки полиэтилен-целлофан биоматериалы, содержащие 2 % влаги, можно хранить при 20 °С в атмосфере азота около 3 мес. Например, тара из майлара, сарана, вискотена и их комбинаций позволяет хранить биоматериалы

лы при 20 °С не более 1—1,5 мес. Четырехкомпонентная тара на основе целлофан-полиэтилен-фольга-полиэтилена и целлофан-полиэтилена, армированная фольгой, позволяет хранить биоматериалы в вакууме при температуре 20—25 °С соответственно 9 и 7 мес. Хорошими барьерными свойствами обладает пятислойная (саран-целлофан-полиэтилен-фольга-полиэтилен) и трехслойная тара (алюминиевая фольга в комбинации с виниловой и полиэтиленовой пленками), а также тара из полиолефиновых пленок, армированных фольгой.

Регидратация сублимационных биоматериалов. Лиофилизированные биоматериалы перед использованием подвергают регидратации с целью восстановления их исходных свойств. Однако в процессе замораживания и особенно сублимационной сушки в биоматериалах возникают структурно-функциональные изменения, которые изменяют свойства белков, и в частности способность их к гидратации. Так, хорошо известно, что в цикле замораживание — сублимационная сушка в биоматериалах в результате развития неферментативных и ферментативных процессов, приводящих к денатурации биополимеров, текстура продуктов растительного и особенно животного происхождения модифицируется, происходит потеря летучих ароматических веществ, повышается жесткость белков. Поэтому продукты овощного и фруктового происхождения после сублимационной сушки содержат определенное количество белка в денатурированном состоянии, который имеет различную способность к регидратации. Повышение жесткости мяса, связанное с повышением агрегации и денатурации белков, зависит от интенсивности образования межмолекулярных ковалентных S—S-связей в результате окисления активных SH-групп. Растворимость белков изменяется также под влиянием протеолитических и лизосомальных ферментов, свободных жирных кислот и продуктов перекисного окисления липидов.

На свойства хранимых лиофилизированных биоматериалов существенное влияние оказывают остаточная влажность и концентрация атомарного O₂. При его поступлении в сублиматор в результате нарушения его вакуумирования происходит окисление витаминов, ферментных белков и пигментов, например каротиноидов, хлорофилла, гемо- и миоглобина, изменение цветности и вкусовых качеств материала, развивается его побурение. При содержании в биоматериале, например в сублимированном молоке, менее 1 % остаточной влаги развиваются процессы автоокисления и последующего распада биополимеров. Однако при более высоком содержании влаги (1,5—2 %) указанные выше процессы тормозятся, так как вода образует защитную пленку, предупреждая контакт O₂ с биоматериалом. Вместе с тем оставшаяся в сублимированном продукте вода является средой, в которой возможна активация некоторых нежелательных ферментативных реакций, например активация лизосомальных гидролаз, фенолаз, липооксидаз, пероксидаз. Поэтому при реализации процессов сублимационной сушки необходимо использовать соответствующие ингибиторы метаболиз-

ма и мембранные стабилизаторы, повышающие устойчивость биоматериалов.

Сублимационная консервация микроорганизмов и биопрепаратов. Методом лиофилизации можно консервировать только определенные штаммы микроорганизмов, поскольку не все они переносят этот способ консервации. Для повышения жизнеспособности микроорганизмов используют различные естественные среды — сыворотку, молоко, бульон, пептон, сахарозу, глюкозу, лактозу, а также индивидуальные стабилизаторы (аминокислоты, глутамат натрия, некоторые синтетические полимеры — традиционные криопротекторы), коллоидные вещества (желатина, агар-агар) и их комбинации. Например, среда содержит 30 % сыворотки, 10 % бульона и 7,5 % глюкозы. Важно, чтобы содержание гидрофильных веществ и солей в таких средах было оптимальным, поскольку их избыточная концентрация удлиняет сроки сушки и снижает растворимость сухого препарата.

Лиофилизация микроорганизмов как метод сейчас используется для длительного хранения только отдельных штаммов микроорганизмов, поскольку в процессе сушки возникают нарушения структурно-функционального состояния генетического аппарата, мутации, хромосомные aberrации. Однако те штаммы, которые хорошо переносят весь цикл замораживания — высушивания, сохраняют высокий титр жизнеспособности на протяжении десятков лет. Например, по данным Американской коллекции типовых культур, некоторые виды грибов после лиофильной сушки сохраняют жизнеспособность при температуре 4 °С в течение более 40 лет хранения.

Из табл. 46 видно, что жизнеспособность актиномицетов после замораживания под защитой 20%-го глицерина или лиофилизации с последующим хранением в течение года различается. После лиофильной сушки хорошо сохраняется только два вида, а другие виды микроорганизмов не устойчивы к высушиванию. Некоторые промышленные штаммы *Sfropromycens*, *Arshrobacter simlex* весьма неустойчивы к лиофильной сушке, хотя вид *St. griseus* достаточно хорошо сохраняется после лиофилизации на протяжении

Таблица 46. Жизнеспособность актиномицетов после замораживания и лиофильной сушки, %

Вид актиномицетов	Замораживание и хранение при -20 °С	Лиофилизация и хранение при 4 °С
<i>Streptomyces xanthophacus</i>	35,7	0,4
<i>Str. scabies</i>	34,2	0,7
<i>Str. michiganensis</i>	22,1	3,2
<i>Str. griseus</i>	49,5	17,5
<i>Str. viridochromogenes</i>	120,0	13,5
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	121,0	55,3
<i>Nocardia opaca</i>	19,5	63,4

5 лет при отрицательных температурах хранения. Плохо переносят процесс лиофилизации практически все виды *E. Coli*. По данным западногерманской коллекции микроорганизмов, лиофилизация фототропных бактерий приводит к нарушению их генетического

аппарата, в то время как хранение в жидком азоте надежно гарантирует сохранение основных генетических признаков. В настоящее время большой фонд коллекций бактерий, грибов, вирусов животных и водорослей в Американской коллекции типовых культур хранится исключительно в жидком азоте, а лиофилизированные культуры используются в основном для рассылки.

В последнее время для улучшения исходов сублимационной сушки микроорганизмов используют комбинированные методы: предварительное обезвоживание клеток на сухих носителях (силикагель, декатрон, крахмал, сухое молоко) или иммобилизация их на подложках (целлюлоза, коллаген) с последующим циклом сублимационной сушки. Так, например, многие виды микроорганизмов, разрушающиеся при традиционной сублимационной сушке из жидкой суспензии, могут быть успешно высушены после концентрирования суспензии клеток и осаждения на предварительно обезвоженные силикагель, декстрины или крахмал.

Для хранения высушенных микроорганизмов чаще всего используют низкие температуры, которые обеспечивают поддержание исходного титра жизнеспособных клеток без изменения их специфических свойств.

Гораздо лучше при сублимационной сушке сохраняются вирусные препараты, если лиофилизацию проводить в защитных средах. При лиофилизации вирусов вполне приемлемой можно считать температуру сублимации в пределах верхней границы эвтектической зоны NaCl ($-22...-25^{\circ}\text{C}$). Использование более низких температур сильно увеличивает продолжительность сублимационной сушки. Важным параметром лиофилизации является скорость сублимации: при высоких скоростях сушки вероятность повреждения вирусов больше, чем при медленных режимах. Медленное высушивание при температуре -70°C полностью сохраняет свойства такого температурочувствительного вида, как вирус полиомелита.

В настоящее время метод лиофилизации хорошо используется для длительного сохранения различных вирусных вакцин (вирус-вакцина псевдочумы птиц, оспенная вакцина животных и птиц, вакцина чумы крупного рогатого скота, клещевого энцефалита и др.). Вместе с тем большинство штаммов вирусов, используемых для получения вакцин, повреждаются при сублимационной сушке. Однако в суспензиях, обогащенных белковыми коллоидными веществами, сахарами либо другими гидрофильными соединениями, устойчивость вирусов к высушиванию повышается. Большинство живых бактериальных вакцин (например, апатогенный штамм бактерий туберкулеза) также хорошо переносят цикл сублимационной сушки, если предварительно были использованы оптимальные концентрации эффективных защитных веществ, которые позволяют сохранить антигенные свойства микроорганизмов. С этой целью используют комбинированные среды, содержащие гидрофильные соединения (пептон, сахара, аминокислоты, глютамат натрия), а также криозащитные добавки типа желатина, декстрана, ПВП. Сублимацию вакцин, полученных из бактерий, рекомендуют про-

водить при температурах порядка $-20...-30^{\circ}\text{C}$, не допуская вспенивания. С помощью лиофильной сушки можно с успехом сублимировать плазму крови чаще всего при температуре -25°C .

Имеются отдельные сообщения о попытках консервировать некоторые клетки животных и человека (эритроциты, сперматозоиды, лимфоциты, тромбоциты) с помощью сублимационного высушивания. Однако эти вопросы в настоящее время находятся в стадии экспериментальных поисков. Метод лиофильной сушки различных микроорганизмов, используемый в настоящее время при создании коллекционных банков, имеет ограниченное применение, так как вызывает гибель большинства клеток. Более эффективным является процесс криоконсервации, когда микроорганизмы хранят в жидком азоте.

Аппаратура и оборудование сублимационной сушки

К числу оборудования для сушки биоматериалов прежде всего относятся сублимационные установки. Существуют сублимационные установки для сушки биологических, медицинских и фармацевтических препаратов, а также для сушки пищевых продуктов. Конструктивно — это установки коллекторного или камерного типа, в которых можно удалять водяные пары с каждой отдельной пробы путем их помещения в камеру, снабженную десублиматором или поглотителем пара.

Такие установки могут быть периодического, поточно-циклического и непрерывного действия. В периодических установках процесс сушки периодически останавливается, а в поточно-циклических и непрерывного действия подготовительно-заключительные операции производятся без остановки процесса сушки. В зависимости от производительности и целевого назначения различают лабораторные, пилотные и промышленные установки. Сейчас широко используются лабораторные и пилотные (занимающие среднее место между лабораторными и промышленными) установки фирм «Стокс» (США), «Эдварс» (Англия), «Юзифруа» (Франция), а также установки ЧСФР и Германии.

Вторым важным компонентом оборудования для лиофилизации являются сублимационные камеры, в которых осуществляется основной процесс сушки. Сублимационные камеры могут быть автономными, если сублиматор расположен отдельно, или совмещенными, когда сублиматор расположен внутри сушильной камеры. Камеры совмещенного типа имеют существенное преимущество, поскольку расстояние, отделяющее зону сублимации от десублимации (вымораживания), сведено к минимуму, что способствует интенсификации процесса и равномерности высушивания. Третьим, существенным компонентом оборудования для сушки являются десублиматоры, с помощью которых осуществляется конденсация пара в твердое состояние в сушильной камере. Существуют скребковые, бесскребковые и адсорбционные десублиматоры.

В первых образующийся лед непрерывно удаляется движущимися скребками, в связи с чем условия теплообмена с поверхностью остаются постоянными. В другом типе твердый конденсат на десублиматоре не удаляется, а в третьем — конденсация пара происходит на поверхности холодных частиц, которые pulverизируются в объеме сублиматора.

Глава 12

ПРИМЕНЕНИЕ ОХЛАЖДЕНИЯ И НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

Низкие температуры как один из физических факторов воздействия на организм с лечебной целью широко применяются в практике медицины. Наблюдения за поведением и состоянием организма животных при обитании в условиях Крайнего Севера или Антарктики показывают, что некоторые теплокровные организмы могут значительно снижать температуру поверхности тканей при одновременном сохранении на физиологическом уровне температуры внутренних областей тела. Так, ездовые эскимосские собаки при сохранении нормальной температуры внутренних органов способны выдерживать в обычных условиях своего существования охлаждение поверхности кожных покровов до -30°C , верхней части стопы — до $-8...14^{\circ}\text{C}$, а подушечек — до 0°C .

Возможность выживания при снижении температуры кожи существует у различных этнических групп населения Европы, Австралии, Америки. У любителей зимних купаний при погружении в воду ($0-4^{\circ}\text{C}$) температура в ротовой полости на несколько минут понижается на $1-1,5^{\circ}\text{C}$ и более, что связано с различным распределением крови в органах. Так, мозг человека, составляющий всего 2 % массы тела и потребляющий 20 % всего поглощаемого организмом кислорода, получает 15 % всей крови, выбрасываемой сердцем. В то же время кожа, подкожная клетчатка и значительная часть мышц, составляющая примерно 50 % массы тела, получают только 1/5 часть крови, а остальные 4/5 распределяются в «ядре» организма.

Факт лечебного действия местно применяемых гипотермических температур ($0-4^{\circ}\text{C}$) обусловлен замедлением циркуляции крови, обратным спазмом сосудов, что предупреждает появление или развитие гематом, постоперационного отека тканей. Одновременно с этим снижается уровень обмена веществ и особенно потребление тканями кислорода, а также активируются факторы свертывания крови. В связи с этим холод часто используют как местное гипотермическое средство при тканевых и органических кровотечениях. Холодовое воздействие также уменьшает секреторную функцию клеток, например секрецию желудочного сока и секретов поджелудочной железы.

В настоящее время методы низкотемпературного воздействия, применяющиеся в медицине, ведутся в основном в двух направле-

ниях. Во-первых, это искусственная гипотермия и ее различные разновидности, предусматривающие разработку методов тотального охлаждения тела либо отдельных его частей, включая ткани и органы, ниже существующих физиологических температур (0—4 °С). Эти методики в настоящее время широко используются с целью повышения устойчивости организма к действию гипоксии, травме и токсемии различного генеза.

Во-вторых, это использование методов локального криовоздействия с целью криодеструкции тканей и частей органа либо дозированное охлаждение с целью стимуляции восстановительных процессов в патологически пораженных зонах. Это достигается путем замораживания (или промораживания) тканей и органов с помощью криоинструментов, обладающих способностью охладить тот или иной участок тканей до субнулевых температур.

Общая гипотермия тела

Искусственная гипотермия — это состояние организма теплокровных животных и человека, вызванное температурой, лекарственными препаратами либо другими воздействиями, характеризующееся понижением температуры тела до величины, при которых угнетение центра терморегуляции и других жизненно важных центров является полностью обратимым.

Клиническое использование гипотермии началось около 50-х годов, когда в эксперименте удалось выключить сердце из кровообращения в условиях охлаждения организма. После этого метод гипотермии начал стремительно внедряться в практику лечения сердечно-сосудистых и других заболеваний. Однако техническое осуществление гипотермии, сопутствующие при этом осложнения и разработка методов искусственного кровообращения ослабили возникший интерес к проблеме общей гипотермии. По мере накопления знаний в области механизмов действия гипотермии, а также совершенствования методов ее применения она в дальнейшем стала более широко применяться в клинике как эффективное средство профилактики гипоксических состояний и их последствий.

Общая гипотермия тела может быть поверхностной (35—32°), при которой обычно используется легкая нейровегетативная блокада; умеренной (32—27°), проводимой под защитой инкубационного наркоза, нейро-вегетативной блокады и искусственной вентиляции легких, и, наконец, глубокой (ниже 27°), при которой проводят экстракорпоральное кровообращение и холодовую кардиоплеггию. Чаще используют метод умеренной гипотермии, поскольку он позволяет наиболее адекватно снижать интенсивность метаболических процессов и уровень потребления кислорода тканей.

Способность холода влиять на состояние организма через метаболические механизмы достаточно широко используется в практике кардиохирургии взрослого и детского контингента больных, когда возникает необходимость оперировать на «сухом» сердце,

в нейрохирургии при операциях на головном мозге, в реанимационной практике при механических или химических поражениях мозга и сердца, а также в ряде случаев постреанимационного периода после сложных хирургических вмешательств. Методы холодового воздействия на организм больного, чаще всего используемые в кардиохирургии, заключаются в том, что общее охлаждение организма достигается гипотермией циркулирующей крови в естественном или искусственном русле (например, в АИК). В нашей стране успешные операции на сердце в условиях гипотермии разработали В. И. Бураковский, Н. М. Амосов, А. А. Шалимов, П. А. Куприянов и другие хирурги. Общая гипотермия тела может быть достигнута главным образом двумя путями: общим охлаждением поверхности тела либо охлаждением циркулирующей крови методом краниocereбральной гипотермии, что осуществляется специальным холодогенерирующим наголовником. Существует большое число методов наружной гипотермии покровов тела, включая применение льда, низкотемпературных матрасов и костюмов, погружение тела больного на 50 % в охлажденную жидкость с температурой 8—10°. Применяют также метод воздушного обдува увлажненного тела, который осуществляют в условиях поверхностного наркоза и соответствующего медикаментозного обеспечения. Если охлаждение тела проводится с большой интенсивностью, например при воздушном обдуве влажного тела, то следует применять более углубленный наркоз.

Методика глубокой гипотермии (25—28 °С) разработана в недостаточной мере и не нашла еще широкого клинического применения, за исключением случаев, при которых снижения температуры тела достигают путем охлаждения крови вне организма.

Нейрогуморальные и биохимические изменения в организме при гипотермии. При охлаждении тела импульсы через периферические терморцепторы достигают гипоталамуса, в котором локализованы нейроны, координирующие процессы сохранения и расхода тепла. В гипоталамусе находятся скопления пораднергических, ГАМК-ергических, дофамин-ергических и серотонинергических нейронов, которые синтезируют соответствующие нейромедиаторы: адреналин, дофамин, серотонин.

У различных животных системы терморегуляции имеют свои особенности. Так, у овец меднатором в нейрогуморальных путях, контролирующих образование тепла, является ацетилхолин, а серотонинергические системы активируют процессы теплоотдачи. Норадrenalину отводится роль тормозного передатчика, способного подавлять оба пути терморегуляции. У приматов регуляция температуры достигается за счет взаимодействия моноаминоергических систем переднего гипоталамуса и холинергических механизмов каудального гипоталамуса. Моноамины служат нейромедиаторами в афферентных путях, по которым передается информация от терморцепторов к гипоталамусу и среднему мозгу, а ацетилхолин действует по интегративным путям, способным включать те или иные эффекторные механизмы.

Имеющаяся информация о содержании в головном мозге катехоламинов и серотонина при действии охлаждения противоречива. Так, в первые 10 мин охлаждения собак концентрация норадреналина в гипоталамусе уменьшается, а в коре не изменяется. Концентрация серотонина, наоборот, в гипоталамусе при этом возрастает, а в коре не изменяется. Через 20 мин после начала охлаждения уменьшается содержание серотонина с последующим его нарастанием.

Существенная роль в центральных механизмах терморегуляции отводится ГАМК-эргической системе, причем она рассматривается как тормозной нейромедиатор центральной нервной системы, хотя данные о характере и степени вовлечения ГАМК в реакции температурного гомеостаза противоречивы и недостаточно освещены.

Процесс секреции нейромедиаторов является динамическим процессом и осуществляется в несколько этапов. Вначале поступающий по аксону нервный импульс способствует деполяризации пресинаптической мембраны, после чего открываются потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, по которым кальций поступает внутрь синапса. Повышение концентрации Ca^{2+} приводит к взаимодействию синаптических везикул с комплементарными участками пресинаптической мембраны и последующим поступлением медиатора в синаптическую щель. В момент деполяризации мембраны концентрация Ca^{2+} повышается до 10^{-6} — 10^{-5} М, тогда как в покое его количество в синапсе достигает 10^{-7} — 10^{-8} М.

Захват катехоламинов через синаптическую мембрану, осуществляемый белком-переносчиком и Na^+ по электрохимическому градиенту, зависит от температуры. При повышении температуры на $10^\circ C$ интенсивность процесса захвата увеличивается в 2 раза. При понижении температуры от 37 до $20^\circ C$ захват срезами мозга мышцей медиаторных аминокислот ГАМК-глутамин, аспартата, глицина в существенной мере подавляется. При охлаждении организма животных увеличивается выработка катехоламинов — адреналина и норадреналина, что приводит к усилению сердечной деятельности, повышению артериального давления, увеличению легочной вентиляции и ряда других реакций. Катехоламины оказывают влияние на систему гипоталамус \rightleftharpoons гипофиз \rightleftharpoons кора надпочечников, в результате чего в кровь выделяется минералкортикоиды и глюкокортикоиды, которые способствуют выработке тепла. Таким образом, катехоламины играют важную роль в мобилизации энергетических субстратов в условиях охлаждения.

При углублении гипотермии наступает угнетение функций клеток из-за развития гипобиотических процессов в тканях, снижается кровоснабжение головного мозга и сердца, а также потребление ими кислорода. При этом происходят значительные изменения в обмене белков и углеводов, в эндокринных органах, системе газообмена, при которых повышаются сродство гемоглобина к кислороду и его низкая отдача в ткани. Соответственно этому в тканях животных уменьшается содержание цитохромоксидазы,

сукцинатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, креатининкиназы и ферментов переаминирования.

Контролируемое дозируемое охлаждение всего организма человека в настоящее время более широко применяется в лечебной практике, поскольку оно позволяет значительно снижать уровень обмена веществ и потребление кислорода тканями организма. При общей гипотермии тела человека возникает сложный комплекс физиологических и биохимических процессов, вызывающий сильный стресс, который может быть устранен с помощью нейролептических и курареподобных препаратов, позволяющих блокировать нейровегетативные и нейроэндокринные реакции и тем самым резко ослаблять первую фазу охлаждения. Для блокирования температурных реакций организма на холод используют также метод наркоза.

Начальная фаза гипотермии, при которой преобладает возбуждение центральной и вегетативной нервной системы, усиление функции эндокринных желез и обмена веществ, является общей приспособительной реакцией на охлаждение. Вторичная фаза, для которой характерно торможение функции центральной и вегетативной нервной системы, угнетение деятельности эндокринных желез и обмена веществ, является крайней мерой защиты организма от холодового воздействия. В таком именно состоянии зимнеявляющегося животного, когда наступают неблагоприятные условия существования. При этом температура тела гибернирующего животного превышает температуру окружающей среды всего на 0,5—1,0°, а дыхание и число сердечных сокращений — 1—2 за 1 мин. Животные в состоянии зимней спячки обладают повышенной устойчивостью к гипоксии, действию различных ядов и бактериальных токсинов, т. е. невосприимчивость к инфекциям связана с резким понижением реактивности организма. Например, выявлена очень низкая восприимчивость зимнеявляющихся ежей к действию цианистого калия.

В адаптационной стадии гипотермии (35—34 °С) происходит усиление сократительной способности миокарда в результате увеличения электрической базальной мощности на 20 %, повышения величины ударного объема и максимального систолического давления в желудочках и аорте. В крови при этом возрастает число эритроцитов, повышается вязкость крови. Снижение температуры тела на 1 °С приводит к замедлению дыхания, хотя за счет увеличения его глубины возникают гипервентиляция легких и временное усиление потребления миокардом кислорода. При средней степени гипотермии (33—31 °С) рефлекс и частота сердечных сокращений еще более снижаются, происходит дальнейшее уменьшение внутрипредсердной проводимости. При такой глубине охлаждения организма объемная скорость кровотока в почках и мышцах уменьшается примерно на 30 %. Активность окислительного фосфорилирования в миокарде, равно как и гормональная активность щитовидной железы, снижается.

В тканях мозга при 34 °С потребление O₂ прогрессивно уменьшается пропорционально снижению температуры тела. При этой температуре усиливается секреция норадреналина и подавляется секреция серотонина. Однако уже при температуре тела 32° секреция и захват норадреналина подавляются в нейронах коры головного мозга, поскольку тормозятся процессы дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях. При глубокой гипотермии (28—30 °С) исчезают некоторые условные рефлексы, снижаются проводимость периферических нервов и легочная вентиляция, а также утилизация O₂ тканями организма. Ритм сердечных сокращений снижается на 64 %, увеличиваются диполяризация предсердий и время прохождения возбуждения по проводящей системе, снижается артериальное давление. При снижении температуры тела у экспериментальных животных до 27—24 °С потребление O₂ тканями и органами составляет всего лишь 30 % нормотермии. Особенно в этот период активно поглощают O₂ лишь ткани головного мозга и сердца, в котором скорость коронарного кровотока и потребление O₂ снижаются до 40—42 %.

Глубокая гипотермия вызывает обратимое подавление репродуктивной функции самцов крыс, что выражается в падении двигательной активности и жизнеспособности спермиев, поскольку нарушается их энергообеспечение в результате снижения активности окислительно-восстановительных ферментов и окислительного фосфорилирования. Для клинической практики особенно важным является тот факт, что по мере охлаждения снижается потребность в кислороде нейронов мозга и клеток сердца, которые приобретают временную устойчивость к ишемии.

В начале 50-х годов для обезболивания были предложены литические смеси, состоящие из нейроплегических веществ, ганглиоблокаторов, обладающих симпатолитическими, парасимпатолитическими, антигистаминными свойствами, а также способностью тормозить функцию различных отделов центральной нервной системы. Эти вещества блокируют передачу нервного возбуждения, угнетают вегетативную нервную систему и механизм терморегуляции, что вызывает снижение обмена веществ и позволяет сохранять энергетические ресурсы сердца и мозга в первой фазе искусственной гипотермии. При использовании гипотермии в качестве лечебного средства в процессе предварительной премедикации применяют эфир, тиопентал, закись азота, циклопропан, а также стероидные препараты, анальгетики, соединения фенотиазинового ряда (аминазин, пипольфен, промедол), относительно мало угнетающие функцию дыхательного и рвотного центров. Для угнетения блуждающего нерва применяют препараты белладонны, а также ряд психотропных средств — седуксен и резорцин. В качестве антигистаминных средств используют димедрол, γ-оксимасляную кислоту в виде оксибутирата натрия, который ингибирует функцию нейроглии, вызывает глубокий сон и тормозит двигательную активность. С целью предотвращения сердечных аритмий приме-

личных добавок, которые в совокупности образуют сложные многокомпонентные эвтектические смеси.

Температура, при которой вся вода биоматериала кристаллизуется, называется температурой полного затвердевания $T_{\text{п}}$, и она может служить нижней границей при расчете температурной зоны замораживания. Для большинства биоматериалов $T_{\text{п}}$ находится в диапазоне от -40 до -60 °С, а в некоторых случаях — от -70 до -90 °С. Температура, при которой биоматериал начинает размораживаться, определяется как температура начального плавления кристаллов льда $T_{\text{н}}$. При этом $T_{\text{н}}$ значительно выше $T_{\text{п}}$, поскольку образующиеся в процессе замораживания эвтектические смеси переохлаждаются и задерживают процесс кристаллизации в разных температурных зонах, т. е. такую систему можно переохладить до более низких температур. При этом замороженные смеси будут плавиться при более высоких температурах. Если биоматериал в процессе сушки выдерживать при температуре ниже $T_{\text{н}}$, то продолжительность этой процедуры значительно увеличивается, а себестоимость готовой продукции возрастает. Поэтому на практике весь процесс сушки проводят при более высокой, максимальной температуре начального плавления кристаллов льда.

Единого мнения о влиянии скоростей замораживания на эффективность цикла сублимационной сушки до настоящего времени не существует. С одной стороны, полагают, что лучшие результаты сублимационной сушки могут быть достигнуты при медленном замораживании, с другой — наоборот, более предпочтительно быстрое замораживание. Вопрос этот довольно сложный, если учесть всю сложность первого этапа — процесса криоконсервирования, который состоит, по крайней мере, из трех основных стадий: эвклибрационной, когда биоматериал инкубируют со сложными компонентами криозащитных и стабилизирующих растворов; стадии замораживания, при которой с помощью скоростей охлаждения регулируют оптимальную степень дегидратации клеток, а также характер кристаллизационных процессов, и, наконец, стадии отогрева, на которой путем регидратации биоматериалов регенерируют их свойства.

На всех указанных выше стадиях цикла криоконсервирования происходят потери клеток. Так, на первой стадии клетки могут разрушаться в результате температурного шока, если скорость охлаждения и тоничность среды не будут достаточно оптимизированы. Эта стадия может внести большой вклад в сохранение (или несохранение) структурно-функциональных параметров биоматериалов, подготавливаемых для лиофилизации.

На стадии замораживания также происходят потери клеток в результате действия «эффекта растворов» или внутриклеточных кристаллов льда. При этом характер формируемых в системе кристаллов льда будет зависеть от скорости охлаждения, природы и концентрации защитных компонентов. При медленном замораживании основная масса окружающего клетку раствора замерзает

раньше, чем находящегося непосредственно внутри клетки, т. е. клетки, окруженные внешним льдом, содержат внутри квазикристаллическую смесь при температурах $-5...-7^{\circ}\text{C}$. При высоких скоростях замораживания и температурах $-25...-30^{\circ}\text{C}$ около 80—85 % воды внутри клетки кристаллизуется, остальная доля незакристаллизованной воды замерзает при температурах $-40...-70^{\circ}\text{C}$.

В зависимости от реализации того или иного механизма кристаллизации возникают различные криповреждения, степень выраженности которых зависит от природы биоматериала, и в частности от структуры и барьерных свойств мембран клеток, составляющих ту или иную ткань или орган. Например, быстрое замораживание говяжьего мяса со скоростью $70-80^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ способствует увеличению его жесткости и уменьшению сочности продукта, в то время как после более медленного охлаждения со скоростью $\sim 10-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры $-70...-80^{\circ}\text{C}$ потеря экстрактивных веществ резко снижается и органолептические свойства продукта сохраняются в полной мере. Однако замороженное филе мяса не рекомендуется хранить при $-15...-20^{\circ}\text{C}$, поскольку оно утрачивает способность удерживать экстрактивные внутриклеточные вещества и подвергается холодовой денатурации ввиду увеличения времени экспонирования биообъекта в зоне температур, когда наиболее выражено действие «эффектов раствора».

Если лиофилизировать продукт из такого состояния, то он потеряет свои ценные питательные качества и свойства, так как денатурированные белки плохо регидратируются и быстро разрушаются под влиянием протеолитических ферментов, которые активируются в тканях после замораживания. Повреждение белков при медленном охлаждении начинает развиваться уже при температурах $-3...-5^{\circ}\text{C}$, когда в микрофазах льда существенно изменяются рН и ионная сила раствора. Так, если суспензию молока медленно замораживать до -30°C , то рН в ней при температуре -5°C снижается с 7,0 до 5,8.

Увеличение тоничности среды с понижением температуры разрушает структуру связанной воды, что ведет к изменению нативной конформации белков, липидов и других биоконплексов. Поэтому в цикле лиофилизации для защиты биоматериалов от повреждений широко используют различные криопротекторы (глицерин, ДМСО, полиэтиленгликоли), мембранные стабилизаторы, ингибиторы метаболизма, различные соли и буферные растворы. Однако такая сложная многокомпонентная смесь, хорошо защищающая биоматериалы от разрушения на стадии замораживания, может оказать негативное влияние на ход второй стадии — сублимационной сушки, поскольку, например, глицерин либо полиэтиленгликоли плохо поддаются сушке, т. е. такая смесь не лиофилизуется. Поэтому перед реализацией процесса сублимационной сушки биоматериала необходимо экспериментально разработать такой состав криозащитного коктейля либо криопротектора, который способен хорошо сублимироваться.

Сублимационная сушка

Непосредственный цикл сушки включает три основные стадии. Первая связана с генерированием энергии, мощность которой должна быть равной (либо несколько больше) скрытой теплоте сублимации. Источниками энергии может быть подвод с помощью излучения, например оптическими квантовыми генераторами, СВЧ-излучением, методом кондукции или конвекции. Интенсивность и кинетика процесса сублимации зависят от вида и темпов энергоподвода, а также создания вакуума в сублиматоре и постоянного отвода из камеры образующегося пара путем применения сорбентов, вакуум-насосов или вымораживанием пара. При непрерывном подводе тепла в условиях вакуума молекулы жидкого вещества отрываются от поверхности кристаллов льда и возгоняются. Интенсивность и глубина процесса возгонки определяется размером кристаллов и естественной пористостью льда.

При сублимационном обезвоживании влагодержащих материалов водные пары при сублимационной сушке возгоняются не с геометрически правильных поверхностей, а с закристаллизованных структур льда и биообъекта, которые имеют сложно-коллоидное строение, в котором находятся извитые каналы, микротрещины, из которых возгонка паров затруднена. Наоборот, в биоматериалах с пористой структурой (например, белковые гели) интенсивность сублимации влаги выше, чем в биоматериалах с коллоидной структурой.

При сублимации основной массы закристаллизованной влаги часть ее — прочно связанная фракция — остаётся в жидком состоянии в процессе сублимационной сушки и в таком небольшом количестве ($\sim 1-2\%$) остаётся в биообъекте. Сохранение фракции прочно связанной воды в биоматериалах в процессе сублимационной сушки является важным, так как позволяет поддерживать нативную конформацию биополимеров, которые после регидратации не теряют своих биологических свойств.

В процессе сублимационной сушки эвакуация парогазовой смеси через извитые каналы и из сублиматора зависит от степени его вакуумирования, уровень которого характеризуется критерием Кнудсена, представляющим собой отношение средней длины свободного пробега молекул газа λ_e к характерному размеру канала, по которому идет перемещение газа: $K_n = \frac{\lambda_e}{L}$. При $\lambda_e \ll L$ режим движения называется ламинарно-вязкостным, или диффузионным; при $\lambda_e \gg L$ — молекулярным или эффузионным, при $\lambda_e \sim L$ — эффузионно-диффузионным или скользящим. Если давление в сублиматоре достигает 133,3 Па, то эвакуация парогазовой смеси носит молекулярный или молекулярно-вязкостный характер. Режимные параметры транспорта и эвакуации парогазовой смеси в извитых каналах, которые практически влияют на исходы сублимационной сушки, имеют важное значение в теории и практике лиофилизации биоматериалов.

Вторая стадия сублимационной сушки включает непосредственный процесс возгонки кристаллической фазы из биоматериалов в условиях вакуума. Большинство частиц твердого тела не может мгновенно переходить в пар с одинаковыми скоростью и вероятностью. В процессе сублимационной сушки вначале молекулы H_2O начинают перемещаться в поверхностные слои льда, а затем, мигрируя по поверхности матрицы, переходят в поверхностный адсорбционный слой и возгоняются в виде пара.

Перенос энергии в твердых телах происходит сложнее, чем в жидкостях, поскольку в твердом веществе радиус упорядоченного взаимодействия молекул значительно выше, чем в жидкости. Поэтому для преодоления сил взаимодействия молекул, покидающих поверхность испарения, требуется значительно больше энергии, чем для отрыва таких же частиц с поверхности жидкости. При этом затрата энергии идет не только на десорбцию отдельных молекул, но и на разрушение кристаллов льда. Поэтому процесс отрыва молекул в сублиматоре может осуществляться только в условиях регулируемого вакуума, поскольку для осуществления непрерывного процесса сушки требуется постоянный отвод оторвавшихся молекул пара из объема сублиматора.

Если постоянный отвод парогазовой смеси не будет осуществляться, то процесс сублимации вначале замедлится, а затем прекратится, поскольку возникает феномен «возвращенных молекул» на поверхности сублимации, который приобретет циркулярный характер. Для отвода парогазовых смесей из сублиматора чаще всего пользуются методом их вымораживания, т. е. перевода в конденсированное, твердое состояние.

Третьей стадией сублимационной сушки является процесс регидратации биоматериала из высушенного во влажное состояние. Эта стадия достаточно важна, так как темпы, характер и способ гидратации сублимационного объекта сильно влияют на свойства биоматериалов.

Продолжительность первичной сушки обычно не превышает 15—20 мин и зависит от объема, мощности вакуум-насосов установки, а также природы, условий, характера и интенсивности подвода энергии в зону сублимации.

Технологический процесс сублимационной консервации

Технологический процесс сублимационной консервации биоматериалов включает следующие этапы: отбор и предварительную подготовку биоматериалов; замораживание, сублимационную сушку, упаковку и хранение; регидратацию сублимированных биоматериалов.

Упаковка и хранение имеют важное значение в связи с особенностями свойств высушенных биоматериалов, поскольку сублимированные биоматериалы представляют собой пористые системы, обладающие большой адсорбционной способностью. Часто такие

биоматериалы сублимируют в стеклянной или другой таре, а затем герметизируют. На свойства хранящихся лиофилизированных биоматериалов оказывают влияние температура, атмосфера хранения и величина остаточной влажности. Поэтому хранить лиофилизированные препараты целесообразно при температурах 0...—5 °С.

Упаковка сублимированных биоматериалов должна надежно обеспечивать изоляцию их от воздействия CO_2 , воздуха и света, предотвращать сорбцию влаги из внешней среды. При этом упаковочные материалы должны надежно предотвращать потерю естественного аромата и цвета биоматериалов, а также защищать их от механических повреждений.

Поэтому хорошие результаты могут быть достигнуты в том случае, если упаковку сублимационного биоматериала проводить в бескислородной среде. Снижение содержания O_2 в упаковке достигается различными способами. Для этих целей используют, например, инертные газы (N_2 , CO_2), соединения палладия, которые катализируют взаимодействие O_2 с H_2 , либо фермент глюкозооксидазы, ускоряющий реакцию окисления глюкозы молекулярным O_2 . Содержание O_2 в смеси газов не должно превышать 1 %. Хотя CO_2 и способствует сохранению органолептических и биологических свойств биоматериалов, однако его длительное присутствие в упаковочной таре нежелательно, так как вызывает ухудшение их физико-химических параметров (табл. 45). Как видно, спустя 7 мес хранения в атмосфере CO_2 кусочки мяса потеряли ряд своих свойств, несколько изменился вкус, повысилась жесткость и снизились остальные показатели.

Таблица 45. Физико-химические и органолептические свойства сублимированного мяса после различных сроков хранения в атмосфере CO_2 при 30 °С

Показатель	2 нед			7 мес		
	1	2	3	1	2	3
Вкус	4,84	4,92	4,92	5,25	5,08	4,82
Мягкость	3,67	3,50	3,52	3,33	3,00	2,64
Степень восстановления, %	86,6	84,0	77,6	81,5	81,1	70,2
Показатель цветности (по шкале калориметра)	6,3	6,5	12,3	9,9	8,5	8,8

Примечание: Содержание O_2 в упаковке: 1—2 %; 2—0,1 %; 3—90 %.

В настоящее время для хранения сублимационных продуктов используется жестяная, стальная и алюминиевая тара, а также композитные полимерные материалы. Стеклянная тара применяется только в отдельных случаях. Однако полимерная тара в ряде случаев пригодна только для кратковременного хранения биоматериалов. Так, в таре из двухслойной пленки полиэтилен-целлофан биоматериалы, содержащие 2 % влаги, можно хранить при 20 °С в атмосфере азота около 3 мес. Например, тара из майлара, сарана, вискотена и их комбинаций позволяет хранить биоматериалы

лы при 20°C не более 1—1,5 мес. Четырехкомпонентная тара на основе целлофан-полиэтилен-фольга-полиэтилена и целлофан-полиэтилена, армированная фольгой, позволяет хранить биоматериалы в вакууме при температуре 20—25°C соответственно 9 и 7 мес. Хорошими барьерными свойствами обладает пятислойная (саран-целлофан-полиэтилен-фольга-полиэтилен) и трехслойная тара (алюминиевая фольга в комбинации с виниловой и полиэтиленовой пленками), а также тара из полиолефиновых пленок, армированных фольгой.

Регидратация сублимационных биоматериалов. Лиофилизированные биоматериалы перед использованием подвергаются регидратации с целью восстановления их исходных свойств. Однако в процессе замораживания и особенно сублимационной сушки в биоматериалах возникают структурно-функциональные изменения, которые изменяют свойства белков, и в частности способность их к гидратации. Так, хорошо известно, что в цикле замораживание — сублимационная сушка в биоматериалах в результате развития неферментативных и ферментативных процессов, приводящих к денатурации биополимеров, текстура продуктов растительного и особенно животного происхождения модифицируется, происходит потеря летучих ароматических веществ, повышается жесткость белков. Поэтому продукты овощного и фруктового происхождения после сублимационной сушки содержат определенное количество белка в денатурированном состоянии, который имеет различную способность к регидратации. Повышение жесткости мяса, связанное с повышением агрегации и денатурации белков, зависит от интенсивности образования межмолекулярных ковалентных S—S-связей в результате окисления активных SH-групп. Растворимость белков изменяется также под влиянием протеолитических и лизосомальных ферментов, свободных жирных кислот и продуктов перекисного окисления липидов.

На свойства хранимых лиофилизированных биоматериалов существенное влияние оказывают остаточная влажность и концентрация атомарного O₂. При его поступлении в сублиматор в результате нарушения его вакуумирования происходит окисление витаминов, ферментных белков и пигментов, например каротиноидов, хлорофилла, гемо- и миоглобина, изменение цветности и вкусовых качеств материала, развивается его побурение. При содержании в биоматериале, например в сублимированном молоке, менее 1% остаточной влаги развиваются процессы автоокисления и последующего распада биополимеров. Однако при более высоком содержании влаги (1,5—2%) указанные выше процессы тормозятся, так как вода образует защитную пленку, предупреждая контакт O₂ с биоматериалом. Вместе с тем оставшаяся в сублимированном продукте вода является средой, в которой возможна активация некоторых нежелательных ферментативных реакций, например активация лизосомальных гидролаз, фенолаз, липоксидаз, пероксидаз. Поэтому при реализации процессов сублимационной сушки необходимо использовать соответствующие ингибиторы метаболиз-

ма и мембранные стабилизаторы, повышающие устойчивость биоматериалов.

Сублимационная консервация микроорганизмов и биопрепаратов. Методом лиофилизации можно консервировать только определенные штаммы микроорганизмов, поскольку не все они переносят этот способ консервации. Для повышения жизнеспособности микроорганизмов используют различные естественные среды — сыворотку, молоко, бульон, пептон, сахарозу, глюкозу, лактозу, а также индивидуальные стабилизаторы (аминокислоты, глутамат натрия, некоторые синтетические полимеры — традиционные криопротекторы), коллоидные вещества (желатина, агар-агар) и их комбинации. Например, среда содержит 30 % сыворотки, 10 % бульона и 7,5 % глюкозы. Важно, чтобы содержание гидрофильных веществ и солей в таких средах было оптимальным, поскольку их избыточная концентрация удлиняет сроки сушки и снижает растворимость сухого препарата.

Лиофилизация микроорганизмов как метод сейчас используется для длительного хранения только отдельных штаммов микроорганизмов, поскольку в процессе сушки возникают нарушения структурно-функционального состояния генетического аппарата, мутации, хромосомные aberrации. Однако те штаммы, которые хорошо переносят весь цикл замораживания — высушивания, сохраняют высокий титр жизнеспособности на протяжении десятков лет. Например, по данным Американской коллекции типовых культур, некоторые виды грибов после лиофильной сушки сохраняют жизнеспособность при температуре 4 °С в течение более 40 лет хранения.

Из табл. 46 видно, что жизнеспособность актиномицетов после замораживания под защитой 20%-го глицерина или лиофилизации с последующим хранением в течение года различается. После лиофильной сушки хорошо сохраняется только два вида, а другие виды микроорганизмов не устойчивы к высушиванию. Некоторые промышленные штаммы *Sfrotomyces*, *Arthro-*

Таблица 46. Жизнеспособность актиномицетов после замораживания и лиофильной сушки, %

Вид актиномицетов	Замораживание и хранение при - 20 °С	Лиофилизация и хранение при 4 °С
<i>Streptomyces xanthophacus</i>	35,7	0,4
<i>Str. scabies</i>	34,2	0,7
<i>Str. michiganensis</i>	22,1	3,2
<i>Str. griseus</i>	49,5	17,5
<i>Str. viridochromogenes</i>	120,0	13,5
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	121,0	55,3
<i>Nocardia opaca</i>	19,5	63,4

bacter simplex весьма неустойчивы к лиофильной сушке, хотя вид *St. griseus* достаточно хорошо сохраняется после лиофилизации на протяжении 5 лет при отрицательных температурах хранения. Плохо переносят процесс лиофилизации практически все виды *E. Coli*. По данным западногерманской коллекции микроорганизмов, лиофилизация фототропных бактерий приводит к нарушению их генетического

аппарата, в то время как хранение в жидком азоте надежно гарантирует сохранение основных генетических признаков. В настоящее время большой фонд коллекций бактерий, грибов, вирусов животных и водорослей в Американской коллекции типовых культур хранится исключительно в жидком азоте, а лиофилизированные культуры используются в основном для рассылки.

В последнее время для улучшения исходов сублимационной сушки микроорганизмов используют комбинированные методы: предварительное обезвоживание клеток на сухих носителях (силикагель, декатрон, крахмал, сухое молоко) или иммобилизация их на подложках (целлюлоза, коллаген) с последующим циклом сублимационной сушки. Так, например, многие виды микроорганизмов, разрушающиеся при традиционной сублимационной сушке из жидкой суспензии, могут быть успешно высушены после центрирования суспензии клеток и осаждения на предварительно обезвоженные силикагель, декстрины или крахмал.

Для хранения высушенных микроорганизмов чаще всего используют низкие температуры, которые обеспечивают поддержание исходного титра жизнеспособных клеток без изменения их специфических свойств.

Гораздо лучше при сублимационной сушке сохраняются вирусные препараты, если лиофилизацию проводить в защитных средах. При лиофилизации вирусов вполне приемлемой можно считать температуру сублимации в пределах верхней границы эвтектической зоны NaCl ($-22...-25^{\circ}\text{C}$). Использование более низких температур сильно увеличивает продолжительность сублимационной сушки. Важным параметром лиофилизации является скорость сублимации: при высоких скоростях сушки вероятность повреждения вирусов больше, чем при медленных режимах. Медленное высушивание при температуре -70°C полностью сохраняет свойства такого температурочувствительного вида, как вирус полиомиелита.

В настоящее время метод лиофилизации хорошо используется для длительного сохранения различных вирусных вакцин (вирус-вакцина псевдочумы птиц, оспенная вакцина животных и птиц, вакцина чумы крупного рогатого скота, клещевого энцефалита и др.). Вместе с тем большинство штаммов вирусов, используемых для получения вакцин, повреждаются при сублимационной сушке. Однако в суспензиях, обогащенных белковыми коллоидными веществами, сахарами либо другими гидрофильными соединениями, устойчивость вирусов к высушиванию повышается. Большинство живых бактериальных вакцин (например, апатогенный штамм бактерий туберкулеза) также хорошо переносят цикл сублимационной сушки, если предварительно были использованы оптимальные концентрации эффективных защитных веществ, которые позволяют сохранить антигенные свойства микроорганизмов. С этой целью используют комбинированные среды, содержащие гидрофильные соединения (пептон, сахара, аминокислоты, глютамат натрия), а также криозащитные добавки типа желатина, декстрана, ПВП. Сублимацию вакцин, полученных из бактерий, рекомендуют про-

водить при температурах порядка $-20...-30^{\circ}\text{C}$, не допуская вспенивания. С помощью лиофильной сушки можно с успехом сублимировать плазму крови чаще всего при температуре -25°C .

Имеются отдельные сообщения о попытках консервировать некоторые клетки животных и человека (эритроциты, сперматозоиды, лимфоциты, тромбоциты) с помощью сублимационного высушивания. Однако эти вопросы в настоящее время находятся в стадии экспериментальных поисков. Метод лиофильной сушки различных микроорганизмов, используемый в настоящее время при создании коллекционных банков, имеет ограниченное применение, так как вызывает гибель большинства клеток. Более эффективным является процесс криоконсервации, когда микроорганизмы хранят в жидком азоте.

Аппаратура и оборудование сублимационной сушки

К числу оборудования для сушки биоматериалов прежде всего относятся сублимационные установки. Существуют сублимационные установки для сушки биологических, медицинских и фармацевтических препаратов, а также для сушки пищевых продуктов. Конструктивно — это установки коллекторного или камерного типа, в которых можно удалять водяные пары с каждой отдельной пробы путем их помещения в камеру, снабженную десублиматором или поглотителем пара.

Такие установки могут быть периодического, поточно-циклического и непрерывного действия. В периодических установках процесс сушки периодически останавливается, а в поточно-циклических и непрерывного действия подготовительно-заключительные операции производятся без остановки процесса сушки. В зависимости от производительности и целевого назначения различают лабораторные, пилотные и промышленные установки. Сейчас широко используются лабораторные и пилотные (занимающие среднее место между лабораторными и промышленными) установки фирм «Стокс» (США), «Эдварс» (Англия), «Юзифруа» (Франция), а также установки ЧСФР и Германии.

Вторым важным компонентом оборудования для лиофилизации являются сублимационные камеры, в которых осуществляется основная процесс сушки. Сублимационные камеры могут быть автономными, если сублиматор расположен отдельно, или совмещенными, когда сублиматор расположен внутри сушильной камеры. Камеры совмещенного типа имеют существенное преимущество, поскольку расстояние, отделяющее зону сублимации от десублимации (вымораживания), сведено к минимуму, что способствует интенсификации процесса и равномерности высушивания. Третьим, существенным компонентом оборудования для сушки являются десублиматоры, с помощью которых осуществляется конденсация пара в твердое состояние в сушильной камере. Существуют скребковые, бесскребковые и адсорбционные десублиматоры.

В первых образующийся лед непрерывно удаляется движущимися скребками, в связи с чем условия теплообмена с поверхностью остаются постоянными. В другом типе твердый конденсат на десублиматоре не удаляется, а в третьем — конденсация пара происходит на поверхности холодных частиц, которые пульверизируются в объеме сублиматора.

Глава 12

ПРИМЕНЕНИЕ ОХЛАЖДЕНИЯ И НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

Низкие температуры как один из физических факторов воздействия на организм с лечебной целью широко применяются в практике медицины. Наблюдения за поведением и состоянием организма животных при обитании в условиях Крайнего Севера или Антарктики показывают, что некоторые теплокровные организмы могут значительно снижать температуру поверхности тканей при одновременном сохранении на физиологическом уровне температуры внутренних областей тела. Так, ездовые эскимосские собаки при сохранении нормальной температуры внутренних органов способны выдерживать в обычных условиях своего существования охлаждение поверхности кожных покровов до -30°C , верхней части стопы — до $-8...14^{\circ}\text{C}$, а подушечек — до 0°C .

Возможность выживания при снижении температуры кожи существует у различных этнических групп населения Европы, Австралии, Америки. У любителей зимних купаний при погружении в воду ($0-4^{\circ}\text{C}$) температура в ротовой полости на несколько минут понижается на $1-1,5^{\circ}\text{C}$ и более, что связано с различным распределением крови в органах. Так, мозг человека, составляющий всего 2 % массы тела и потребляющий 20 % всего поглощаемого организмом кислорода, получает 15 % всей крови, выбрасываемой сердцем. В то же время кожа, подкожная клетчатка и значительная часть мышц, составляющая примерно 50 % массы тела, получают только 1/5 часть крови, а остальные 4/5 распределяются в «ядре» организма.

Факт лечебного действия местно применяемых гипотермических температур ($0-4^{\circ}\text{C}$) обусловлен замедлением циркуляции крови, обратным спазмом сосудов, что предупреждает появление или развитие гематом, постоперационного отека тканей. Одновременно с этим снижается уровень обмена веществ и особенно потребление тканями кислорода, а также активируются факторы свертывания крови. В связи с этим холод часто используют как местное гипотермическое средство при тканевых и органических кровотечениях. Холодовое воздействие также уменьшает секреторную функцию клеток, например секрецию желудочного сока и секретов поджелудочной железы.

В настоящее время методы низкотемпературного воздействия, применяющиеся в медицине, ведутся в основном в двух направле-

ниях. Во-первых, это искусственная гипотермия и ее различные разновидности, предусматривающие разработку методов тотального охлаждения тела либо отдельных его частей, включая ткани и органы, ниже существующих физиологических температур (0—4 °С). Эти методики в настоящее время широко используются с целью повышения устойчивости организма к действию гипоксии, травмы и токсемии различного генеза.

Во-вторых, это использование методов локального криовоздействия с целью криодеструкции тканей и частей органа либо дозированное охлаждение с целью стимуляции восстановительных процессов в патологически пораженных зонах. Это достигается путем замораживания (или промораживания) тканей и органов с помощью криоинструментов, обладающих способностью охладить тот или иной участок тканей до субнулевых температур.

Общая гипотермия тела

Искусственная гипотермия — это состояние организма теплокровных животных и человека, вызванное температурой, лекарственными препаратами либо другими воздействиями, характеризующееся понижением температуры тела до величины, при которых угнетение центра терморегуляции и других жизненно важных центров является полностью обратимым.

Клиническое использование гипотермии началось около 50-х годов, когда в эксперименте удалось выключить сердце из кровообращения в условиях охлаждения организма. После этого метод гипотермии начал стремительно внедряться в практику лечения сердечно-сосудистых и других заболеваний. Однако техническое осуществление гипотермии, сопутствующие при этом осложнения и разработка методов искусственного кровообращения ослабили возникший интерес к проблеме общей гипотермии. По мере накопления знаний в области механизмов действия гипотермии, а также совершенствования методов ее применения она в дальнейшем стала более широко применяться в клинике как эффективное средство профилактики гипоксических состояний и их последствий.

Общая гипотермия тела может быть поверхностной (35—32°), при которой обычно используется легкая нейровегетативная блокада; умеренной (32—27°), проводимой под защитой инкубационного наркоза, нейро-вегетативной блокады и искусственной вентиляции легких, и, наконец, глубокой (ниже 27°), при которой проводят экстракорпоральное кровообращение и холодовую кардиоплегию. Чаще используют метод умеренной гипотермии, поскольку он позволяет наиболее адекватно снижать интенсивность метаболических процессов и уровень потребления кислорода тканей.

Способность холода влиять на состояние организма через метаболические механизмы достаточно широко используется в практике кардиохирургии взрослого и детского контингента больных, когда возникает необходимость оперировать на «сухом» сердце,

в нейрохирургии при операциях на головном мозге, в реанимационной практике при механических или химических поражениях мозга и сердца, а также в ряде случаев постреанимационного периода после сложных хирургических вмешательств. Методы холодового воздействия на организм больного, чаще всего используемые в кардиохирургии, заключаются в том, что общее охлаждение организма достигается гипотермией циркулирующей крови в естественном или искусственном русле (например, в ЛИК). В нашей стране успешные операции на сердце в условиях гипотермии разработали В. И. Бураковский, Н. М. Амосов, А. А. Шалимов, П. А. Купринянов и другие хирурги. Общая гипотермия тела может быть достигнута главным образом двумя путями: общим охлаждением поверхности тела либо охлаждением циркулирующей крови методом краинцеребральной гипотермии, что осуществляется специальным холодогенерирующим наголовником. Существует большое число методов наружной гипотермии покровов тела, включая применение льда, низкотемпературных матрасов и костюмов, погружение тела больного на 50 % в охлажденную жидкость с температурой 8—10°. Применяют также метод воздушного обдува увлажненного тела, который осуществляют в условиях поверхностного наркоза и соответствующего медикаментозного обеспечения. Если охлаждение тела проводится с большой интенсивностью, например при воздушном обдуве влажного тела, то следует применять более углубленный наркоз.

Методика глубокой гипотермии (25—28 °С) разработана в недостаточной мере и не нашла еще широкого клинического применения, за исключением случаев, при которых снижения температуры тела достигается путем охлаждения крови вне организма.

Нейрогуморальные и биохимические изменения в организме при гипотермии. При охлаждении тела импульсы через периферические терморцепторы достигают гипоталамуса, в котором локализованы нейроны, координирующие процессы сохранения и расхода тепла. В гипоталамусе находятся скопления норадренергических, ГАМК-ергических, дофамин-ергических и серотонинергических нейронов, которые синтезируют соответствующие нейромедиаторы: адреналин, дофамин, серотонин.

У различных животных системы терморегуляции имеют свои особенности. Так, у овец медиатором в нейрогуморальных путях, контролирующим образование тепла, является ацетилхолин, а серотонинергические системы активируют процессы теплоотдачи. Норадреналину отводится роль тормозного посредника, способного подавлять оба пути терморегуляции. У приматов регуляция температуры достигается за счет взаимодействия моноаминергических систем переднего гипоталамуса и холинэргических механизмов каудального гипоталамуса. Моноамины служат нейромедиаторами в афферентных путях, по которым передается информация от терморцепторов к гипоталамусу и среднему мозгу, а ацетилхолин действует по интегративным путям, способным включать те или иные эффекторные механизмы.

Имеющаяся информация о содержании в головном мозге катехоламинов и серотонина при действии охлаждения противоречива. Так, в первые 10 мин охлаждения собак концентрация норадреналина в гипоталамусе уменьшается, а в коре не изменяется. Концентрация серотонина, наоборот, в гипоталамусе при этом возрастает, а в коре не изменяется. Через 20 мин после начала охлаждения уменьшается содержание серотонина с последующим его нарастанием.

Существенная роль в центральных механизмах терморегуляции отводится ГАМК-эргической системе, причем она рассматривается как тормозной нейромедиатор центральной нервной системы, хотя данные о характере и степени вовлечения ГАМК в реакции температурного гомеостаза противоречивы и недостаточно освещены.

Процесс секреции нейромедиаторов является динамическим процессом и осуществляется в несколько этапов. Вначале поступающий по аксону нервный импульс способствует деполяризации пресинаптической мембраны, после чего открываются потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, по которым кальций поступает внутрь синапса. Повышение концентрации Ca^{2+} приводит к взаимодействию синаптических везикул с комплементарными участками пресинаптической мембраны и последующим поступлением медиатора в синаптическую щель. В момент деполяризации мембраны концентрация Ca^{2+} повышается до 10^{-6} — 10^{-5} М, тогда как в покое его количество в синапсе достигает 10^{-7} — 10^{-8} М.

Захват катехоламинов через синаптическую мембрану, осуществляемый белком-переносчиком и Na^+ по электрохимическому градиенту, зависит от температуры. При повышении температуры на 10°C интенсивность процесса захвата увеличивается в 2 раза. При понижении температуры от 37 до 20°C захват срезами мозга мышей медиаторных аминокислот ГАМК-глутаминна, аспартата, глицина в существенной мере подавляется. При охлаждении организма животных увеличивается выработка катехоламинов — адреналина и норадреналина, что приводит к усилению сердечной деятельности, повышению артериального давления, увеличению легочной вентиляции и ряда других реакций. Катехоламины оказывают влияние на систему гипоталамус \rightleftharpoons гипофиз \rightleftharpoons кора надпочечников, в результате чего в кровь выделяется минералкортикоиды и глюкокортикоиды, которые способствуют выработке тепла. Таким образом, катехоламины играют важную роль в мобилизации энергетических субстратов в условиях охлаждения.

При углублении гипотермии наступает угнетение функций клеток из-за развития гипобиотических процессов в тканях, снижается кровоснабжение головного мозга и сердца, а также потребление ими кислорода. При этом происходят значительные изменения в обмене белков и углеводов, в эндокринных органах, системе газообмена, при которых повышаются сродство гемоглобина к кислороду и его низкая отдача в ткани. Соответственно этому в тканях животных уменьшается содержание цитохромоксидазы,

сукцинатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, креатининкиназы и ферментов переаминирования.

Контролируемое дозируемое охлаждение всего организма человека в настоящее время более широко применяется в лечебной практике, поскольку оно позволяет значительно снижать уровень обмена веществ и потребление кислорода тканями организма. При общей гипотермии тела человека возникает сложный комплекс физиологических и биохимических процессов, вызывающий сильный стресс, который может быть устранен с помощью нейроплегических и курареподобных препаратов, позволяющих блокировать нейровегетативные и нейроэндокринные реакции и тем самым резко ослаблять первую фазу охлаждения. Для блокирования температурных реакций организма на холод используют также метод наркоза.

Начальная фаза гипотермии, при которой преобладает возбуждение центральной и вегетативной нервной системы, усиление функции эндокринных желез и обмена веществ, является общей приспособительной реакцией на охлаждение. Вторичная фаза, для которой характерно торможение функции центральной и вегетативной нервной системы, угнетение деятельности эндокринных желез и обмена веществ, является крайней мерой защиты организма от холодового воздействия. В таком именно состоянии угнетения процессов жизнедеятельности находится организм зимнеящего животного, когда наступают неблагоприятные условия существования. При этом температура тела гибернирующего животного превышает температуру окружающей среды всего на $0,5-1,0^{\circ}$, а дыхание и число сердечных сокращений — $1-2$ за 1 мин. Животные в состоянии зимней спячки обладают повышенной устойчивостью к гипоксии, действию различных ядов и бактериальных токсинов, т. е. невосприимчивость к инфекциям связана с резким понижением реактивности организма. Например, выявлена очень низкая восприимчивость зимнеящих ежей к действию цианистого калия.

В адаптационной стадии гипотермии ($35-34^{\circ}\text{C}$) происходит усиление сократительной способности миокарда в результате увеличения электрической базальной мощности на 20% , повышения величины ударного объема и максимального систолического давления в желудочках и аорте. В крови при этом возрастает число эритроцитов, повышается вязкость крови. Снижение температуры тела на 1°C приводит к замедлению дыхания, хотя за счет увеличения его глубины возникают гипервентиляция легких и временное усиление потребления миокардом кислорода. При средней степени гипотермии ($33-31^{\circ}\text{C}$) рефлекс и частота сердечных сокращений еще более снижаются, происходит дальнейшее уменьшение внутрипредсердной проводимости. При такой глубине охлаждения организма объемная скорость кровотока в почках и мышцах уменьшается примерно на 30% . Активность окислительного фосфорилирования в миокарде, равно как и гормональная активность щитовидной железы, снижается.

В тканях мозга при 34 °С потребление O_2 прогрессивно уменьшается пропорционально снижению температуры тела. При этой температуре усиливается секреция норадреналина и подавляется секреция серотонина. Однако уже при температуре тела 32° секреция и захват норадреналина подавляются в нейронах коры головного мозга, поскольку тормозятся процессы дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях. При глубокой гипотермии (28—30 °С) исчезают некоторые условные рефлексы, снижаются проводимость периферических нервов и легочная вентиляция, а также утилизация O_2 тканями организма. Ритм сердечных сокращений снижается на 64 %, увеличиваются диполяризация предсердий и время прохождения возбуждения по проводящей системе, снижается артериальное давление. При снижении температуры тела у экспериментальных животных до 27—24 °С потребление O_2 тканями и органами составляет всего лишь 30 % нормотермии. Особенно в этот период активно поглощают O_2 лишь ткани головного мозга и сердца, в котором скорость коронарного кровотока и потребление O_2 снижаются до 40—42 %.

Глубокая гипотермия вызывает обратимое подавление репродуктивной функции самцов крыс, что выражается в падении двигательной активности и жизнеспособности спермиев, поскольку нарушается их энергообеспечение в результате снижения активности окислительно-восстановительных ферментов и окислительного фосфорилирования. Для клинической практики особенно важным является тот факт, что по мере охлаждения снижается потребность в кислороде нейронов мозга и клеток сердца, которые приобретают временную устойчивость к ишемии.

В начале 50-х годов для обезболивания были предложены литические смеси, состоящие из нейроплегических веществ, ганглиоблокаторов, обладающих симпатолитическими, парасимпатолитическими, антигистаминными свойствами, а также способностью тормозить функцию различных отделов центральной нервной системы. Эти вещества блокируют передачу нервного возбуждения, угнетают вегетативную нервную систему и механизм терморегуляции, что вызывает снижение обмена веществ и позволяет сохранять энергетические ресурсы сердца и мозга в первой фазе искусственной гипотермии. При использовании гипотермии в качестве лечебного средства в процессе предварительной премедикации применяют эфир, тиопентал, закись азота, циклопропан, а также стероидные препараты, анальгетики, соединения фенотиазинового ряда (аминазин, пипольфен, промедол), относительно мало угнетающие функцию дыхательного и рвотного центров. Для угнетения блуждающего нерва применяют препараты белладонны, а также ряд психотропных средств — седуксен и резорцин. В качестве антигистаминных средств используют димедрол, γ -оксимасляную кислоту в виде оксибутирата натрия, который ингибирует функцию нейтроглии, вызывает глубокий сон и тормозит двигательную активность. С целью предотвращения сердечных аритмий приме-

няют нейролептанальгезию с использованием дигидробензоперидола и фентанила.

Кроме нейровегетативной и нейроэндокринной блокады, при проведении общей гипотермии осуществляют коррекцию энергетических ресурсов организма. Однако различные фармакологические препараты в условиях низких температур действуют иначе, чем в физиологических, в связи с чем необходим контроль за состоянием больного при действии на него фармакологических препаратов и гипотермии. Хотя наиболее простой способ охлаждения тела наружный, т. е. погружение тела больного в холодную воду при температуре 2—5° либо обкладывание тела емкостями со льдом, однако при таком способе трудно соблюдать асептику и проводить контроль за функциями организма. Более совершенные методы поверхностного охлаждения связаны с применением для этой цели различных устройств. Например, в кардиохирургию вводится гипотермическая перфузия органа в сочетании с методом искусственного кровообращения. При этом экстракорпоральное охлаждение ведет преимущественно к понижению температуры в обильно снабжаемых кровью внутренних органах. Поэтому существуют и другие способы ограниченной гипотермии: охлаждение кожных покровов, слизистых оболочек, серозных поверхностей, крупных кровеносных сосудов.

Альтернативой общей гипотермии в настоящее время стал метод краниocereбрального охлаждения, которое по способу приложения является регионарной, а по механизму действия — общей гипотермией, поскольку в области головы и тканей мозга сильно развита сосудистая система и отекающая от головы охлажденная кровь снижает как температуру, так и уровень обменных процессов в организме.

Различают следующие виды краниocereбральной гипотермии: умеренную (37—35°), для которой характерны адаптация организма к охлаждению и развитие компенсаторных функций, направленных на сохранение гомеотермии; среднюю (34—30°), отличающуюся нестабильностью функций и повышенным теплообразованием, и, наконец, глубокую (29—24°), при которой жизненно важные функции организма сводятся к минимуму. Для осуществления КЦГ используют различные приспособления, пригодные для постоянного или кратковременного охлаждения головы (эластичные емкости со льдом, охлаждающие смеси, различные шлемы, гипотермы типа «Холод 2Ф» или другие аппараты, где скорость охлаждения головы достигает 7—8 °C/мин, а тела — 33—32 °C).

Краниocereбральная гипотермия является также эффективным способом повышения сопротивляемости ткани к недостатку кислорода, поскольку при этом происходит блокада нейровегетативной системы. При краниocereбральной гипотермии температура головы снижается в 2—3 раза быстрее, чем при общем охлаждении. При температуре 26 °C потребление O₂ тканью мозга уменьшается в 2 раза, что позволяет более длительно (до 2—3 нед) охлаждать тело без риска развития метаболического ацидоза и фибрилляции

Таблица 47. Скорость регионарного кровотока

Природа ткани	Температура		
	35	34	32
Мозг на глубине 12 мм	55,3±4,12	51,3±3,87	42,5±4,89
Миокард правого желу- дочка	58,2±2,44	51,5±3,74	46,7±3,74
Печень	45,8±2,61	57,1±6,11	50,9±4,03
Селезенка	53,9±1,94	47,7±4,70	31,1±1,34
Корковый слой почки	117,1±7,19	84,1±8,44	67,8±7,10
Поверхностные мышцы бедро	21,18±1,41	14,8±0,807	12,04±0,911

желудочкового сердца. К преимуществам этого метода следует также отнести быстрое наступление нейровегетативной блокады, которой не удастся своевременно добиться с помощью фармакологических средств. Умеренная глубина КЦГ наступает при ректальной температуре 37—35 °С и через 20—25 мин. При этом температура головного мозга понижается до 36—32 °С, а коры полушарий — на 5—7°, подкорки — на 2—3°. При глубокой КЦГ, наступающей через 25—30 мин, ректальная температура достигает 30—24 °С, а тканей мозга 25—18 °С. Если умеренная КЦГ является нестабильной фазой охлаждения, то при глубокой гипотермии изменения в органах и тканях стабилизируются. Так, в стадии глубокой КЦГ артериальное давление падает до 51,5 %, а минутный объем крови составляет всего 59,5 %. Артериальное давление и кровоток в печени уменьшаются наполовину, а портальное давление — не более чем на 25—30 %. В условиях КЦГ уменьшается уровень гемодинамики в почке, селезенке и поверхностных слоях мышц бедра и ткани мозга. При температуре тела 32 °С кровенаполнение интрацеребральных сосудов составляет всего 69,6 %, а мозговой кровоток — 26,8 % нормотермической величины (табл. 47). В силу этого потребление тканями кислорода значительно снижается. Так, потребление кислорода почечной тканью при 30 °С по сравнению с исходным сокращается в 3,0—3,3 раза, а при 25 °С — более чем в 6 раз. Имеется положительная корреляция между снижением почечного кровотока, потреблением кислорода, а также клубочковой фильтрацией и экскрецией натрия. Поглощение O₂ миокардом снижается вдвое, а печени — втрое. В связи с этим метод КЦГ применяется при комплексном лечении различных гипоксических и постгипоксических состояний. Например, при черепно-мозговых травмах, когда нарушаются мозговое кровообращение, газообмен и наступает отек мозга, КЦГ, действуя на скорость и объем микроциркуляции, позволяет предотвратить развитие ликворной гипертензии и набухание тканей при охлаждении головы до температуры 30—28 °С.

Лечение методом КЦГ успешно применяется для устранения осложнений, возникших после операций по поводу врожденных пороков сердца, проводимых в условиях искусственного кровообращения. Важным преимуществом этого метода является отсут-

в различных тканях при охлаждении

тела, °C			
30	28	27	26
38,2±3,97	31,7±3,24	23,2±2,73	18,8±1,80
42,2±3,04	36,9±3,30	34,1±3,33	27,5±2,11
40,7±3,63	41,5±3,00	29,5±2,31	24,1±1,42
27,2±1,49	22,7±0,96	20,2±0,90	17,9±0,84
61,7±7,97	51,2±6,09	42,7±3,57	29,7±3,10
11,61±0,767	10,48±0,606	8,86±0,597	6,55±0,410

ствии синдрома отдачи: вторичного повышения внутричерепного давления, развивающегося обычно при использовании осмотических диуретиков. Метод КЦГ нашел применение в акушерстве и гинекологии при асфиксии новорожденных, в случаях внутричерепных кровоизлияний, расстройств мозгового кровообращения, гипертонии, а также в комплексной терапии наиболее тяжелых форм позднего токсикоза беременных. У перенесшего внутриутробную асфиксию за счет недостаточного снабжения головного мозга и сердца кислородом в клетках центральной нервной системы и миокарда развиваются глубокие структурно-функциональные изменения, характерные для тканевой аноксии. Для выведения новорожденных из асфиксии применяют погружение их в ванну с холодной водой при температурах 5—14 °C на 4—5 мин с целью рефлекторной стимуляции дыхательного центра и повышения артериального давления. Под влиянием охлаждения дыхание становится более регулярным, учащаются сердечные сокращения. Сейчас охлаждение новорожденных с помощью КЦГ проводят при помощи специально сконструированного шлема, имеющего трубки, по которым циркулирует охлажденная вода, что позволяет на 20—30 мин снизить температуру тела до 30—32 °C (при измерении ее в слуховом проходе) либо ниже 35—34 °C (при измерении температуры в прямой кишке). Применение КЦГ при реанимации новорожденных в тяжелой асфиксии способствует повышению выживаемости детей в среднем до 80 %. Причем более чем в половине случаев удается достигнуть стойкой нормализации неврологического статуса и физиологической рефлекторной деятельности, что исключает проведение последующего восстановительного лечения. Глубина охлаждения, скорость снижения температуры, продолжительность КЦГ и число проводимых сеансов строго не регламентированы и зависят от конкретной клинической ситуации. Так, новорожденным со II и III степенями постгипоксического поражения центральной нервной системы рекомендуют проводить плавное снижение температуры груди со скоростью 0,07 °C/мин до величины 30—31 °C. Новорожденным, находящимся в крайне тяжелом состоянии с нарушением мозгового кровообращения III степени при исходной ректальной температуре 32—35 °C, КЦГ проводят на фоне электроанальгезии. В случае суммации эффекта электро-

анальгезии и гипотермии через 5—10 мин от начала сеанса пациенты переходят в состояние гипобноза, при котором происходит быстрое купирование патологического процесса. При холодовом возбуждении новорожденных с отсутствием самостоятельного дыхания, появлением и нарастанием патологической неврологической симптоматики им проводят премедикацию оксibuтиратом натрия и дроперидолом. Оптимальный лечебный эффект отмечается при снижении температуры в наружном слуховом проходе до 27—28 °С, в прямой кишке — до 31—30 °С.

Метод КЦГ в комплексе с другими медикаментозными средствами оказался эффективным при лечении гемолитической болезни новорожденных. Охлаждение головного мозга в течение 8—10 ч предупреждает развитие билирубиновой энцефалопатии, что связано с уменьшением чувствительности нейронов к билирубиновой нитоксикации. После гипотермии значительно улучшается состояние показателей кислотно-щелочного баланса периферической крови, исчезают признаки гипоксии миокарда.

В результате использования КЦГ значительно повысилась эффективность лечения тяжелых форм токсикоза беременных. В этих условиях нормализуются центральные механизмы регуляции кровоснабжения, купируются явления гипоксии и отека мозга, снижается артериальное давление, инвертируются сдвиги кислотно-щелочного равновесия, газового состава и электролитного баланса крови. Благодаря этому методу удается снизить материнскую и перинатальную заболеваемость и смертность, уменьшить необходимость оперативного вмешательства при родах.

С помощью метода КЦГ предпринимают попытки лечения психозов. При белой горячке или гипертонической шизофрении температуру мозга на фоне наркоза можно снизить до 28—30 °С на протяжении 4—6 ч. Это нормализует сосудистые нарушения, степень отека мозга, а также деятельность центра терморегуляции, способствуя улучшению психического состояния больных. При длительных безремиссионных формах психоза КЦГ осуществляют до температуры 34—35 °С в течение 2—4 ч на фоне нейролептоанальгезии, после чего наступает значительное улучшение или полное исчезновение психопатологической симптоматики.

В процессе гипотермии осуществляют медикаментозное лечение в зависимости от глубины охлаждения: при поверхностном — проводят нейролептоанальгезию, при умеренном и глубоком — потенцированный наркоз, за 30—40 мин до которого осуществляют премедикацию дроперидолом, промедолом, атропином и седуксеном в возрастающих дозировках. В качестве вводного наркоза применяется также гексенал в сочетании с оксibuтиратом натрия.

При использовании КЦГ у больных, страдающих шизофренией, улучшается психическое состояние, нормализуются вегетососудистые реакции на раздражитель, повышается чувствительность организма к лекарственным веществам. Так, если до гипотермии для получения эффекта аминозина его необходимо было вводить в

дозе 400—500 мг/сут, то после КЦГ его терапевтическая эффективность проявляется в дозе 50—75 мг/сут.

Применение КЦГ при лечении ипохондрических состояний различного генеза, при которых традиционные методы фактически оказались неэффективными, приводит к выраженному улучшению состояния пациентов на 6—10-е сутки после однократной гипотермии. При необходимости ее повторяют через 1—2 нед.

В последние годы гипотермия начала успешно применяться при алкоголизме, явления которого лечат с помощью снотворных, транквилизаторов и нейролептиков в дозах, в несколько раз превышающих терапевтические. Наряду с дополнительным токсическим воздействием на мозг этих лекарственных веществ после выхода из состояния психоза у больных сохраняется выраженное астеническое состояние со значительным снижением интеллектуальных функций. Особенно это проявляется при повторных алкогольных делириях, для которых характерно нарушение психопатологической симптоматики. В этих случаях КЦГ проводят в течение 5—6 ч после нейровегетативной блокады до достижения температуры мозга 28—30 °С и параллельно используют традиционные методы купирования повторного алкогольного лечения. Как видно, гипотермия тела оказывает благотворное действие на течение гипоксии мозга и нарушенный метаболизм в нейронах, сердце и других соматических органах; изучаются возможности применения метода КЦГ для лечения ишемических состояний сердца и инфаркта миокарда, поскольку установлено, что гипотермия снижает число сердечных сокращений, нормализует их течение. Снижение скорости кровотока в коронарных сосудах и уменьшение расхода макроэргических соединений и кислорода в клетках приводят к более экономному расходу энергии и создают более щадящий режим работы сердца. В остром периоде инфаркта миокарда возникает суммация эффектов депрессорных простагландинов и кининов, которые нарушают гемодинамику и микроциркуляцию в миокарде. В результате этого происходит снижение сократительной способности сердца. Проведение гипотермии в течение 2 ч при температуре 30—28 °С в первые часы острой коронарной недостаточности активно замедляет процессы развития ишемии и некроза миокарда в результате угнетения метаболических процессов.

Применение КЦГ у животных с острой ишемией и некрозом миокарда снижает в плазме крови содержание простагландинов и концентрацию цАМФ. При этом уменьшается размер зоны некроза и улучшаются показатели гемодинамики. Процесс восстановления температуры тела при инфаркте миокарда является существенным этапом лечения гипотермией. Оптимальным режимом согревания является тот, при котором в каждом его периоде в достаточной мере осуществляется обеспечение тканей кислородом.

Гипотермическое охлаждение организма человека, особенно в варианте краниocereбральной гипотермии, уже сейчас находит широкое применение в кардиохирургических клиниках при операциях у пациентов преимущественно детского возраста с врожден-

ными пороками сердца, при лечении патологических процессов в гинекологии, травматологии, особенно в случаях, связанных с отеком мозга, в практике лечения желудочно-кишечных заболеваний, в частности перитонита, панкреатита. Выявляется эффективность охлаждения организма при кардиогенном шоке и других патологических состояниях. Большие возможности открылись для лечения больных с различными поражениями центральной нервной системы, черепно-мозговыми травмами, воспалительными процессами, тромбозами, эмболиями сосудов головного мозга.

Гипотермия стала показанием при различных коматозных состояниях, в том числе уремии, септическом и других видах шока, гангрене, тиреотоксикозе, массивных желудочно-кишечных кровотечениях, язвенной болезни, некоторых формах острой печеночной недостаточности. Однако, несмотря на положительные стороны действия общей гипотермии, она имеет существенные недостатки, связанные главным образом с расстройством сердечного ритма. Наиболее грозным осложнением общей гипотермии являются фибрилляция желудочков и остановка сердца в диастоле, частота возникновения которых зависит от глубины охлаждения. Вероятность возникновения фибрилляции сердца наиболее велика при температуре ниже 25°C . Основными причинами возникновения этих осложнений являются гипоксия миокарда, возросшая рефрактерность сердца и замедление проводимости. Поэтому наиболее целесообразно проводить гипотермию при температурах $29-33^{\circ}\text{C}$, при которых утилизация кислорода составляет 30 %, а нейроэндокринные реакции умеренно угнетены.

Несмотря на достигнутые успехи, применение КЦГ и других вариантов общей гипотермии тела не во всех случаях четко регламентировано. Поэтому необходимы дальнейшая, более углубленная разработка показаний и противопоказаний к ее применению, оптимизация способов ее проведения, включая техническое и медикаментозное обеспечение.

Общее охлаждение (замерзание) организма в естественных условиях

Если в естественных условиях тело организма подвергается нерегулируемому общему охлаждению, то при неблагоприятных условиях внешней среды (ветер с морозом, повышенная влажность тела и т. д.) возникает состояние замерзания. Под замерзанием понимают такое состояние организма человека, когда под влиянием неблагоприятных внешних условий температура его тела снижается до 35°C и ниже.

В результате влияния низких температур на организм могут возникать как местные поражения тканей (отморожения), так и общее переохлаждение (замерзание), которое может привести к летальному исходу. Это особенно часто происходит, если температура снижается при высокой влажности воздуха и сильном ветре. При замерзании в (табл. 48) более половины случаев смерти

от переохлаждения наступает при температуре воздуха —5...—12 °С. Это объясняется тем, что смертность зависит не только от температуры окружающей среды, но и от влажности, скорости ветра и продолжительности охлаждения. Охлаждение в воде происходит всегда быстрее, чем на воздухе. Так, если температура воды низкая (0—10 °С), смерть наступает в течение 1 ч, а при охлаждении на воздухе — через 4 и реже через 12 ч.

При охлаждении в воде в первую очередь холодовому воздействию подвергается спинной мозг, в результате чего возникает тяжелый сосудистый коллапс и смерть наступает из-за полной блокады функции сердечно-сосудистой системы. Поражение сердечно-сосудистой системы при охлаждении усугубляется также тем обстоятельством, что по мере замерзания ускоряется свертываемость крови, создаются условия для тромбоза сосудов сердца и внутренних органов.

При охлаждении на открытом воздухе причиной смерти чаще всего является рефлекторная остановка дыхания из-за снижения температуры продолговатого мозга до 27—25 °С.

По глубине и распространенности различают несколько стадий охлаждения тела. Охлаждение, при котором промерзают только внешние покровы, но отсутствует снижение температуры тела, относится к первой стадии. При второй стадии температура тела снижается до 30—32 °С, т. е. возникает общая гипотермия. При этом сохраняется функция жизненно важных центров, и после искусственного согревания температура тела полностью восстанавливается. Для третьей стадии характерно снижение температуры тела ниже 30 °С (29—25 °С), при котором значительно нарушаются дыхание, кровообращение и функция мозга. Для выведения из такого состояния требуются специальные меры лечения, включающие согревание, применение фармакологических препаратов и средств современной реанимации. В четвертой стадии общего охлаждения температура тела может снижаться до 25 °С. Выведение пострадавших из такого состояния может быть осуществлено при помощи интенсивных реанимационных мероприятий, вплоть до согревания сердца и прямого его массажа в специализированном отделении.

В таких случаях важны быстрые меры по борьбе с гипоксией головного мозга. При проведении указанных выше мероприятий необходимо знать скорость происхождения замерзания тела, так как в зависимости от этого теряются энергетические силы организма.

Исходы общего охлаждения зависят также от ряда других сопутствующих факторов: состояния организма, возраста, пола. При общем замерзании в различных функциональных системах организма отмечаются патофизиологические изменения, степень выраженности которых зависит от глубины, распространенности и условий охлаждения, а также сопутствующих метеорологических факторов, указанных выше. При замерзании тела общим патофизиологическим механизмом является прежде всего поражение сосудов головного мозга, ведущее к развитию тяжелой формы

гипоксии и накоплению в тканях молочной кислоты, разрушению макроэргических фосфорных соединений, активизации процессов ПОЛ и лизосомальных гидролаз. У пострадавших, госпитализированных в состоянии замерзания, потребление O_2 при ректальной температуре $20^\circ C$ составляет лишь около 8 % нормального. При охлаждении тела до температуры $34-42^\circ C$ нарушается ряд двигательных рефлексов: появляются вялость, путаная речь, а ниже $27-29^\circ C$ обычно теряется сознание, хотя не во всех случаях. Нижний температурный диапазон, при котором сознание человека может еще сохраняться, колеблется от 32 до $24^\circ C$.

Реакция центральной и периферической нервной системы при замерзании тела характеризуется двухфазным сдвигом возбудимости нервных центров. На первом этапе происходит повышение возбудимости, которое сменяется ее ослаблением или полным подавлением. При замерзании на воздухе вначале угнетается функция центров, локализованных в головном мозге, а по мере снижения температуры отключаются центры спинного мозга.

Нарушения функции эндокринной сферы при общем замерзании тела изучены в основном в эксперименте, а у человека такие исследования носят эпизодический характер. В первой и начале второй (компенсированной) стадии охлаждения происходят гиперактивация синтеза тиреотропных, адренокортикотропных и кортикостероидных гормонов и поступление их в кровь. При замерзании человека при температуре тела $32-26^\circ C$ в крови повышен уровень 17-гидрооксикортикостерона и катехоламинов повышается в результате гиперфункции мозгового вещества надпочечников. По мере снижения температуры тела до $26-25^\circ C$ содержание этих гормонов в крови резко снижается. При общем охлаждении тела на первых этапах активируется также вагонисюлярная система, уровень сахара в крови повышается, однако эти изменения маскируются изменениями, происходящими в симпато-адреналовой системе.

Прямое угнетающее влияние холода на гомеотермный организм осуществляется в соответствии с термохимическим законом Аррениуса, и на первых этапах изменения носят вполне обратимый характер.

На первых этапах замерзания происходит перемещение крови из периферических тканей во внутренние области тела, развивается холододовый термогенез, который увеличивает легочную вентиляцию и потребление O_2 организмом, а также активирует сердечно-сосудистую деятельность. В результате этого повышаются артериальное давление, содержание в крови эритроцитов и гемоглобина, а также степень распада депонированных липидов и гликогена. Это способствует поступлению в кровь необходимого количества энергетического материала для поддержания функции сердца и мозга за счет утилизации тканями свободных жирных кислот и глюкозы.

По мере снижения температуры тела и углубления замерзания все функции организма затормаживаются. Прежде всего угнете-

Таблица 48. Смертность людей в зависимости от температуры воздуха (на 1000 случаев замерзания)

Температура, °С	Число случаев, %
0—4,7	9,0
0 до — 4,0	25,0
— 5...—12,0	53,0
—13...—15,0	13,0

Таблица 49. Уровень летальной температуры тела у мелких лабораторных животных в зависимости от возраста, °С

Период животных	Взрослые	Новорожденные
Крысы	14,0—15,0	1,0—2,0
Кролики	17,0—20,0	5,0—6,0
Кошки	19,0—20,0	7,0—8,0
Морские свинки	17,0—19,0	10,0—12,0

ние охватывает наиболее холодочувствительную область головного мозга — кору, в результате чего может отключаться сознание. В этом состоянии такие основные функции организма, как сердечная и мозговая деятельность, дыхание, полностью подавляются, в результате чего в крови и тканях накапливаются недоокисленные продукты обмена. Когда развивается глубокая холодовая гипоксия, ослабляется функция дыхательного центра, что способствует нарушению кислотно-щелочного баланса в крови и клетках. В результате в кровь поступают «аноксические токсины» — недоокисленные продукты распада белков и липидов, которые представляют собой продукты перекисного окисления и распада биополимеров, обладающие высокой токсичностью по отношению к клеткам головного мозга и сердца.

Смерть от общего охлаждения зависит от ряда факторов, и в частности от возраста. Из табл. 49 видно, что у новорожденных крыс, кроликов и кошек летальный уровень температуры тела на 10—15°С ниже, чем у взрослых животных. Это объясняют тем, что у новорожденных животных система терморегуляции не функционирует в той мере, как у взрослых особей.

Таким образом, одним из существенных механизмов общего замерзания является гипоксия тканей таких жизненно важных центров, как клетки коры головного мозга и высшие регуляторные нейрохимические зоны гипоталамуса и продолговатого мозга, изменение функции которых может вызвать летальный исход. Нарушения, возникшие в нейронах центральной и вегетативной нервной системы, приводят к дальнейшему развитию цепи эндокринных метаболических и физиологических повреждений других соматических тканей и органов, и прежде всего сердечно-сосудистой системы.

Местная гипотермия тканей и органов

Искусственное охлаждение частей тела, тканей и органов до различных температур (но не ниже 0°С) нашло широкое применение в общехирургической практике, реаниматологии и трансплантологии. Так, для остановки острых профузных гастродуоденальных кровотечений на почве язвенной болезни либо предупрежде-

ния развития тяжелых форм панкреатита используют метод открытой или закрытой гипотермии желудка. При открытой системе гипотермии холодильная смесь поступает через зонд, охлаждает слизистую желудка и затем принудительно удаляется через другой зонд. При использовании закрытого метода гипотермии охлажденная жидкость циркулирует в замкнутом пространстве и непосредственно со слизистой оболочкой желудка не соприкасается. Обычно для целей закрытой гипотермии применяют сильно охлажденные ($\sim -4 \dots -20^\circ\text{C}$) растворы криопротекторов (например, глицерин, этанол и др.) либо других веществ. Закрытый способ гипотермии имеет значительные преимущества перед открытым, так как вызывает меньшее число осложнений.

Известна эффективность лечения острого панкреатита методом гипотермии в сочетании с интенсивной терапией. Обычно гипотермия передней брюшной стенки в области левого подреберья и эпигастрия, а также поясничной области осуществляется при температуре $3-5^\circ\text{C}$. При купировании острого приступа панкреатита с помощью местной гипотермии уровень потребления O_2 и скорость катаболизма тканей резко снижаются, в силу чего можно предупредить развитие тяжелых деструктивных изменений в паренхиме железы. Для этого проводят 5-6 сеансов гипотермии продолжительностью 1,5-2,5 ч каждый. После пролонгированного гипотермического воздействия деструктивные процессы в тканях подавляются, а биохимические показатели крови нормализуются. Такие повторные сеансы гипотермии приводят к стабилизации патологического процесса, что позволяет выполнить оперативное вмешательство на более благоприятном фоне.

Для снятия острых приступов панкреатита на практике используют аппараты типа «Криоэлектроника-7», «Гипотерм» и «Холод-2Ф». Для этого термоохладители укладывают циркулярно вокруг тела на уровне локализации поджелудочной железы и с помощью терморегулирующего устройства поддерживают температуру циркулирующей жидкости в пределах не выше 1°C . Таким способом в течение 2-3 ч на фоне введения фармакологических средств удается снизить температуру поджелудочной железы до $28-30^\circ\text{C}$.

При лапароскопической локальной гипотермии железы в брюшную полость вводят трехканальный зонд с надувным баллоном и подключают к аппарату «Холод-2Ф». Охлаждение достигается путем протекания жидкого хладагента в области головки железы с температурой 2°C в течение нескольких суток. Более эффективным методом лечения острого приступа панкреатита является комбинированная гипотермия, когда проводится закрытое внутрижелудочное охлаждение в сочетании с общей гипотермией. Процедура проводится под наркозом, и при достижении температуры в прямой кишке 30°C общее охлаждение прекращают. Однако такой способ имеет недостатки в том смысле, что требует громоздкой аппаратуры, плохо поддается температурному контролю состоянии стенки желудка.

Существуют также методы местной инфльтрационной гипотермии поджелудочной железы, при которых осуществляют селективное введение охлажденных до 1—5 °С анестезирующих и необходимых фармакологических растворов в чревную артерию либо местно в забрюшинную клетчатку.

Наружная гипотермия является также эффективной мерой в борьбе с острым перитонитом, поскольку существенно снижает уровень метаболических и деструктивных процессов, уменьшает уровень всасывания бактериальных токсинов и степень распространения воспалительного процесса. Наружная гипотермия и регионарная гипотермическая сорбционная гемоперфузия органов брюшной полости являются в данном случае лишь компонентами комплексного лечения перитонита, первое место в котором занимает оперативное вмешательство.

Использование наружной гипотермии является целесообразным для снятия воспалительной реакции и болевого синдрома при остром холецистите, а также при осуществлении криохолеститомии. Охлаждение печени используют также при остановке паренхиматозного кровотечения и повышении устойчивости паренхимы этого органа к кислородному голоданию. При гипотермии печени в эксперименте уменьшается кровоток, снижается интенсивность ферментативных реакций, что способствует успеху проведения операций.

Аналогичное воздействие местная гипотермия оказывает при кровотечениях из других паренхиматозных органов — почки, селезенки, кишечника. В акушерстве и гинекологии методы гипотермии также применяются для приостановки маточных кровотечений и стимуляции родовой деятельности, для чего используют местную гипотермию на область передней брюшной стенки с помощью аппликаций льда с перерывами на протяжении 15—20 мин. Эти процедуры после отогрева повторяют несколько раз. Такое циклическое воздействие усиливает рефлекторное сокращение сосудов и матки. Можно применять внутривлагалищные тампоны с эфиром, а также другие способы внутриматочной гипотермии при температуре 3—5 °С в течение 30—40 мин с перерывами. Гипотермия является одним из эффективных средств борьбы со слабостью родовой деятельности рожениц. Механизм действия гипотермии связан с рефлекторной реакцией матки в ответ на раздражение механо- и терморцепторов слизистой влагалища и замыкания соответствующих рефлекторных дуг на разных уровнях центральной нервной системы. В этом процессе участвует и гипоталамо-гипофизарная система с вовлечением гуморальных звеньев регуляции, что сопровождается, в частности, выделением окситоцина. Местное действие холода является также эффективным средством борьбы с гипотермическими и атоническими кровотечениями, являющимися одной из причин материнской смертности.

Для лечения травм и заболеваний опорно-двигательного аппарата разработаны методики холодового воздействия на патологически измененные ткани в пределах до 10—12 °С при обширных

травмах конечностей, включая разможежения и ампутации. При охлаждении снижается болевой синдром и сохраняется в достаточной мере кровообращение в конечности. При температурах до 5°C , достигнутых путем применения льда, снега и «сухого льда», предупреждается развитие тяжелых отеков и шока, а также удлиняются сроки наложения жгута или пневматической манжетки на конечность. Низкие температуры в сочетании с применением нейролептиков препятствуют развитию ишемического некроза, поскольку стабилизируют мембраны лизосом, а также ингибируют активность протеолитических ферментов, снижают потребление O_2 тканями, улучшают микрогемодициркуляцию в постиншемический период. При синдроме длительного раздавливания наряду с патогенетической терапией местная гипотермия в течение 6—12 ч блокирует болевую чувствительность и переводит ткани на гипометаболический режим функционирования, уменьшает величину плазмотери.

Хороший эффект оказывает гипотермия при реплантации конечностей. Ампутированные конечности можно сохранять на льду для последующей реплантации при температурах 0°C в течение 6—12 ч. Для сохранения жизнеспособности и предупреждения развития отека тканей рекомендуется проводить лечение открытых переломов костей в комплексе с местной гипотермией при $18\text{—}12^{\circ}\text{C}$. Это достигается с помощью охлаждения конечностей мешочками со льдом, охлажденными криопротекторами либо гипотермами, которые позволяют регулировать скорость охлаждения. С целью лучшего сохранения микрогемодициркуляции процедуры охлаждения можно чередовать с согреванием в течение 5—20 мин. Управляемая местная гипотермия в режиме $32\text{—}28^{\circ}\text{C}$ оказывает хороший клинический эффект в предоперационный период при обширных рвано-ушибленных ранах, особенно с повреждением нервов, сухожилий, костей и угрозой развития инфекционных осложнений. В случае, если холодовая терапия начата не позже 6—10 ч после травмы, общий срок гипотермии не должен превышать 56—60 ч с учетом того, что охлаждение производится с перерывами каждые 2—3 ч. Для холодового лечения травм опорно-двигательного аппарата в клинических условиях используют аппараты типов «Криоэлектроника-7», «Гипотерм», «Холод-2Ф», которые позволяют снизить температуру кожи охлаждаемой конечности на $2,5\text{—}5^{\circ}\text{C}$. Подобного рода аппараты с успехом применяются для локальной гипотермии спинного мозга при переломах позвоночника.

Локальная криотерапия тканей и органов

При воздействии низкими ($0\text{—}80^{\circ}\text{C}$) и сверхнизкими ($-80\text{—}-196^{\circ}\text{C}$) температурами на ткани возникают деструктивный, стимулирующий и анальгезирующий эффекты. Например, при обморожении конечностей, несмотря на деструкцию тканей, возникает

полная потеря болевой чувствительности. О болеутоляющих свойствах низких температур как средства для лечения травм и воспалений сообщалось Гиппократом, который рекомендовал использовать лед и снег для уменьшения боли при хирургических и травматологических операциях. Врачи древности, такие, как Авиценна (980—1070), Северино (1580—1656), Бартолино (1661), указывали, что холод является эффективным средством для предоперационного обезболивания. Болеутоляющие и деструктивные свойства низких температур впервые подробно изучены Д. Арнотом (1797—1883), который развил идеи криотерапии и явился ее ярким сторонником. Позже, в 1912 г., военные хирурги Б. Ларре и Н. И. Пирогов установили, что ампутации можно делать безболезненно и без кровотечений, если ткани предварительно промораживать.

Широкое использование охлаждения для устранения болевого синдрома при травмах и лечении послеоперационных ран в хирургии началось с 1941 г., т. е. в период второй мировой войны, когда травматическая болезнь приобрела массовый характер. Местное криовоздействие оказалось эффективным для лечения других видов патологии: постоянных головных болей, рожистого воспаления, невралгии, раковых заболеваний и т. д. Этому во многом способствовало внедрение в практику медицины хлористого этила, угольной кислоты, сжиженного кислорода и азота. Наиболее перспективным явилось применение жидкого азота (-196°C), поскольку последний обладал высокой инертностью и эффективностью. По мере накопления сведений о характере течения раневого процесса после криодеструкции выяснилось, что при определенных условиях низкотемпературного воздействия на ткани проявляется эффект стимуляции репаративной регенерации.

Различают следующие виды криовоздействия на ткани: метод аппликационной криодеструкции, разрушение с помощью распыления хладагента и комбинированные способы.

Локальное замораживание тканей до субнулевых температур сопровождается тремя видами эффектов: во-первых, криодеструкцией тканей, если интенсивность и время промораживания достаточны для их распада; во-вторых, криостимуляцией, когда криовоздействие селективно оптимизировано с учетом особенностей патологического процесса; и, в-третьих, криоаналгезией.

При замораживании тканей, вследствие развития внутриклеточной кристаллизации, происходят повреждение мембран и компонентов цитоплазмы клеток, денатурация клеточных белков, а на тканевом уровне — сосудистый стаз, возникновение вторичных микроинфарктов и очагов ишемического некроза. Поскольку криовоздействие нарушает нервную проводимость, процесс деструкции тканей протекает безболезненно. При этом зона повреждения обычно четко отграничивается от окружающей ткани, что позволяет, например, при злокачественных новообразованиях производить бескровное удаление опухолей и предупреждать диссеминацию злокачественных клеток.

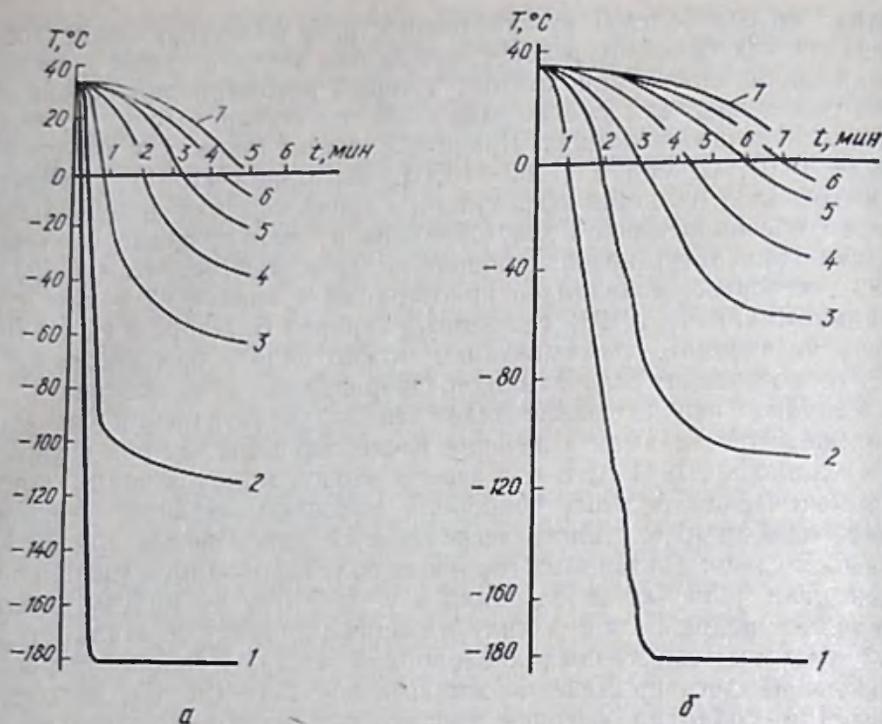


Рис. 80. Динамика температурного поля замороженной зоны печени собаки в зависимости от расстояния от аппликатора при различных скоростях охлаждения: а — скорость охлаждения 300 °С/мин; б — 75 °С/мин; 1 — показания температуры на аппликаторе; 2 — показания термомпары на расстоянии 5 мм от аппликатора; 3 — на расстоянии 10 мм; 4 — 15 мм; 5 — 20 мм; 6 — 23 мм; 7 — на расстоянии 25 мм

После криодеструкции тканей обычно не остается грубых рубцов, что свидетельствует о другом типе течения процессов регенерации, чем, например, после термических ожогов или механического разрушения тканей. Поскольку при температурах $-20...-160$ °С разрушаются все составляющие элементы ткани, за исключением коллагеновых и эластических волокон, можно сохранить целостность стенки крупных сосудов. Поэтому этот метод иногда применяют при разрушении тканей, содержащих крупные сосуды.

Очаговый крионекроз по своей природе очень похож на ишемический, т. е. он четко отграничен от окружающих тканей. Вначале в нем разрушаются чувствительные нервные окончания, а затем соматические клетки и ткани. При замораживании ткани *in vivo* в ней возникают зоны повреждения, имеющие специфические характеристики. Различается несколько участков зоны замораживания, расположенных концентрически от выходного отверстия контактного криоинструмента (рис. 80). Участок ткани, прилегающий непосредственно к аппликатору (-196°), где скорость замораживания достигает ~ -300 °С/мин, повреждается за счет интенсивной вне- и внутриклеточной кристаллизации клеток. В последующих участках, по мере удаления от центра криоаппликатора, ин-

тенсивность криоразрушения клеток и тканей различна. В наиболее удаленной зоне, лежащей на периферии замороженной области, происходит неполное замерзание, в силу чего клетки сохраняют свою жизнеспособность. Например, при криовоздействии на печень собаки в течение 15 мин выявляются 3 зоны: первая — зона крионекроза, имеющая вид ледяного пятна диаметром 55 мм и глубиной 15 мм, в которой клетки полностью разрушаются; вторая — диаметром 10 мм, с температурой поверхности 5 °С на границе с зоной замораживания, в этой зоне часть клеток остается жизнеспособной; третья — до 15 мм в диаметре, в которой степень охлаждения невелика, а возникшие в клетках изменения носят обратимый характер. Граница участка ткани сразу после криовоздействия довольно четкая, а после оттаивания имеет набухший красный цвет, что свидетельствует о развитии стаза и отека. Обычно через 7—14 сут эти явления исчезают, ткань на месте воздействия несколько уплотняется, а через 28 дней на месте криовоздействия образуется нежный рубец, который впоследствии исчезает.

Несколько меньше сведений имеется о характере распределения температурных полей и зоны замораживания при использовании неконтактного метода криовоздействия — криораспыления струи жидкого азота, — который оказался эффективным при лечении гнойно-некротических процессов и другого вида патологии в тканях. Различные типы тканей селективно реагируют на процесс замораживания, т. е. значение температуры крионекроза, при которой происходит необратимое разрушение клеток и межклеточного вещества, специфично для данного типа ткани.

Самый эффективный способ криоразрушения тканей — быстрое их замораживание с помощью контактного аппликатора со скоростью 200—250 °С/мин при условии очень медленного отогрева, при котором объем зоны крионекроза увеличивается до 90 %.

Температуры порядка —21...—30 °С являются оптимальными для достижения полной криодеструкции тканей при условии, если скорость замораживания быстрая, а время экспозиции аппликатора достаточно для полного замораживания биоматериала. В каждом отдельном случае условия для криодеструкции тканей следует разрабатывать экспериментально. С целью более полного крионекроза тканей часто используют двух-, трехкратные циклы замораживания — отогрева. Этот метод получил широкое распространение в онкологической практике, когда необходимо расширить зону крионекроза. При этом наиболее эффективным методом криодеструкции тканей паренхиматозных органов, в том числе опухолевых, является аппликационный либо комбинированный с факторами, усиливающими криодеструкцию, например ультразвуком, УВЧ-полем.

Существенное значение в углублении и распространении зоны крионекроза тканей при замораживании имеют степень их криоснабжения и особенности структуры, а также степень ишемии тканей и скорость отогрева. При замораживании ишемических тканей зона крионекроза обычно превышает ледяное пятно в 1,5—2,0 ра-

за, и повреждение существенно повышается при повторных циклах замораживания.

Наиболее эффективным деструктурирующим фактором является медленный отогрев замороженных тканей. Для повышения эффективности криовоздействия криотерапевтический аппарат должен обеспечить максимально быстрый выход на заданный режим рабочих температур с тем, чтобы в начальный момент кривоздействия обеспечивать адгезивный контакт криоинструмента с тканью. Степень рассасывания опухолей и продолжительность жизни животных после кривоздействия в значительной мере зависят от условий теплового контакта (табл. 50).

Таблица 50. Эффективность кривоздействия аппликатором диаметром 10 мм на карциному Герена у крыс при различных условиях теплового контакта

Кривоздействие контактным криозондом	Число животных	Количество крыс с полностью рассосавшимися опухолями		Продолжительность жизни крыс с рецидивами опухолей после операции, сут
		абсолютное	%	
С хорошим адгезивным контактом	93,0	44,1	47,0	50,0
С плохим адгезивным контактом	53,0	12,3	23,5	41,5
Контроль	65,0	—	—	28,5

Патофизиология кривоздействия. При кривоздействии на ткани вся совокупность повреждений практически является результатом повреждения клеток от замораживания. Поэтому все проявления криповреждений, обнаруживаемые при замораживании изолированных клеточных суспензий, можно в известной мере экстраполировать на клетки, находящиеся в составе замороженных тканей и органов. При очень быстром (200—300 °С/мин) замораживании преобладающим фактором повреждения тканей является внутриклеточная кристаллизация, а после медленного (2—4 °С/мин) — повреждения в результате действия «эффекта раствора».

Вместе с тем имеется существенная разница между замораживанием изолированных клеток *in vitro* и клеток в составе тканей *in vivo*. Эта разница, во-первых, заключается в том, что клетки в тканях расположены на различных расстояниях от рабочей поверхности криозонда и поэтому подвержены воздействию отличающихся режимов охлаждения и отогрева. При локальном кривоздействии на печень собаки аппликатором с температурой на выходе ~—196 °С замораживание клеток происходит с различными скоростями и интенсивностью в зависимости от расстояния до эпицентра (рис. 81). Клетки в каждом из этих участков повреждаются в различной степени. При этом большую роль играет степень нарушения проницаемости и кровообращения в микрососудах ткани. Вначале, при температурах ~11—3 °С, артериолы и вены под-

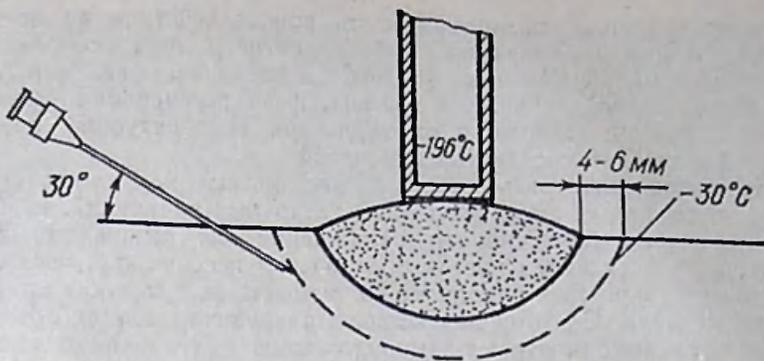


Рис. 81. Схема взаиморасположения термопары и криоаппликатора при контактном охлаждении опухоли кожи.

вергаются лишь спазму, который является своеобразным защитным механизмом. При дальнейшем понижении температуры до отрицательных значений повышается проницаемость сосудистых стенок, из клеток освобождаются серотонин и гистамин, увеличивается вязкость крови и интима клеток теряет свою эластичность. Возникает экстравазкулярный отек, поскольку снижаются внутрикапиллярное гидростатическое давление и скорость кровотока.

Большую роль в криповреждении тканей играет уровень их оксигенации и окислительно-восстановительных процессов, которые в физиологических условиях регулируются ферментами — супероксиддесмутазой, каталазой и системой глутатинон-пероксидазы, которые превращают H_2O_2 в H_2O . Если в процессе промораживания эти ферменты необратимо разрушаются, то характер репаративных процессов в тканях изменяется. Не меньшее значение при этом имеет нарушение барьерных функций плазматических мембран клеток, лизосом и митохондрий. Микроциркуляторная кровеносная система также очень сильно влияет на теплофизические параметры отвода и поглощения тепла, поэтому чем лучше сохраняется ее функциональное состояние, тем активнее протекают процессы регенерации после криовоздействия. Патологические изменения микрососудов сводятся главным образом к набуханию эндотелия, нарушению клеточных контактов и повышенной проницаемости капиллярной стенки. В результате этого развиваются явления стаза крови, агрегация форменных элементов и тромбообразование.

В целом процессы, происходящие в замороженно-отогретых тканях, можно представить в виде нескольких фаз. Это, во-первых, фаза замораживания и фаза отогрева, течение и эволюция которых зависят от интенсивности и величины температурного градиента, теплоемкости тканей и хладопроизводительности инструмента, времени и площади температурного контакта. Во-вторых, фаза кровенаполнения размороженного участка ткани, развивающаяся по двум направлениям: полное восстановление микро-

гемоциркуляции, если интенсивность криовоздействия не превышала критические величины, либо развитие и прогрессирование стаза и тромбообразования, что ведет к увеличению величины зоны ишемического некроза. В-третьих, фаза регенерации замороженных клеток, зависящая от характера температурных повреждений и глубины сосудистых изменений.

Если консервировать ткани, целые органы или опухолевую ткань, содержащие смесь различных клеточных популяций, то обеспечить оптимальную скорость охлаждения для выживания или разрушения всех видов клеток практически невозможно, поскольку чувствительность к холоду может изменяться в клетках одного и того же вида. Поэтому для полного разрушения клеток обычно прибегают к многократному замораживанию и оттаиванию тканей. Обычно после быстрого ($100-260^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) трехкратного замораживания — отогрева опухоли с температурой зонда -180°C пересадка ее животным не дает роста у реципиентов. Быстрая скорость охлаждения может быть достигнута при использовании криозонда диаметром 1 мм, охлажденного до -196°C . Эффективность повторных криодеструкций зависит от времени, прошедшего между циклами охлаждения: чем оно короче, тем больше глубина и распространенность зоны криодеструкции. Следует помнить, что некоторые виды вирусов и бактерий проявляют определенную устойчивость к действию низкой температуры и, освобождаясь из замороженных тканей, могут выживать и проявлять вирулентное действие. Поэтому снижение температуры до -180°C не гарантирует полной стерилизации обрабатываемых тканей.

Большинство соматических клеток при замораживании ниже -20°C разрушается, однако некоторые виды клеток, например раковые, сохраняют свои свойства при температурах ниже -60°C и даже -196°C .

При повторных циклах замораживания очень сильно изменяются теплофизические параметры тканей и степень микроциркуляции. Поэтому после первого цикла замораживания — оттаивания скорость охлаждения тканей сильно возрастает. Если цикл замораживания — оттаивания повторяется 2—3 раза, то в результате повреждения системы микроциркуляции клетки подвергаются внутриклеточной кристаллизации и разрушаются.

При воздействии низкими температурами не во всех случаях может быть достигнута криоаналгезия. В некоторых тканях, особенно пальцев рук или подошвы ног, весьма чувствительных к замораживанию, при кристаллизации жидкой части или в момент согревания возникают резкие болевые ощущения. Ткани после криовоздействия обычно разбухают и становятся отечными в момент отогрева, особенно у молодых и пожилых пациентов; в течение первых 2—4 ч появляются пузыри или кровонезлияния, после вскрытия которых формируется эрозивная корка, гранулирующая на протяжении 2—3 нед. Образующиеся при этом рубцы обычно малозаметны, и поэтому косметические исходы криолечения всегда лучше, чем после хирургического иссечения.

Заживление раны зависит от ее размеров и глубины, возраста больного, характера и локализации очага. Например, заживление криоран вокруг глаз или области лба у пожилых людей может приобретать торпидное течение из-за длительного отека тканей. Осложнения подобного рода могут также возникать после криолечения патологических очагов, расположенных в области носа и ушной раковины. Замораживание этих областей опасно перфорацией хряща, заживление которого может длиться месяцами. Особую осторожность следует проявлять при криообработке век, так как замораживание этой области может вызывать повреждение слезно-носового канала.

Функция крупных кровеносных сосудов в местах криоаппликации устойчиво блокируется, в связи с чем послеоперационные кровотечения наблюдаются сравнительно редко. Функция некоторых нервных стволов, например лицевого нерва, после криовоздействия может быть временно блокирована, однако через определенный промежуток времени она полностью восстанавливается, т. е. нервная ткань после умеренного замораживания хорошо регенерирует. После криовоздействия ($-10...-20^{\circ}\text{C}$) аксоны периферических нервов обычно дегенерируют, захватывая миелиновую оболочку и швановские клетки. После криодеструкции указанным выше температурным воздействием восстановление структуры нерва происходит со скоростью приблизительно $1,2\text{ мм/день}$. Аксоны периферических нервов после криовоздействия обычно регенерируют без образования нейром, так как коллагеновый матрикс и периневрий при этом остаются неповрежденными. При замораживании ткани мозга вначале возникает белесая зона, в которой миелиновая оболочка нейронов набухает и нередко разрывается, а цитоплазма клеток сильно вакуолизируется. Однако спустя $2-2,5$ нед эти явления стихают и наступает заживление очага с минимальным развитием в нем фиброзной ткани.

Эпидермис кожи после криовоздействия регенерирует достаточно хорошо, а криораны довольно быстро заполняются клеточным инфильтратом, в котором преобладают макрофаги, лимфоциты и эозинофильные гранулоциты. При криовоздействии на слизистую полость рта регенерация тканей происходит также хорошо с формированием малозаметных рубцов. При замораживании ткани век могут возникать повреждения слизистых оболочек, в результате чего развивается тромбоз или стеноз просвета сосудов.

Большие кровеносные сосуды, особенно артерии, устойчивы к воздействию низких температур. Так, после замораживания тканей до -150°C в течение $5-10$ мин не выявляются макроскопические изменения эндотелия в просвете сосудов. При этом интима сосудов обычно не отделяется от внутреннего слоя, а эластические волокна сохраняют свою упругую функцию. Костная ткань, связки, фасции, оболочки сухожилий, периневрий и опухолевые клетки относительно устойчивы к действию замораживания.

Криотерапия в нейрохирургии. Методы криотерапии очень давно применяются в нейрохирургической практике для лечения доб-

ро- и злокачественных опухолей, а также патологических изменений отдельных зон ткани мозга. Для деструкции ткани мозга ее необходимо проморозить не менее чем до -20°C с помощью криозондов и стереотоксической таламоектомии, например при болезни Паркинсона, при выраженном треморе и ригидности, обусловленных поражением ветролатеральных ядер мозга. Криотерапевтический метод деструкции мозга имеет значительное преимущество перед химическими, механическими и другими методами, поскольку позволяет надежно устранять причину и симптоматику указанных выше болезней.

Для криоразрушения крупных по размеру опухолей мозга, расположенных на поверхности, применяют в основном контактные методы, а расположенных в глубине — стереотоксические методы.

Глубоколежащие опухоли мозга, например в таламусе, третьем желудочке, гипофизе, разрушают комбинированным стереотоксическим способом в сочетании с криовоздействием, при котором используют три цикла замораживания — оттаивания с температурой наконечника до -80°C .

Криотерапия используется также для лечения мигрени, поскольку холодовое воздействие влияет на состояние сосудов мозга. Для этого замораживают область затылочной и височной артерий криозондом с температурой наконечника $-120\text{...}-160^{\circ}\text{C}$ без контакта с артерией. После повторных циклов замораживания — оттаивания в 45 % случаев боли могут быть устранены. Хотя однократное замораживание кровеносных сосудов не вызывает их полный тромбоз, однако из-за истончения их стенок через несколько недель может развиваться стеноз и даже полная облитерация сосуда. Это свойство низких температур влиять на проходимость сосудов используют при обработке различных артериовенозных аномалий, в том числе и ангиом. После многократных криоаппликаций с помощью открытой криогенной техники сосуды полностью облитерируют и уменьшаются в размере.

Аденогипофизная гиперфункция и опухоли гипофиза, являющиеся причинами акромегалии и синдрома Кушинга, в течение многих лет устранялись путем общего или частичного удаления нейрогенных тканей, путем внешнего облучения и трансфеноидальной имплантации радиоактивного иттрия. Однако каждый из этих методов давал незначительный эффект. В 1963 г. было осуществлено частичное криоразрушение гипофиза зондом через трансфронтальный канал, хотя при этом существует риск повреждения лобных долей мозга и оптических нервов.

Сейчас разработан трансфеноидальный метод, при котором криозонд внедряют в центр либо сбоку турецкого седла, после чего проводят замораживание ткани мозга при температурах $-50\text{...}-70^{\circ}\text{C}$ либо -180° на протяжении 8—10 мин. При этом криоразрушение турецкого седла осуществляют на 3—4 мм от средней линии, так как это является более эффективным. Удаление гипофизарной железы криозондом при температурах -180°C применяется также для снижения роста метастатического рака

простаты и прогрессирующей пролиферирующей диабетической ретинопатии. При этом положительный эффект отмечен приблизительно в 50 % случаев.

Криотерапия и криохирургия органов брюшной полости. Низкотемпературное воздействие на ткани органов брюшной полости прежде всего оказывается эффективным как мера профилактики и остановки кровотечений при операциях на паренхиматозных органах (печень, почка, поджелудочная железа), которые весьма богаты кровеносными сосудами и способны депонировать большие объемы крови. Так, с целью обеспечения более надежного гемостаза при операциях на печени вначале осуществляют предварительное промораживание линии рассечения криоаппликатором с температурой $-180...-196^{\circ}\text{C}$, а затем отдельные участки печени, замороженные аппликатором при температуре -196°C , могут быть полностью удалены. Методом криовоздействия можно удалять кисты печени и цирротически измененные доли печени без риска профузного кровотечения. Этот метод оказался эффективным при лечении кистозных и паразитарных образований печени, например альвеококка, ткань которого погибает через 5 мин при температуре ниже -80°C . Криодеструкция печени при альвеококкозе является методом выбора, так как из-за поражения ворот печени радикальная операция невозможна. Для более глубокого промораживания тканей используют криоультразвуковой скальпель, который дает хорошие результаты при удалении различных опухолей печени. При криохирургических операциях на печени осложненных в виде перитонита, кровотечений, гематом, абсцессов обычно не возникает.

Применение метода криовоздействий является также перспективным при лечении патологии поджелудочной железы. Так, с помощью криовоздействий удастся прервать течение панкреонекроза, снять ферментативную токсемию и отключить ее эндокринную функцию. Низкотемпературное воздействие, которое позволяет снизить температуру ткани поджелудочной железы при ее остром воспалении до $5-8^{\circ}\text{C}$, оказывает анальгезирующее, противовоспалительное действие и задерживает процессы деструкции в паренхиме железы. Для местного подавления развития и распространения инфекции по заброшенной клетчатке лучше криовоздействие производить криозондом с температурой $-140...-175^{\circ}\text{C}$ в течение 2—3 мин с последующим дренированием ложа поджелудочной железы.

Сейчас разработан способ лечения острого деструктивного панкреатита путем криообработки участков железы при температуре $-140...-196^{\circ}\text{C}$ продолжительностью 10—15 с. Способ выгоден тем, что подавляет процессы ферментативного катаболизма в ткани железы и снимает болевой синдром в остром периоде и после оперативного вмешательства.

Методы криовоздействия применяют также при лечении хронического рецидивирующего панкреатита со стойким болевым синдромом. С этой целью производят криодеструкцию аппликатором с

температурой -196°C и экспозицией 2 мин. Для избирательной деструкции экзокринного аппарата железы при сохранении свойств островковой ткани необходимо криоапликатор с температурой -15°C экспонировать на поверхности ткани в течение 20—25 мин при условии блокирования кровотока в селезеночной артерии.

Для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта сейчас также широко применяется эндоскопическая криохirurgия. Например, для устранения потока патологических импульсов, нарушающих секрецию клеток желудка, используют эндоскопическое замораживание блуждающего нерва. Для лечения дуоденальных язв применяют охлаждение зоны воспалительного очага путем его орошения при температуре $-12\text{...}-28^{\circ}\text{C}$ в течение 10—20 с с помощью фибро-гастроскопической техники. При этом достаточно от одного до пяти криоорошений через 3—4 дня для достижения положительных результатов. В данном случае после криоорошений возникает эффект стимуляции регенеративных процессов, способствующих заживлению язвы двенадцатиперстной кишки. После 2—3 сеансов криовоздействия четко прослеживаются активная эпителизация и фиброз язвы, через 5 сут уменьшается или исчезает болевой синдром, а спустя 8—10 дней снижаются диспепсические явления. Полное рубцевание язвы наступает у 96,9 % больных. Эндоскопическая криотерапия с помощью криоэлектрокоагулятора оказалась эффективной также при остановке гастродуоденальных язвенных кровотечений, удалении полипов верхних отделов желудочно-кишечного тракта.

Точечные промораживания патологически измененной ткани желудка и 12-перстной кишки являются менее травматичными, значительно сокращают сроки заживления язв, поскольку восстановительные процессы в зоне патологического процесса ускоряются.

Криотерапия в отолярингологии. Наиболее выраженный эффект криотерапии, позволивший внедрить криометоды в отолярингологию, проявился в ее гемостатическом действии. В связи с этим стало возможным успешно лечить, например, такие сосудистые заболевания верхних дыхательных путей, как капиллярная гемангиома носа или носоглотки, полипов носа, измененную тонзиллярную ткань, вестибулярный нейроэпителий при болезни Меньера. Для этого применяют зонды диаметром около 3 мм, температурой наконечника $-140\text{...}-160^{\circ}\text{C}$ с двухцикловой экспозицией от 2 до 3 мин. Методом криотерапии можно лечить повреждения лицевого нерва, после криообработки которого выздоровление обычно наступает в течение 6 нед. Криоэндоскопические аппараты и инструменты широко используют для лечения патологических процессов в труднодоступных местах, например для разрушения папилломатозных образований трахен и бронхов, которые дают положительные результаты у 75 % больных. Криозонды, работающие на жидком азоте и охлаждаемые до -170°C , используют для трехцикловой криотерапии опухолей трахен и бронхов продолжительностью по 3 мин, что обеспечивает промораживание ткани в радиусе 2,2—3 см от наконечника зонда и снижение температуры бронха до

—30 °С. При лечении рубцовых стенозов трахей в сочетании с обычным бужированием применяют многократные криовоздействия продолжительностью по 30—90 с.

Замораживание небных миндалин у больных с хроническим тонзиллитом обычно осуществляется при температуре рабочего наконечника —60...—196 °С при экспозиции от 25 с до 8 мин. Эту процедуру чаще всего производят до 2,5 мин с помощью аппарата КЛО-02 в условиях амбулатории без анестезии. Имеются также успехи в лечении хронического гипертрофического фарингита, а также суб- и атрофических гипертрофических ринофарингитов методом аппликационного криовоздействия длительностью 10—60 с, иногда с повторными циклами криовоздействия. При суб- и атрофических состояниях криовоздействие проводят по типу касания с экспозицией 3—5 с.

Криотерапевтические методы воздействия находят свое применение также при лечении наружного диффузного отита путем криоаппликации или криоорошений соответствующих тканей уха. При хронических гнойных отитах среднего уха для удаления грануляций и полипов среднего уха, выходящего к отверстию слухового прохода, целесообразно провести 10—12 сеансов криовоздействия.

Криотерапия в камбустиологии и хирургии гнойных ран. Дозированное криовоздействие находит все большее распространение для лечения ожоговых и гнойных ран. Криораспыление жидкого азота на поверхность патологического очага в существенной мере улучшает течение воспалительного процесса и выживаемость животных и человека (табл. 51). Под влиянием холодового воздействия на протяжении 20—30 с в виде распыления парожидкостной струи азота температура кожи снижается до —12...—16 °С. После криовоздействия течение раневого процесса принимает активный характер, происходят более быстрое отторжение некротических тканей и развитие грануляций. Криовоздействие в этом случае не только сокращает сроки заживления, но и качественно улучшает процесс регенерации тканей.

В случае инфицированных гнойных ран криовоздействие оказывает влияние и на бактериальную обсемененность в основном за счет устранения грамотрицательных видов микроорганизмов. Эффективно действует метод распыления жидкого азота на протяжении 30—40 с для лечения послеожоговых и послеоперационных рубцов, особенно при их увеличении или изъязвлении.

Таблица 51. Влияние охлаждения на летальность обожженных больных и экспериментальных животных

Распространенность ожогового процесса	Смертность, %	
	без охлаждения	после охлаждения
50 % поверхности тела у больных	16,0	7,0
40 % поверхности тела крыс	64,5	2,5
10—15 % поверхности тела крыс	27,9	13,3

Положительное действие оказывает криоорошение при лечении гнойно-некротических поражений мягких тканей. Этот эффект усиливается, если комбинировать распыление жидкого азота с лазерным облучением, поскольку в этом случае более активно протекают процессы регенерации, раны быстрее очищаются от клеточного детрита, а развитие патогенной микрофлоры тормозится. В этом случае двукратное комбинированное криовоздействие оказывает хороший эффект при лечении карбункулов, абсцедирующих фурункулов и постинфекционных абсцессов.

Криохирurgia в онкологии. Криогенный метод лечения интенсивно внедряется в область онкологии, поскольку при обычных хирургических вмешательствах бывает очень трудно устранить диссеминацию жизнеспособных опухолевых клеток в труднодоступные зоны. Например, при операбельном раке желудка имеются одиночные метастазы в такие труднодоступные места, как ворота печени и забрюшинные лимфоузлы. В этих случаях криодеструкция регионарных метастазов является методом выбора. В табл. 52

Таблица 52. Виды опухолей, поддающихся криолечению

Природа опухоли	Доброкачественные и предраковые	Злокачественные
Эпителиальные	Папиллома, себорейная кератома, кожный рог, кератоакантома, кератоз	Базалиома Плоскоклеточный рак кожи
Соединительнотканевые	Ангиофиброма	Саркома и фибросаркома, дерматофибросаркома
Сосудистые	Гемангиома, ангиокератома, лимфангиома	Злокачественная гемангиома, эндотелиома, ангиосаркома, саркома Капоши, лимфоангиосаркома

представлены различные виды опухолей, подлежащих удалению с помощью методов криодеструкции. Криодеструкция — метод активной специфической иммунотерапии, поскольку разрушенные замораживанием опухолевые клетки являются антигенными стимуляторами, активизирующими клеточный иммунитет.

При хирургическом или диатермокоагуляционном способе удаления опухолей ответная иммунная реакция в организме выражена слабо. Однако после удаления опухоли с помощью криодеструкции возникает обширный распад тканей, при котором такие антигеноформирующие комплексы, как, например, липопротеины тканей, системы антиген — антитело, белковые рецепторные участки мембран, гликопротеиновые регуляторы и ядерное вещество клетки, остаются не полностью инактивированными. В процессе криодеструкции эти вещества («некрогормоны») поступают в кровеносное русло и вызывают генерализованную иммунную и нейрогуморальную реакцию. Под влиянием «нейрогормонов» происходит дополнительное разрушение клеток того же самого органа, пораженного, например, злокачественной опухолью. Клиницисты

обнаружили, что такая направленность процессов ведет к подавлению злокачественного роста вплоть до исчезновения опухолей или регрессии вторичных метастатических узлов. Правда, такой нейрогуморальный ответ происходит в результате замораживания только определенных видов злокачественных новообразований и длится короткий промежуток времени. У экспериментальных животных после криодеструкции саркомы метастазы развиваются реже, чем у животных, у которых опухоль удаляется хирургическим путем.

Сейчас не ясно, насколько обнаруживаемый иммунный ответ при криодеструкции опухоли является специфичным. Поэтому представляется важным дальнейшее выяснение механизма действия замороженных гомогенатов опухоли на организм.

Криотерапия сейчас широко используется для разрушения доброкачественных и локально агрессивных опухолей, таких, как лейкоплакия, базально-клеточная карцинома и другие виды опухолей, особенно локализованных на внешней поверхности тела. При использовании криометодов достигается достаточно хороший клинический и косметический эффект. Положительные результаты получены при криолечении предраковых поражений, в частности анальных бородавок и ректальных полипов. Криоразрушение ректального рака сопряжено с опасностью развития таких тяжелых осложнений, как анальный сепсис, аноректальные фистулы, кровотечения, стеноз или прободение стенки кишки.

Криотерапия изредка используется для обработки первичных бронхопульмональных повреждений и легочных метастазов, лечения урологических заболеваний, например для рака мочевого пузыря и варрикозной карциномы полового члена. Более широко метод криотерапии применяется для лечения заболеваний и опухолевых поражений простаты. Криохирургические методы лечения онкологических процессов показаны в тех случаях, когда необходимо удалить опухоли, в том числе сосудистого характера, у больных со склонностью к келлоидозу и расположенные в области лица, где другие методы дают плохие косметические результаты. Целесообразно использовать криолечение в случаях упорных или рецидивирующих опухолей после хирургического, лучевого и химиотерапевтического лечения, особенно у больных с тяжелым общим состоянием, и, наконец, при быстро прогрессирующих опухолях больших размеров, осложненных эрозивными кровотечениями и нагноениями.

При выполнении криохирургической операции в случае опухолей больших размеров необходимо так расположить терморпару, чтобы она локализовалась на 4—6 мм от границы предполагаемого крионекроза под углом 30—40° к поверхности кожи (см. рис. 81). При этом изотерма с показаниями уровня температуры должна проходить на границе, отмеченной как зона предполагаемого крионекроза.

Криохирургический метод лечения новообразований, указанных в табл. 52, является, по сути, методом выбора. При этом крио-

распыление с захватом здоровых тканей на расстоянии 3—5 мм эффективно при лечении остроконечных кондилом, контагиозного моллюска, кератоакантом, локализованных в области лица, а также таких предраковых поражений кожи, как себорейная или сеипльная кератома, кожный ожог, болезнь Боуэна, кератозы. Однако при лечении большинства видов сосудистых опухолей кожи и лица (лимф- и гемангиом) лучше использовать контактный криоаппликационный метод продолжительностью воздействия до 120 с при температуре рабочей поверхности криозонда в пределах -180°C , за исключением сосудистых опухолей, локализованных в области красной каймы губ, которые требуют экспозиции аппликатора не менее 3—5 мин.

Криотерапия является методом выбора при лечении аденом, базально-клеточных эпителиом, дерматофиброза, кератоза, варикозных язв, а также дает хорошие результаты при удалении ангиом, карбункулов, эпителиом, круглых гранулем и герпеса, келлоидных поражений, язвы на почве эритематозной волчанки, родимых пятен, миксоидных цист, гемангиом и эпителиом век.

В дерматологии для лечения различного рода дерматозов, фибром, базалиом кожи, кератодермий и других заболеваний сейчас также применяют низкие температуры. Обычно заживление кожи после криовоздействий характеризуется активным развитием грануляций и достаточно быстрой и косметически благоприятной эпителизацией раневой поверхности. Методы криотерапии могут использоваться в самостоятельном виде и в сочетании с радио- и химиотерапией. Особенно ценным является применение криотерапии в тех случаях, когда требуется хороший косметический эффект, например при операциях на таких участках, как лоб, нос, глаза, веки, хрящи, которые сложно и опасно подвергать облучению.

Криохирургический метод в области онкологии брюшной полости используют для разрушения добро- и злокачественных опухолей, расположенных как на поверхности, так и в глубине органов, поскольку одновременно с деструкцией опухоли осуществляются абластика и гемостатический эффект, что предупреждает первичное и вторичное кровотечения в сильно васкуляризированных тканях. Метод деструкции опухолей без их последующего удаления может применяться в качестве паллиативного или радикального лечения, например в урологической практике для лечения рака предстательной железы и мочевого пузыря как радикальное лечение, а в проктологии — с целью восстановления пассажа при подготовке больных к радикальному хирургическому вмешательству. Хорошие результаты могут быть получены при криохирургическом удалении опухолей головы, шеи, языка, особенно в тех случаях, когда опухоли плохо поддаются оперативному, химиотерапевтическому и лучевому лечению или в случае гемангиом, ангиофибром и других смешанных опухолей, локализованных в местах повышенного операционного риска, например опухоли углов глаз, красной каймы губ, носа и т. п.

В последнее время начала интенсивно развиваться криохирургия опухолей печени. Это связано с тем, что печень содержит мало опорных связывающих белков типа коллагена и чрезвычайно богата кровеносными сосудами, способными депонировать большие объемы крови. Поэтому при обычных хирургических операциях возникают профузные кровотечения, которые бывает трудно блокировать механическим путем. Перевод части ткани печени в твердое, закристаллизованное состояние снижает кровопотерю и уровень диссеминации процесса. Криодеструкцию опухолей печени осуществляют путем контактной низкотемпературной аппликации при температуре криоинструмента на выходе $-170...-185^{\circ}\text{C}$.

Метод криодеструкции может быть с успехом применен при операциях у больных раком пилорического отдела желудка как первый этап хирургического удаления опухоли, при полипах верхнего отдела пищеварительного канала с помощью криоэлектрокоагулятора.

Криодеструкция опухолей поджелудочной железы представляет довольно сложную и трудную задачу в клинической онкологии и используется главным образом в случаях, когда невозможно радикально удалить опухоль из-за ее прорастания в магистральные сосуды либо при тяжелом общем состоянии больных. В этом случае низкотемпературный метод является фактором, повышающим эффективность хирургического лечения, либо как способ блокирования болевого синдрома и повышения условий абластики.

Криотерапия в стоматологии. В стоматологической практике криотерапевтические методы лечения обычно дают хорошие результаты. Так, криообработка широко используется для лечения предраковых поражений нёба, щек, языка, красной каймы губ и других областей. В отдельных случаях криотерапия в стоматологии также используется как средство для разрушения карцином.

Доброкачественные повреждения слизистой полости рта, такие как папилломы, фиброэпителиальные полипы, круглоклеточные и слизисто-ретенционные кисты, а также гранулематозы, васкулярные родимые пятна, гем-, фибро- и лимфангиомы, эффективно поддаются лечению криометодами. Хороший анестезирующий эффект оказывает криотерапия при герпесе и язвах слизистой оболочки рта с выраженным болевым синдромом. Сейчас внедряются новые криометоды таких трудно поддающихся лечению заболеваний полости рта и красной каймы губ.

Криотерапия в травматологии. Криотерапевтический метод используют также для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата. Поскольку жидкий азот вызывает некроз патологически измененных тканей, орошение им суставной поверхности применяется в строго показанных случаях, например при дегенеративно-дистрофических поражениях суставов и заболеваниях позвоночника, сопровождающихся постоянным болевым синдромом. Поскольку крионекроз в тканях диска возникает при температуре -18°C , а ее изотерма располагается на расстоянии 3 мм от края крио-

зонда, надо поддерживать быструю скорость замораживания ($\sim -60^\circ\text{C}/\text{мин}$) и в течение 5 мин снизить температуру тканей диска до конечной температуры. При более медленных скоростях замораживания достаточно глубокого криоразрушения диска не происходит.

Для лечения остеохондроза с выраженным болевым синдромом осуществляют точечные криовоздействия инструментом с температурой наконечника $-140\dots-196^\circ\text{C}$ вдоль позвоночника по паравертебральным и другим проекционным точкам с экспозицией 5—10 с либо орошение этих зон парожидкостной струей азота на протяжении 3—8 с. С успехом криовоздействие используется для устранения эпикондилитов, плохо поддающихся традиционным методам лечения.

Неопластические и другие виды патологической костной ткани можно удалять из кости путем локального замораживания без радикальной ампутации костного сегмента. Поэтому метод криотерапии применяют при обработке гигантоклеточных опухолей и хондросарком. Обычно проводят комплексное лечение: вначале опухоль хирургически удаляется, а затем зона оперативного вмешательства подвергается одно- или двукратному криовоздействию при температуре -21°C с целью разрушения остаточных опухолевых клеток. Наблюдения за течением послеоперационного периода у больных после удаления остеокластомы и фиброзной дисплазии с последующей криоэксскохлеацией очагов и пломбировкой костной стружкой показали, что при этом методе обработки костные трансплантаты лучше приживаются, а рецидивов неопластического роста не наблюдается.

Криотерапия в акушерстве и гинекологии. Показаниями к применению криовоздействий в гинекологии являются различные патологические нарушения, например эрозии, диспластические процессы после удаления полипов, эндометриоз матки, лейкоплакии, остроконечные кандиломы, дисфункциональные маточные кровотечения, гиперпластические процессы эндометрия, аденомиоз матки.

Для криокоагуляции эрозий, полипов и лейкоплакии шейки матки обычно используется маточный криозонд с температурой наконечника -196°C и экспозицией 2—4 мин. Преимуществом криовоздействия перед другими видами лечения является возможность его применения в амбулаторных условиях, поскольку процедура криовоздействия безболезненна, исключает обильные кровотечения и сохраняет эластические свойства ткани шейки. Комбинированные методы лечения, сочетающие крио- и электрохирургические воздействия, оказываются эффективными у больных с большой глубиной поражения шейки матки, подлежащей удалению. При кистозе желез шейки матки с эктопией, гиперплазии слизистого канала шейки матки с эктопией применяют контактное криовоздействие в комбинации с криорошением. При некоторых криорезистентных формах поражений шейки матки (папиллярная эктопия, эндометриоз, лейкоплакия, рубцы) возникает необходимость сочетанного действия замораживания и ультразвукового из-

лучения, что усиливает деструктивный распад тканей. Для этих целей применяют контактное замораживание криоинструментом с температурой наконечника -196°C (температура ткани — в пределах -160°C) и ультразвуковые колебания интенсивностью $0,4 \text{ Вт/см}^2$ и частотой 880 Гц . При таком комбинированном способе воздействия сроки регенерации патологически измененной ткани сокращаются с 6,5 до 3,5 нед. Максимальную деструкцию тканей можно достичь, если ультразвуковое излучение применить при отогреве тканей или после их циклического замораживания — отогрева.

Криотерапевтическое лечение патологии тела матки чаще всего применяют при развитии гиперпластических процессов в эндометрии (железисто-кистозная и полипозная гиперплазия), когда основным синдромом являются дисфункциональные маточные кровотечения. Для этого применяют тотальное замораживание эндометрия. При очаговых внутриматочных поражениях (подслизистые миомы, полипы) чаще всего применяют методы криоэндоскопического воздействия, когда можно осуществить визуально наблюдаемое замораживание необходимого участка тканей. После таких воздействий уменьшается геморрагия, нормализуется менструальный цикл, что объясняется рефлекторными воздействиями на интерорецепторы тела матки, регулирующие физиологические и метаболические процессы в клетках. Хорошие результаты лечения могут быть достигнуты при использовании комбинированного криогормонального воздействия.

Внутриматочное криовоздействие оказывает стимулирующее влияние на Т-лимфоциты и нормализует функцию В-лимфоцитов, что в итоге приводит к усилению иммунобиологических реакций в организме.

В онкогинекологии для лечения подслизистых миом матки и злокачественных новообразований с гемостатической целью применяют одно- или многократное криовоздействие с помощью криоэндоскопического зонда на протяжении 4—5 мин, особенно когда имеются обширные поражения тканей с разрушением сосудов. При лечении рака шейки матки применяют одноразовое или циклическое замораживание — отогрев с помощью криозонда, работающего на жидком азоте, с температурой наконечника $-120... -160^{\circ}\text{C}$ и временем экспозиции 3 мин. В показанных случаях это лечение комбинируют с радиевой терапией. Криотерапевтическое воздействие как метод паллиативной терапии при злокачественных поражениях генитальной сферы имеет преимущества перед другими видами воздействий, так как позволяет уменьшить уровень кровотечения из пораженной ткани, снизить ее воспалительную реакцию и болевые ощущения, поскольку замораживание вызывает эффект криоаналгезии. На фоне предварительного криовоздействия происходит более успешно оперативное лечение, поскольку у пациентов возрастает иммунная резистентность в результате всасывания и действия продуктов распада опухолевой ткани.

Криохирургические воздействия применяют также в акушерстве, в частности у беременных с заболеванием шейки матки (эрозия, лейкоплакия, кровотечения), при остановке гипо- и атонических кровотечений в раннем послеродовом периоде в комбинации с традиционным химико-фармацевтическим лечением. Для этого используют местную циклическую гипотермию на протяжении 15—20 мин, что вызывает усиление сокращения матки. Для обработки доброкачественных и предраковых повреждений шейки матки можно также использовать твердую CO_2 , а также газообразный фреон, которые дают неплохие результаты. Однако современная криотерапия чаще всего для медицинских целей использует жидкоазотные криозонды.

Криотерапия в офтальмологии. Криотерапия находит применение и в офтальмологии, поскольку с помощью охлажденного зонда, обладающего способностью активно прилипать к влажной ткани, можно прикреплять линзы во время операций по поводу катаракты или при удалении глаза, пораженного меланомой. Использование криозонда позволяет локально и весьма селективно повреждать внутриглазные ткани без разрушения склеры глазного яблока. Криометод применяется при лечении патологии роговой оболочки (помутнение, дистрофия), помутнении эндотелия и стекловидного тела, а также достаточно эффективно для разрушения небольших по размеру периферических гемангиом и части цилиарного тела. Неплохие результаты криотерапия дает при лечении глаукомы, тиктазиса и опухолей век, ткани которых легко разрушаются при температурах $-15...-20^\circ\text{C}$. Однако криовоздействия оказались неэффективными при лечении энтропии, хотя они могут использоваться в сочетании с хирургическим методом для обработки тканей глаза. Метод низкотемпературного воздействия также применяется для лечения небольших ран в зоне слезного канала, поскольку он устойчив к действию замораживания, а также устранения сквозного папилломатоза и себорейного кератоза.

Таким образом, успехи в области криохирургии привели к тому, что криодеструкция патологических, преимущественно опухолевых, образований в легкодоступных областях тела человека, таких, как слизистая оболочка рта, шейка матки, кожа, стала методом выбора. Достижения, полученные также криохирургией в стоматологии, гинекологии, дерматологии при лечении хронических предраковых процессов и других видов патологии, позволяют широко использовать этот метод в данных областях медицины. Однако применение низких температур для лечения распространенных опухолей желудка, кишечника, печени, поджелудочной железы и других органов пока еще не вышло за пределы экспериментальных и клинических апробаций.

Применение криометодов в ветеринарии. Криотерапия как метод лечения стала широко применяться в ветеринарной практике с 1970 г. В лаборатории К. Грина (Англия) криометоды применяются при удалении опухолей у птиц и мелких млекопитающих, таких, как хомяки и другие лабораторные животные. Крио-

терапевтические методы также используют для лечения кожных повреждений у собак и кошек, а также деструкции язвенных поражений гранулом, различных кист, хронических дерматитов, сопровождаемых дермальной гиперплазией, папиллом, опухолей век, анального фурункулеза.

Совсем недавно установлено, что ряд злокачественных опухолей, таких, как карциномы и меланоциты рогатого скота и лошадей, может быть устранен с помощью метода криотерапии. Она оказалась также эффективной при лечении хронических язвенных стоматитов, встречающихся у кошек и змей, а также при обработке доброкачественных опухолей, таких как полипы или эпюлиды у собак и кошек. Особенно трудно лечить у собак злокачественные орофарингиты. В этом случае эффективная обработка холодом первичной опухоли является весьма эффективной и предупреждает возникновение метастазов в тонкую ткань.

У лошадей лечение методом криотерапии обширных грануляционных разрастаний ткани вследствие поражения углов рта, глазных яблок является методом выбора. Криотерапевтические методы могут быть рекомендованы для лечения сквамозно-клеточной карциномы полового члена у этих видов животных. Криоаналгезия иногда применяется для осуществления нейроэктомий у лошади с целью снятия хронических болей. При использовании метода криотерапии следует учитывать тот факт, что при холодовом вымораживании крупных по размеру опухолей необходимо применять дополнительно либо проводниковую анестезию, либо общий инкубационный наркоз.

Криоаналгезия. При охлаждении периферических нервных стволов до $10-0^{\circ}\text{C}$ возникает обратимая аналгезия подобно тому, как это происходит при использовании химических анестетиков.

При замораживании нервных стволов до 5 или -20°C возникает уже пролонгированная анестезия. Однако при этом аксоны глубоко не повреждаются, перин- и эпиневррий остаются при этом почти интактными, что обеспечивает последующую регенерацию нерва и восстановление сенсорной и двигательной активности. Сейчас аналгезирующее действие низкой температуры достаточно широко используют в клинической практике для лечения острых и хронических болевых синдромов, например фантомных болей. Это направление в медицине в целом получило название криоаналгезии.

Тот факт, что низкотемпературная блокада нерва вызывает длительную и обратимую аналгезию, имеет существенное преимущество перед другими методами разрушения нерва, такими, как, например, его иссечение или пересечение. Использование криоаналгезии для облегчения хронических болей показало, что у 81 % больных наступает заметное ослабление болевого синдрома, причем со средней продолжительностью примерно 11—30 дней. У некоторых пациентов удается устранить болевой синдром до 224 дней, если использовать для этих целей открытый способ криоаналгезии. Другие методы криоаналгезии, например подкожный, являют-

ся менее эффективными, т. е. больные в этом случае испытывают только кратковременное обезболивание. Это связано с тем, что функция нерва не полностью блокируется, поскольку в живых, васкуляризуемых тканях очень трудно снизить температуру нерва ниже -20°C , т. е. до обратимой блокады нерва. Метод криоаналгезии может быть использован у больных для устранения болей при стойких миозитах, при повреждениях лицевого нерва, нетипичных лицевых невралгиях, а также злокачественных формах невралгий. В этих случаях после открытой обработки нерва у 90 % больных может быть получен хороший эффект. Существенное значение имеет криоаналгезия в послеоперационном периоде, когда можно устранить межреберную невралгию низкотемпературным контактным способом. При этом послеоперационные боли снижаются более интенсивно, чем у больных, лечащихся другими методами. Важно также то, что замораживание периферических нервов вызывает обратимый анальгезирующий эффект и не приводит к образованию нейромы, не дает нейритов и может быть повторено по соответствующим показаниям.

Гипотермическая и криогенная техника в медицине

История медицины свидетельствует, что применение холода с лечебной целью явилось первым и наиболее универсальным средством борьбы с различными заболеваниями. Однако широкие возможности применения холода появились в медицине после создания специальной криогенной техники — устройств, аппаратов и инструментов. В принципе конструктивные особенности этих технических систем предусматривают строгое поддержание их рабочей частью заданных температурных и временных параметров охлаждения и замораживания. Эти требования выполняются как в устройствах для общей и местной гипотермии, так и в инструментах для локального криовоздействия.

Для осуществления гипотермического воздействия на органы и ткани чаще всего используют охлаждающие устройства замкнутого цикла, в которых снижение температуры достигается с помощью пароконпрессорной или термоэлектрической системы охлаждения. Например, для охлаждения внутренних органов человека применяют установку, которая обеспечивает принудительную циркуляцию хладоносителя в оболочке под действием перепада давлений. В общей хирургии используют гипотермическую установку, которая содержит холодильную систему с комплексом полиуретановых матрасов, позволяющих охлаждать большие участки тела человека во время и после операций (рис. 82).

Аппарат для локальной гипотермии желудка АЛГ-0,2 (рис. 83) представляет собой передвижной шкаф с смонтированными холодильными агрегатами и гидросистемой, которая обеспечивает подачу хладагента в баллон, выполненный по форме желудка.

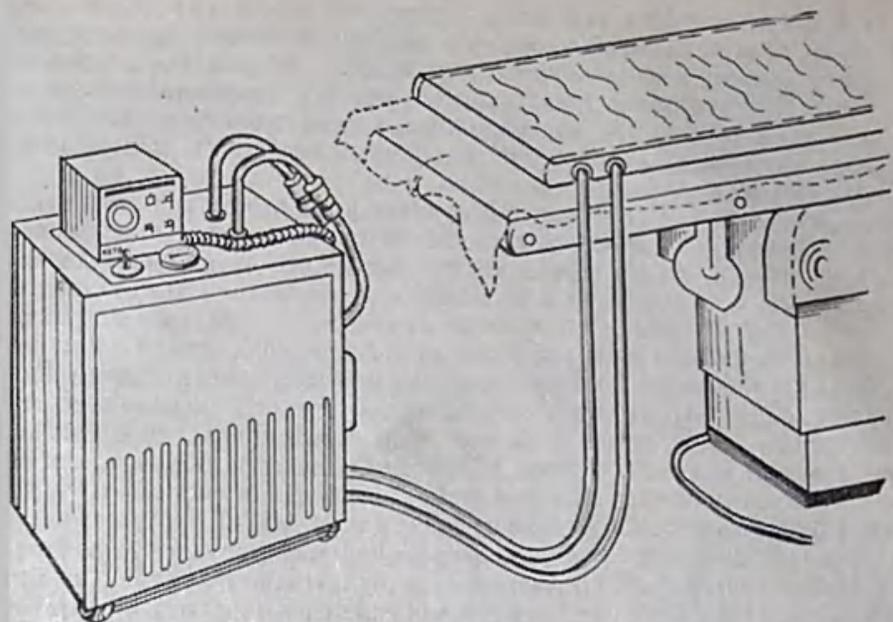


Рис. 82. Схема гипотермической установки для общей хирургии

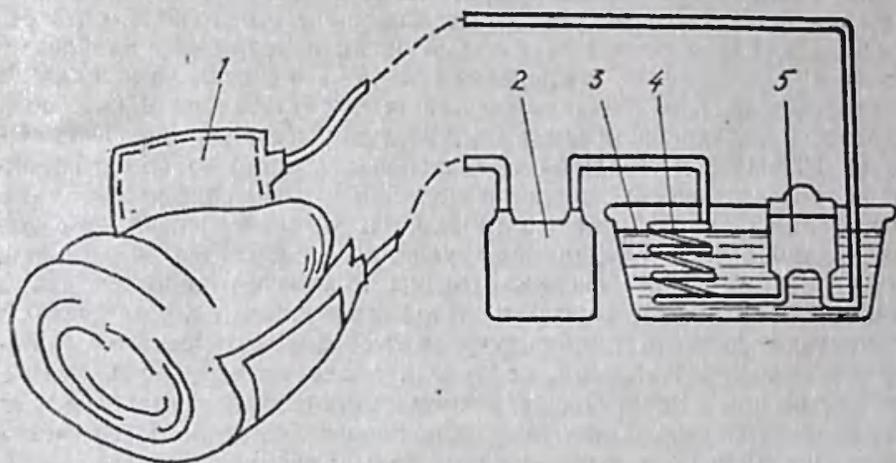


Рис. 83. Схема гипотермической установки для охлаждения внутренних органов человека:

1 — гибкая оболочка; 2 — ресивер; 3 — ванна с охлаждающим раствором; 4 — теплообменник; 5 — насос

Для проведения локальной гипотермии в нейрохирургии, акушерстве и гинекологии, дерматологии и других областях медицины используют гипотермическое устройство «Гипоспаст-1» и установку «Ятрань», функционирующие на основе термоэлектронной системы охлаждения. Одной из базовых моделей гипотермических

устройств является установка замкнутого цикла «Криоэлектроника-7», включающая холодильную систему, термостат, пульт управления и комплект смежных инструментов (матрац для локальной и общей гипотермии тела, зонд для остановки кровотечения в гинекологии, устройство для охлаждения перфузионных растворов в урологии, гамак для операций на почке, инструмент для гипотермии гематом и др.).

Для проведения краниоцеребральной гипотермии используют различного рода надевающиеся на голову колпачки, шлемы, содержащие системы трубок, по которым циркулирует охлажденная жидкость, а также устройства для согревания головы. Создан гипотерм с ускоренным воздушным потоком, жидкостным охлаждением или нагреванием, оборудованный специальным автоматическим устройством для регуляции снижения температуры. Для охлаждения и согревания организма человека с одновременным контролем температуры тела при проведении краниоцеребральной гипотермии создан комплекс «Гипотермогенератор церебральный», в состав которого входят замкнутая холодильная система ПГ-01 в виде бандажа и прибор для согревания тела АСТ-01.

Для проведения краниоцеребральной гипотермии у новорожденных используют предварительно охлажденный колпак, а для борьбы с отеком мозга — воздушный шлем от аппарата «Флюндокраниотерм». С этой же целью на основе аппарата-2Ф сконструирован комбинированный аппарат, содержащий шлем с охлаждающей жидкостью и инкубатор для создания необходимого микроклимата. Шлем одевают на голову новорожденного, и при достижении в гипотерме температуры $4-5^{\circ}\text{C}$ ребенка помещают в камеру, в которой поддерживается температура $28-30^{\circ}\text{C}$ и куда подается увлажненная смесь O_2 с воздухом. Гипотерм, изготовленный ФТИНТ АН Украины, предназначенный для борьбы с гипоксией новорожденных, представляет собой шлем, каркас которого составляют полиэтиленовые трубки, по которым поступает охлажденная до 4°C вода, циркулирующая со скоростью 500 мл/мин.

Существует два основных метода локальной криодеструкции тканей: контактный способ и метод криоорошения. Эти методы позволяют снижать температуру за счет адиабатического расширения газа или жидкости, когда они проходят через очень узкое отверстие или клапан под давлением, т. е. когда возникает эффект Джоуля—Томсона. Локальное охлаждение может быть достигнуто также на основе использования термоэлектрического эффекта, в котором прямой ток, проходящий через спаренные проводники, приводит к снижению температуры. Современные кризонды, сконструированные с учетом двух первых принципов охлаждения, позволяют снижать температуру наконечника зонда приблизительно до -80°C на выходе, а при использовании жидкого азота — до -196°C . При контакте наконечника кризонда, охлажденного до -196°C , температура тканей снижается приблизительно до -90 и -185°C соответственно при использовании окиси азота или жидкого азота. Клетки, расположенные ближе к источнику хо-

лода, охлаждаются с большей скоростью и до более низкой температуры (примерно до -70°C), в то время как клетки, расположенные по периферии,— приблизительно до -2°C .

Используемые в практике медицины криохирургические инструменты могут функционировать также по криогенному циклу, т. е. по методу, в котором используется эффект дросселирования газов, криогенных жидкостей, газовых криогенных машин, термоэлектрические и гальванотермические эффекты. Существуют также инструменты, работающие по способу подачи холода к дистанционно расположенному наконечнику, соединенному с криогенератором.

По своему функциональному назначению криохирургические инструменты разделяются на инструменты для деструкции, экстракции и комбинированных воздействий, например в сочетании с ультразвуком, лазером.

Криохирургические инструменты, в которых используют термоэлектрические и гальванотермические эффекты, имеют ограниченное применение на практике, хотя их положительной чертой является надежность. Однако они имеют низкий рабочий температурный диапазон, что препятствует их использованию в случае необходимости производства обширных полей криодеструкции.

Одним из аппаратов, использующих дроссельный цикл, является акушерский криогенный аппарат АКГ-01 (рис. 84), предназначенный для лечения эрозий, полипов шейки матки, остроконечных кандилом и криокоагуляции слизистой оболочки матки при дистрофических и климактерических кровотечениях. Аппарат смонтирован на передвижной тележке и включает криозонд, пульт управления и баллон с закисью азота. Криозонд, имеющий вид пистолета, состоит из теплообменника, сменного наконечника, соединительного корпуса, рычажно-клапанного устройства и рукоятки. К соединительному корпусу припаяны трубки прямого и обратного потоков газа. Изоляционный участок сменного наконечника изготовлен из нержавеющей трубки диаметром 8 мм. Температура наконечника в контакте с тканью достигает -50°C , глубина промерзания — 4 мм.

В аппарате АКА-1 (рис. 85), используемом при лечении дисфункциональных маточных кровотечений, криозонд выполнен также в виде пистолета, который на выходе

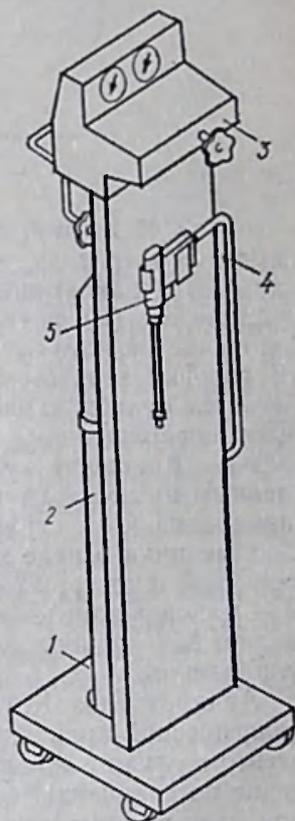


Рис. 84. Внешний вид установки АКГ-01:

- 1 — передвижная тележка;
- 2 — баллон с закисью азота;
- 3 — пульт управления; 4, 5 — криозонд, состоящий из теплообменника и сменного наконечника

звуковое облучение. Например, локальную ишемию можно усилить электрофорезом с 0,1%-м раствором норадреналина в течение 5—20 мин, а комбинированное криовакуумное воздействие путем создания местного отрицательного давления на ткань, нарушающее гемодинамику и объемный кровоток, создает условия для увеличения фронта промораживания.

Потенцировать глубину и объем криодеструкции тканей можно с помощью ультразвука, поскольку предварительная ультразвуковая обработка ткани определенной мощности вызывает дезинтеграцию тканей и клеток и в сформированном гомогенате более энергично и глубже идет проникновение кристаллов льда в разрушаемую ткань.

В оптимальных режимах ультразвуковой обработки тканей при оттаивании активизируются процессы репарации в клетках и тканях после замораживания, так как в этом случае идет энергичное накопление продуктов распада («некрогормоны»), которые способствуют более быстрому восстановлению их структуры и функции. Существенным является то, что ультразвуковая или вакуумная обработка сопровождается гибелью клеток или тканей только в пределах приложения этих физических факторов, что имеет особенно важное значение в онкологии. Опыт показывает, что после комбинированных криоультразвуковых воздействий положительный эффект при деструкции опухолей достигает ~90%. Лучше всего ультразвуковое воздействие использовать на этапе оттаивания и в начальной фазе замораживания — оттаивания. Криотерапию с применением ультразвука сейчас широко используют при лечении рубцов и обширных поверхностных образований, когда необходимо получить равномерный и обширный некроз с последующим сокращением сроков регенерации.

Для увеличения скорости рассечения ткани и гемостатического эффекта в хирургической практике используют криоультразвуковую скальпель, который содержит лезвие и приспособление, соединяющее его с источником ультразвуковых колебаний и теплообменником.

Существуют другие типы криохирургических устройств. Так, в криодеструкторе, применяемом при операциях на печени, используют в качестве хладагента жидкий азот, обеспечивающий тем-

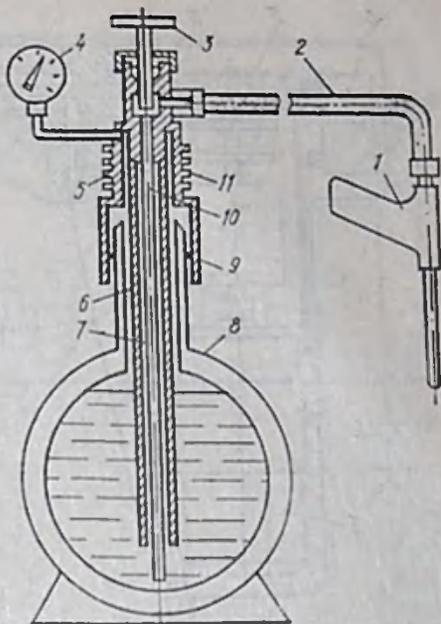


Рис. 86. Аппарат КМ-4. Описание в тексте

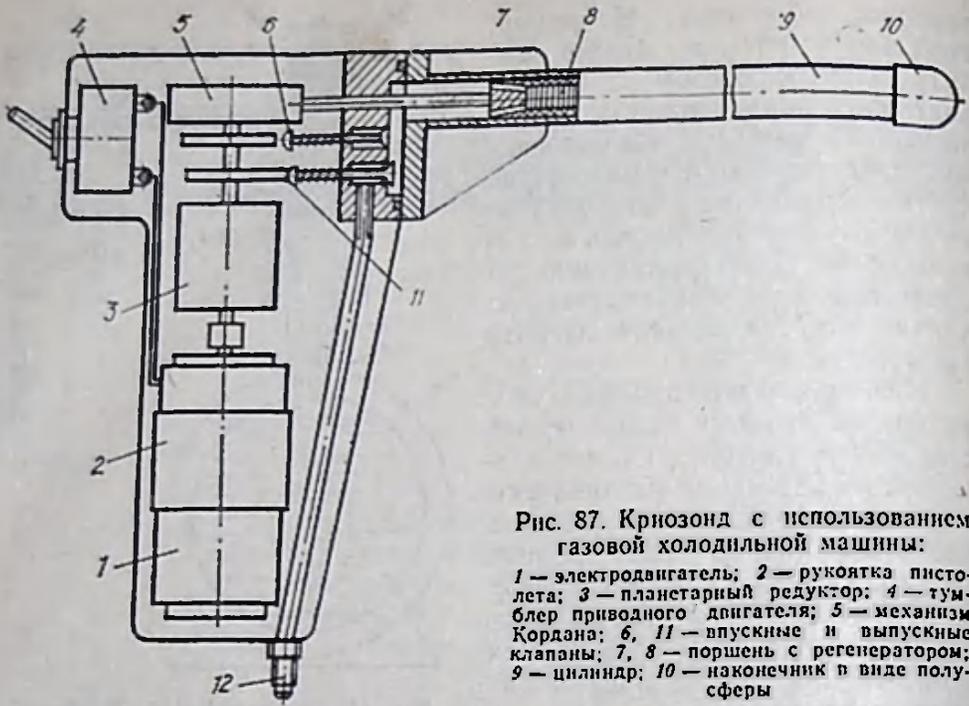
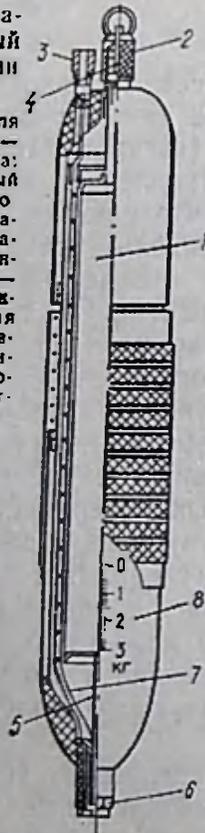


Рис. 87. Криозонд с использованием газовой холодильной машины:

1 — электродвигатель; 2 — рукоятка пистолета; 3 — планетарный редуктор; 4 — тумблер привода двигателя; 5 — механизм Кордана; 6, 11 — впускные и выпускные клапаны; 7, 8 — поршень с регенератором; 9 — цилиндр; 10 — наконечник в виде полушеры

Рис. 88. Аппликатор автономный дерматологический КД-3:

1 — резервуар для жидкого азота; 2 — герметичная пробка; 3 — регулировочный клапан; 4 — предохранительный клапан; 5 — трубка наконечника; 6 — сменный наконечник; 7 — промежуточный экран; 8 — контрольная шкала для определения величины усилия, с которым наконечник 5 прижимается к ткани



температурный интервал ($-150... -196^{\circ}\text{C}$) рабочей части инструмента. Основным элементом такого криодеструктора (рис. 87) является наконечник, выполненный в виде пустотелой полушеры.

В дерматологической практике широко применяется автономный дерматологический аппликатор КД-3 (рис. 88), снабженный сменными наконечниками разных размеров и конфигураций контактной поверхности. Аппликатор предназначен для лечения очагового нейродермита, хронических экзем, кругловидного облысения, доброкачественных образований кожи, бородавок, бородавочной формы красного плоского лишая и других поражений кожи.

Универсальная криоофтальмологическая установка УМ-14 содержит комплект легко сменяемых криоинструментов разного

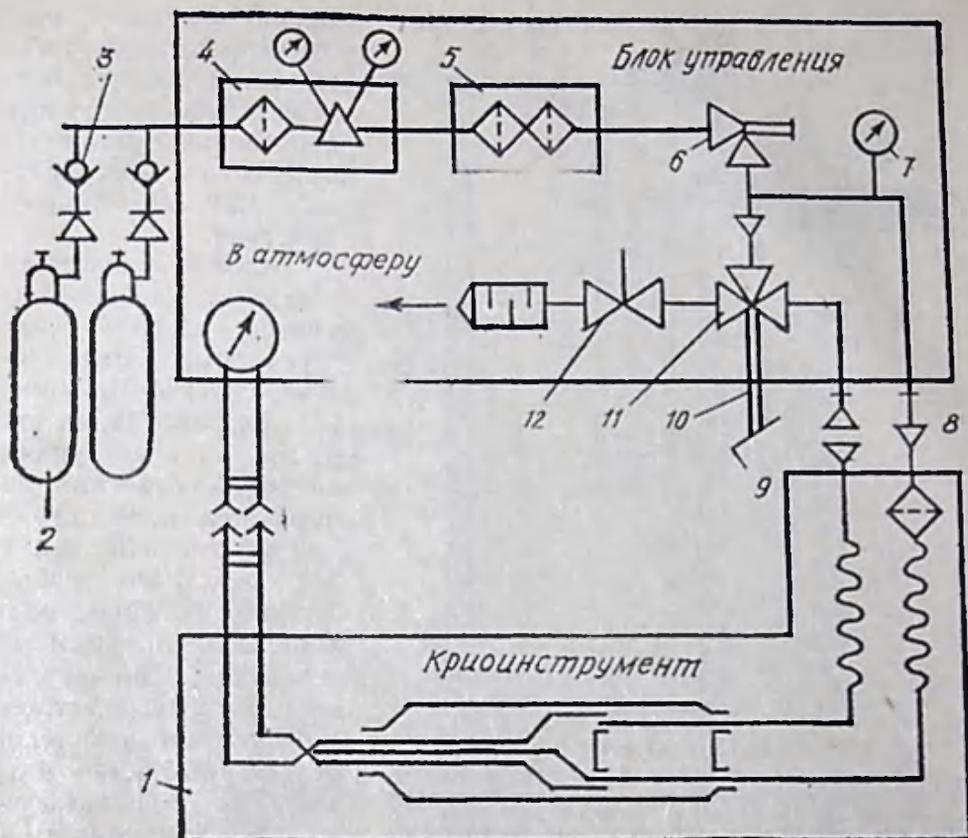


Рис. 89. Схема установки УМ-14:

1 — криосистема; 2 — баллоны с хладагентом; 3 — система подачи хладагента; 4, 5 — редуктазы, регулирующие давление хладагента; 6—8 — блок управления; 9 — трубопровод обратного потока хладагента в атмосферу; 10 — переключатель потока хладагента; 11 — трехходовый клапан; 12 — регулирующий вентиль

функционального назначения, что позволяет быстро выходить на стабильный режим охлаждения или отогрева. Установка состоит из комплекта криоинструментов, блока управления и измерения, пневмосистемы и баллонов с закисью азота. На рис. 89 представлена принципиальная схема установки. С помощью установки УМ-14 возможно осуществить криоэкстракцию катаракты, криопексию при отслойке сетчатки, криоциклотермию при различных формах глаукомы, криохирургию сетчатки и сосудистой оболочки глаза.

Преимущества использования криотерапии связаны с ее бескровностью, безболезненностью, уменьшением послеоперационных осложнений и возможностью использования в амбулаторных условиях.

Криодеструктор КЛ-02 (рис. 90), предназначенный для криодействия на опухоли головы, шеи, кожных покровов, конструктивно состоит из двух разделяющихся перегородкой теплоизолированных сосудов — верхнего и нижнего, соединенных трубопроводом. Такая конструкция криогенной системы позволяет значи-

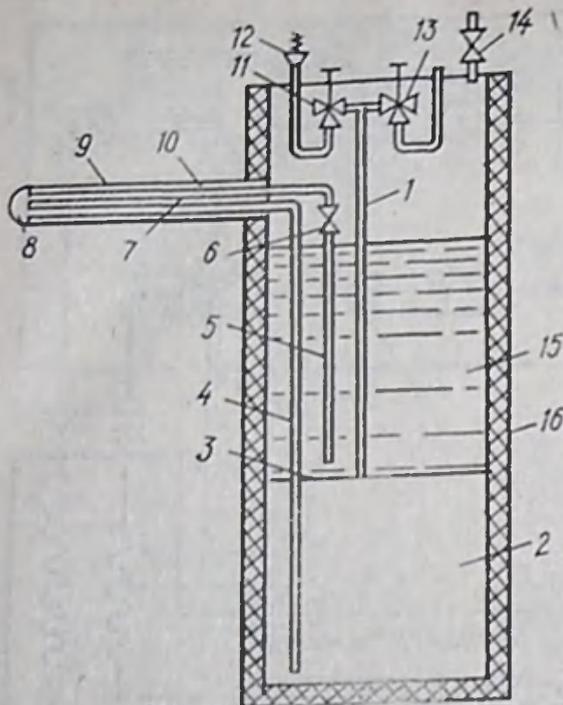


Рис. 90. Криодеструктор КА-02:

1 — теплоизолированный сосуд; 2 — дополнительная полость; 3 — перегородка; 4 — трубка, соединяющая отводящий канал (7) сопла (10) с дополнительной полостью; 5, 6 — заправочный и предохранительный клапаны соответственно; 8 — запорный клапан; 9 — подводящий канал; 11 и 13 — распределительные вентили; 12 — предохранительный клапан; 14 — заправочный клапан; 15 — основная герметизированная полость; 16 — корпус сосуда

тельно увеличить время непрерывной работы аппарата, что исключительно важно при проведении множественных и многократных циклов криовоздействия.

Базовая криогенная установка «Криодеструктор азотный универсальный медицинский КАУМ-01 (рис. 91), разработанная для целей криодеструкции опухолей, основана на принудительной циркуляции жидкого азота под действием избыточного давления, создаваемого электронгревателем. Значительным преимуществом этой установки является возможность воздействия одновременно двумя криодеструкторами, что значительно расширяет функциональные свой-

ства аппарата, т. е. позволяет одновременно применять контактный способ замораживания с криораспылением. Комплекс криогенной автоматической аппаратуры КАУМ-01 (рис. 91), также применяющийся для криодеструкции опухолей, имеет устройство, осуществляющее автоматическое слежение за размерами зоны замораживания при криовоздействии на глубинные опухоли, не контролируемые визуально. В нейрохирургической практике применяется криозонд автономный нейрохирургический КМ-16 (рис. 92), служащий главным образом для разрушения глубоко расположенных меднобазальных опухолей головного мозга. Подобного рода криозонды применяются также в стоматологии для деструкции предраковых и раковых поражений слизистой полости рта.

Для ЛОР-операций наибольшее признание получила модель криоаппликатора КМ-22, а также другие устройства (рис. 93), которые обеспечивают достаточно глубокое охлаждение наконечника инструмента при значительно меньшем диаметре его рабочей части. С помощью этого аппликатора, создающего температуру на наконечнике диаметром 2 мм до -160°C , можно проводить операции по поводу сосудистых и кожных новообразований наружного

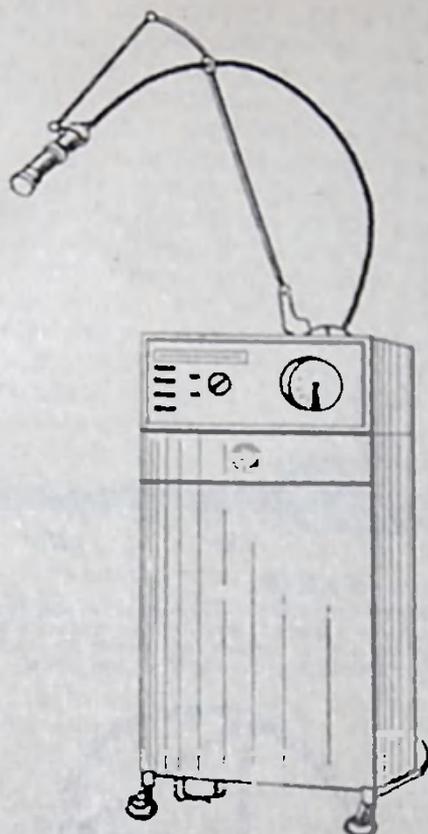


Рис. 91. Универсальный криодеструктор КАММ-01

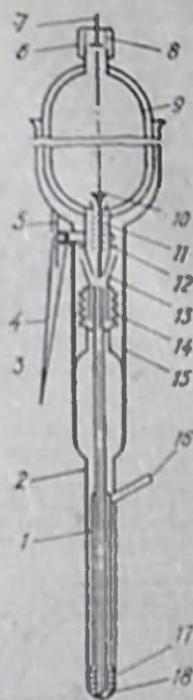


Рис. 92. Нейрохирургический криозонд КМ-16:

1, 16 — трубки для удаления газообразного азота в атмосферу; 2 — наконечник; 3, 4 — рычаг для пуска хладагента в зонд; 5—7, 8 — система контроля за расходом хладагента; 9 — смесительный сосуд; 10, 11 — клапаны с пружинами; 12—14 — элементы регулирующей системы подачи хладагента; 15 — рукоятка; 17, 18 — система теплообменников

слухового прохода, барабанной полости, сосудистых новообразований полости носа.

Криоинструменты нашли широкое применение в стоматологии. Из их числа наиболее удачной конструкцией отличается криоороситель КАС-01 (рис. 94), состоящий из двух легко разъемных узлов сифонного устройства и резервуара для жидкого азота. Криоороситель прост в эксплуатации, его можно применять как в амбулаторных, так и в стационарных условиях. Одним из промышленных образцов криогенной аппаратуры, выполненным на основе дроссельной системы охлаждения замкнутого цикла, является автономная стоматологическая установка «Криоэлектроника-2» (рис. 95), которая предназначена для криовоздействия на участки ткани с площадью не более 1—2 см². Существенным достоинством установки является ее способность работать длительное время без дозаправки хладагентом, поскольку она охлаждает ткани до -135°C специально разработанной смесью веществ.

Установка применяется для лечения патологических зубодесневых карманов, при лечении парадонтоза, эузида и предраковых поражений. Такая криоустановка может быть применена и в других областях медицины, в частности в отоларингологии, гинекологии, урологии и дерматологии.

Существующие системы криоинструментов, работающие на хладагентах в разомкнутых дроссельных системах, имеют тот недостаток, что они требуют постоянной подзарядки, что в условиях нестабильной поставки хладагента не всегда выполнимо. Газовые криогенные машины, работающие по замкнутому циклу, лишены этого недостатка. Из подобного рода машин наиболее широкое распространение в технике получили охладители, работающие по обратному циклу Стирлинга, и машины, работающие по циклу Дайфлорда Мак Магона, позволяющие получать низкие температуры, вплоть до 100 К. По этому принципу функционирует криохирургический зонд, предназначенный для остановки кровотечений, выполненный в виде односторонней газовой машины, работающей по циклу Дайфлорда Мак Магона.

Сейчас продолжается создание сравнительно простых и экономичных в эксплуатации, широко доступных криоинструментов для клинического использования при лечении различного вида заболеваний.

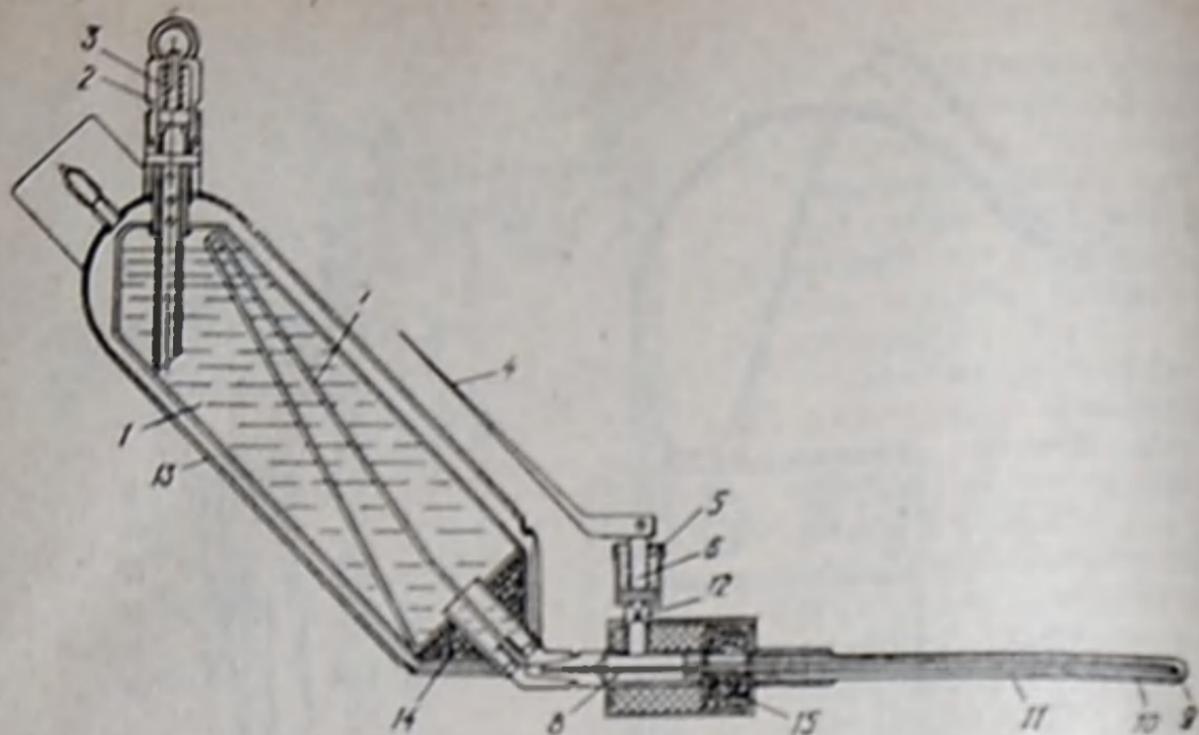


Рис. 93. Аппликатор FM-22

1 — сосуд для жидкого азота; 2 — термометрическая трубка; 3 — игла для поддержания давления; 4 — рычаг для запорки сосуда; 5 — корпус аппарата; 6 — выключатель; 7 — сифонная трубка; 8 — контрольный манометр; 9 — выпускная трубка; 10 — теплообменник; 11, 12 — трубка и патрубок; 13 — игла; 14, 15 — амортизаторы

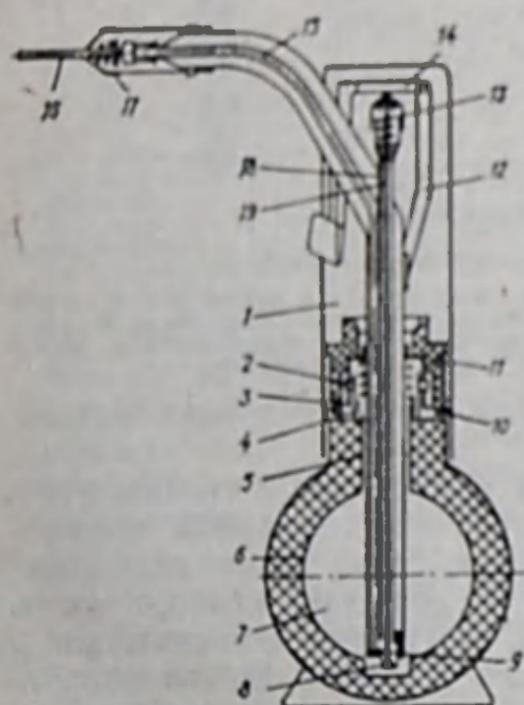


Рис. 94. Криопротектор КАС-01

1 — сифонное устройство; 2 — пружина; 3 — байонетная втулка; 4 — обойма пружины; 5 — горловина; 6 — внутренняя оболочка резервуара; 7 — полость резервуара; 8 — клапан; 9 — выпускной канал; 10 — уплотнительная прокладка; 11 — фланец подвижный; 12 — кронштейн; 13 — возвратная пружина; 14 — шарнир прикрепленный к кронштейну рычаг; 15 — трубки подачи; 16 — сменная интентционная игла (наконечник); 17 — фиксатор; 18 — направляющая трубка; 19 — стержень с клапаном

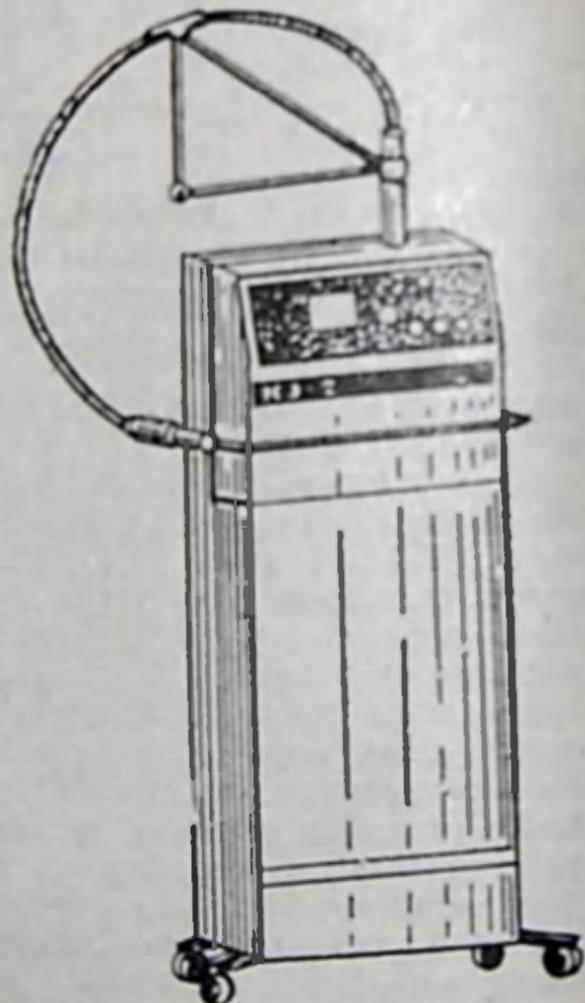


Рис. 95. Установка «Криоэлектроника-2»

Различные состояния сниженной или временно приостановленной жизнедеятельности в условиях низких температур разграничиваются как анабиоз, мезобиоз и гипобиоз.

Гипобиоз является состоянием временного снижения жизнедеятельности, при котором функционирование живых систем ослаблено. При этом хотя и происходит существенное угнетение процессов ассимиляции и диссимиляции, однако они не сопровождаются значительным нарушением структуры белков. Поэтому, например, зимнюю спячку млекопитающих можно рассматривать как явление обратимого угнетения жизненных процессов в организме гомойотермных животных, из которого организм может снова перейти к активной жизнедеятельности при благоприятных температурных условиях окружающей среды.

В промежуточном состоянии мезобиоза, т. е. между сохранением жизнедеятельности и анабиозом, нормальное функционирование структур организма, нарушенное под влиянием экстремальных температур, ранами или высушивания, весьма быстро и переходит в гипобиоз либо полный анабиоз.

Для выделения различных типов приспособления животных к действию экстремальных температур различают явление адаптации и ее частные случаи — акклиматизацию и акклимацию.

Акклиматизация представляет собой частный случай адаптации и является процессом приспособления организмов к новым или изменившимся условиям существования, в которых они проходят все стадии развития и дают жизнестойкое потомство. Акклиматизация происходит при миграции организмов в новые, непривычные климатогеографические условия, места обитания, а также области, где они ранее обитали, но по различным причинам исчезли.

Акклимация является формой экспериментальной адаптации, т. е. под акклимацией можно понимать форму приспособления организма к искусственно созданным условиям.

По характеру устойчивости различных организмов к холоду их можно условно разделить на три группы. Во-первых, это группа организмов, впадающая в состояние анабиоза и способная сохранять свои биологические свойства, несмотря на полное промораживание тканей, т. е. когда жидкая вода кристаллизуется. К их

числу относятся обычно мелкие организмы, имеющие специальные адаптационные механизмы, позволяющие удалять из тканей свободную воду и синтезировать специфические терморезистные белки и антифризы другой природы (сахара, многоатомные спирты и др.). Это прежде всего некоторые виды микроорганизмов и моллюсков, насекомые, мхи и другие низкоорганизованные представители флоры и фауны, которые способны впадать в состояние диапаузы.

В Арктике и особенно Антарктике многие виды микроорганизмов, низших растений и животных адаптировались к чрезвычайно суровым условиям климата и способны выживать при отрицательных температурах (-50°C и ниже) на протяжении длительного периода времени. Так, например, из керн Антарктики выделены микроорганизмы, простейшие грибки и водоросли, которые находились в законсервированном состоянии при $-70-80^{\circ}\text{C}$ и ниже на протяжении 11 тыс. лет. Все они оказались жизнеспособными после их отогрева.

Во-вторых, это явление пойкилотермии, которое присуще некоторым животным (змеи, ящерицы, рыбы и др.), способным выживать при температурах $0...-1,5^{\circ}\text{C}$, впадая в холодное оцепенение. Температура тела у этих животных снижается соответственно температуре окружающей среды, но не ниже той, при которой может наступить кристаллизация свободной воды тканей. В случае кристаллизации воды внутри тела этих животных наступает их гибель. Эта группа организмов также обладает определенными механизмами, которые позволяют им выживать некоторое время при 0 или даже при $-1,2-1,5^{\circ}\text{C}$.

В-третьих, это явление гибернации, или зимней спячки, которое присуще некоторым видам высокоорганизованных млекопитающих (ежи, суслики, сурки, медведи и др.). При вхождении в состояние спячки в организме этих животных происходят также сложные физиологические и метаболические перестройки, позволяющие им сохранять свою жизнеспособность при температуре около 0°C .

Анабиоз

Под анабиозом понимают способность биологических объектов обратимо приостанавливать или предельно затормаживать метаболические и физиологические процессы. Практически это означает, что клетки, органы или организмы, находящиеся в таком состоянии, сохраняют структурную основу биорегуляторов, которые полностью восстанавливаются при возврате живой системы в зону физиологических температур. Признаками анабиотического состояния являются: отсутствие или предельное заторможение метаболизма; обратимое сохранение структуры биополимеров и биорегуляторов в течение продолжительного времени; отсутствие в жидкой фазе заметных количеств свободной воды; способность восстанавливать процессы жизнедеятельности после перехода в

зону физиологических температур. Приостанавливать обменные процессы в неблагоприятных условиях присуще ряду живых систем на различных этапах их эволюции.

Например, эта способность сохранилась у микроорганизмов, грибов, ряда простейших, а также у некоторых представителей растительного и животного мира.

Вопросами обратной холодовой приостановки жизни различных биосистем впервые начал заниматься Антони Левенгук, а затем этой проблеме посвятили свои работы отечественные и зарубежные ученые — Н. И. Бахметьев, П. Ю. Шмидт, Л. К. Лозина-Лозинский, М. Е. Бекер, О. Смит, Дж. Бауст и др.

Состояние анабиоза, очевидно, впервые возникло у организмов, обитающих на суше, в результате неблагоприятных условий среды — низкого парциального давления O_2 , отсутствия влаги, жесткой радиации, действия отрицательных температур и т. д. Различают несколько видов анабиоза в зависимости от характера условий окружающей среды. Во-первых, ангидробноз или, точнее, ксероанабиоз (греч. — сухой) — состояние, возникающее после интенсивной дегидратации организмов, когда они приобретают внешний вид полностью высушенной биомассы. На самом деле структуры таких систем содержат воду, однако в очень низких количествах, и потенциально способны при благоприятных условиях восстановить свою жизнедеятельность. Поэтому полный анабиоз является довольно редким явлением. Состояние ксероанабиоза присуще различным видам микроорганизмов, особенно спорным видам низших и примитивных растений, например мхам, не способным самостоятельно поддерживать водный режим. К числу этих организмов относятся также некоторые уникальные виды растений, очень сильно высыхающих при высоких температурах (рамондия, песчаная осока, некоторые виды плаунов и др.), различные виды семян. Такие представители животного мира, как коловратки и тихоходки, почвенные нематоды, артемии и хирономиды, отличающиеся очень малыми размерами (1—3 мм) и примитивным строением тела, в котором содержится очень низкое количество воды, также способны впадать в состояние ксероанабиоза.

Во-вторых, существует анабиотическое состояние, возникающее под влиянием очень низких температур ($-50^{\circ}C$ и ниже), которое называется криоанабиозом или криобнозом. В состоянии криоанабиоза могут впадать некоторые виды насекомых (личинки короеда, гусеница совки и др.). Например, личинка короеда после пребывания более 3 лет в сухом состоянии при криоанабиозе после ее гидратации при комнатной температуре полностью восстанавливает свою жизнедеятельность.

В-третьих, существует форма анабиоза, которая возникает в результате экспонирования организмов в средах высокой тоничности солей и осмотического давления. При этом клетки подвергаются дегидратации и переходят в покоящееся состояние. Такую форму анабиоза называют «осмотическим анабиозом».

Вхождение в анабиотическое состояние определяется как температурой, видовыми особенностями и свойствами организма на разных стадиях его развития, так и физико-химическими изменениями среды, происходящими в результате фазового перехода вода — лед. Глубина анабиотического состояния зависит от количества воды в клетках: чем больше в клетке сохраняется незамерзающей фракции связанной воды, тем больше шансов у особи выжить после воздействия отрицательных температур. Это связано с тем, что фракция связанной воды играет важную роль в поддержании структуры и функции каталитических и транспортных белков. Если фракция связанной воды не разрушается, то в тканях некоторых видов насекомых даже при очень низких температурах ($-40...-60^{\circ}\text{C}$) все же поддерживается очень медленный внутримолекулярный обмен протонов и, очевидно, других веществ, который быстро восстанавливается при физиологических температурах. Основное количество свободной воды в тканях превращается в лед при температурах от $-7...-10$ до $-20...-25^{\circ}\text{C}$. Остающаяся при этом незамерзшая вода, представляющая собой связанную фракцию, поддерживает нативную конформацию полипептидных цепей белка, нуклеиновых кислот и липидов. Состояние анабиоза наступает, когда вся свободная вода полностью кристаллизуется и только часть ее — фракция связанной воды — остается в квазжидком состоянии. Поэтому ряд микроорганизмов, растений и беспозвоночных животных, содержащих в теле мало воды, выдерживает замораживание в естественных условиях до температуры $-50...-80^{\circ}\text{C}$. Поэтому снижение содержания свободной фракции воды в тканях животных перед вхождением в зимний покой является одним из факторов, повышающих их холодоустойчивость. При дегидратации тканей температурный диапазон глубины переохлаждения расширяется, понижается точка замерзания, в результате чего они становятся более выносливыми к действию замораживания. Защитная роль дегидратации заключается также в том, что она устраняет возможность внутриклеточного кристаллообразования, которое является летальным фактором для живых систем. Поэтому способность животных осуществлять дегидратацию тканей и органов является важным механизмом адаптации их к низким температурам.

Поэтому глубина анабиоза живых объектов связана прежде всего со степенью их обезвоживания. Например, у колорадского жука содержание воды в теле при зимней диапаузе снижается на 45—50 % по сравнению с активной жизнедеятельностью. Для осуществления более равномерной и быстрой дегидратации у низших организмов, переходящих в состояние анабиоза в процессе эволюции, выработалась также способность изменять свою форму и снижать объем.

Существенное значение при вхождении некоторых биообъектов в состояние анабиоза имеют специальные оболочки (кортикальная, внутренняя и внешняя), которые предохраняют их от прямого воздействия таких повреждающих факторов, как облучение,

осмотические градиенты и т. д. Такие оболочки, существующие у некоторых видов эндо- и экзоспориальных бактерий, семян высших растений, цист эмбрионов, содержат в своем составе сложные липиды, белки и гликопептиды, молекулы которых образуют обширные дисульфидные белковые сшивки, что придает им повышенную механическую прочность и устойчивость при воздействии различных экстремальных факторов, а том числе и очень низких температур.

У мхов, легко переносящих дегидратацию, содержатся очень мелкие клетки с весьма толстыми оболочками, которые препятствуют их сжатию при обезвоживании, в результате чего объем клеток уменьшается всего на 18 %.

Восстановление функций после выхода организмов из состояния холодого анабиоза зависит во многом от сохранения структурно-функциональных свойств плазматических мембран клеток и субклеточных органелл, а также времени пребывания живых систем в замерзшем состоянии. Чем длительней это время, тем медленней осуществляются восстановительные процессы, поскольку конформационное состояние каталитических и структурных белков может протекать длительное время. Поэтому после замораживания до -80°C процессы жизнедеятельности восстанавливаются обычно не сразу. Первыми (2—3 ч) после оттаивания восстанавливают свою функцию сократительные, а затем и другие белки (24—72 ч). Например, у гусениц кукурузного мотылька после глубокого охлаждения полная возбудимость восстанавливается только через 2—3 дня. Продолжительность жизни после замораживания различных особей сильно варьирует, поскольку все зависит от режима охлаждения и способа отогрева. Хотя факт адаптации к отрицательным температурам у насекомых и других низших животных в общих чертах как феномен известен довольно давно, тем не менее механизмы, определяющие их способность противостоять низким температурам, до конца не ясны.

Мезобиоз

Мезобиозом называется промежуточное состояние организмов, впадающих в полный анабиоз. Этот этап адаптации важен тем, что в этот период в организме происходят сложные структурно-функциональные перестройки, обеспечивающие переход к анабиозу. Одной из форм мезобиоза является диапауза насекомых и некоторых членистоногих животных, у которых адаптивные изменения формируются задолго до наступления морозов. Сигналом для перехода из активного состояния к диапаузе является укорочение светового дня, на которое очень сильно реагируют насекомые. При этом в их теле изменяется динамика жиров и углеводов, идет образование резервных аминокислот, интенсифицируются обмен белков, активность ферментов и других процессов, способствующих накоплению резервных веществ для повышения структурной устойчивости животных к воздействию холода.

Характерным процессом при наступлении диапаузы является накопление жира в клетках и тканях, т. е. увеличение у насекомых жирового депо. Считают, что осеннее «ожирение» у насекомых происходит, по-видимому, путем превращения белков в жиры. Такая перестройка возможна при ферментативном расщеплении белка на аминокислоты, последующем их дезаминировании и образовании углеводов, из которых накапливается жир. Вместе с тем прямая зависимость между количеством жира у насекомых и их холодоустойчивостью не всегда выявляется. Выяснено, например, что «жиреют» насекомые, зимующие в почве, в листовых и перегнивающих подстилках, а также синантропные виды животных, не подвергающиеся значительному охлаждению ниже 0°C . Количество жира у этих животных уменьшается в течение зимовки незначительно. Потеря свойств холодоустойчивости у ряда насекомых обычно происходит по окончании периода диапаузы, однако в некоторых случаях это может произойти и в середине зимы, хотя жировое депо исчезает лишь значительно позже, например, в мае.

Таким образом, накопление жира у насекомых прежде всего имеет значение для поддержания их жизни в течение периода покоя, хотя липиды сами по себе не обладают способностью полностью защитить животное от повреждений, возникающих при воздействии низких температур.

Понижение температуры среды вызывает не всегда одновременное изменение скорости биологических реакций организма в стадии мезобноза. Оно обычно носит характер последовательных процессов, в результате чего сначала прекращаются одни физиологические функции, а затем другие. Это связано с тем, что различные клетки в организме неодинаково чувствительны к воздействию температуры, а среди ферментных систем имеются термолabile и термостабильные. При охлаждении насекомых до 0°C сначала прекращается их двигательная активность, а при более низкой ($-5...-10^{\circ}\text{C}$) температуре — кровообращение и темпы сокращения сердца, реакции на раздражители и, наконец, тканевое дыхание. Поэтому интенсивность динамики O_2 и CO_2 является достаточно чувствительным критерием для оценки стадии и глубины анабноза у животных.

Существует три группы насекомых, различающиеся в цикле развития интенсивностью дыхания и степенью устойчивости к низким температурам. Первая — это насекомые в активной стадии, поглощающие во время развития много O_2 и не обладающие холодоустойчивостью. Вторая включает насекомых на стадии личинки, которые при понижении температуры потребляют мало O_2 и характеризуются невысокой холодоустойчивостью. Третья группа — это диапаузирующие насекомые, которые в переохлажденном или замерзшем состоянии переносят температуры ниже -20°C и потребляют в течение диапаузы мало O_2 . У таких видов насекомых дыхание не прекращается при температурах несколько ниже 0° и полностью блокируется лишь при температурах ниже

—16 °С. Прекращение процесса дыхания при замерзании связано прежде всего с удалением объемной воды из тканей, повышенном ее вязкости, вследствие чего снижается скорость биохимических реакций.

Так, у адаптирующихся насекомых в начальный период наступления холодовой диапаузы инактивируется ряд ферментов, например α -кетоглутаратдегидрогеназа, цитохромоксидаза и сукцинатоксидаза, в результате чего подавляется окислительное фосфорилирование, усиливаются процессы гликолиза и накопления жира. При изменении метаболизма в теле и гемолимфе насекомых происходит повышение содержания сахаров и глицерина, образование которых также имеет большое значение для повышения их холодоустойчивости. Глицерин образуется в гемолимфе у многих насекомых, хотя достаточную корреляцию между его количеством и холодоустойчивостью также не всегда удается выявить. Например, количество глицерина у личинок лугового и кукурузного мотылька почти одинаковое, однако холодоустойчивость этих животных очень различна. У насекомых, содержащих мало глицерина в гемолимфе, очевидно, образуются другие продукты метаболизма, повышающие холодоустойчивость, например антифризные белки, сложные сахара типа сорбитола, рафинозы. Однако они не так эффективно защищают насекомых от повреждающего действия низких температур, как глицерин. Вопрос о механизме защитного действия глицерина, сахаров и других биологических антифризов у насекомых является перспективной областью криобиологии.

Гипобноз

Холодоустойчивость пойкилотермных животных является довольно сложной формой адаптации, поскольку она предусматривает экологические приспособления не только к холоду, но и ко всему комплексу факторов, возникающих до наступления низких температур. Пойкилотермные животные пережили два основных направления в эволюции, позволившие им заселять пространства Земли с низкой температурой окружающей среды. Это, во-первых, адаптация при сохранении активного состояния в диапазоне относительно низких температур и, во-вторых, развитие холодоустойчивости путем торможения обмена веществ и впадения в состояние оцепенения. Этот путь адаптации стал возможен благодаря способности пойкилотермных организмов обратимо замедлять или даже прекращать функции и метаболические процессы в экстремальных температурных условиях. Как известно, многочисленные животные, способные к высыханию в условиях низких температур, относятся главным образом к отряду беспозвоночных. Вместе с тем среди позвоночных имеются некоторые виды тропических рыб, икра которых не теряет способности к развитию после высыхания и последующей регидратации. Существенную потерю воды во время холодового оцепенения можно наблюдать у некоторых видов амфибий, например тритонов и углозубиков.

Реакция организмов, обитающих в воде (рыбы, амфибии), на отрицательные температуры значительно отличается от реакции на холод организмов, обитающих на суше. Прежде всего, в водной среде имеется строго очерченный предел переохлаждения, так как внешние покровы животных не защищают их от инициации кристаллообразования в теле под влиянием льдинок, образующихся при фазовом переходе вода — лед. Если в воде возникнут кристаллы льда, то после небольшого переохлаждения происходит кристаллизация воды внутри организма. Этот процесс в теле рыб легко распространяется, так как их ткани и внешние покровы сильно гидратированы и быстро подвергаются кристаллизации. Следовательно, большинство водных животных не способны переносить действие отрицательных температур ниже точки замерзания жидкостей тела. В связи с этим пресноводные простейшие, беспозвоночные и рыбы зимуют при температуре 4°C или около 0° . Некоторые виды морских организмов, например обитатели арктических литоралей, могут переносить отрицательные температуры, поскольку они способны обезвоживаться, что препятствует развитию процессов внутриклеточной кристаллизации.

Адаптация к зимним условиям у пресноводных животных, например у ряда моллюсков, заключается в том, что они в осенний период мигрируют из верхних горизонтов на дно, где зарываются в грунт и зимуют при температурах около 0°C . При этом у жаберных моллюсков раковины плотно замыкаются, а у легочных выделяются в устьях слизистые пленки.

Как известно, температура морской воды колеблется от -2°C в северных водах, до 30°C в ряде тропических зон. В некоторых случаях выход термальных вод из недр поднимает температуру до очень высоких величин ($100-250^{\circ}\text{C}$), однако и при таких условиях сохраняется жизнеспособность определенных видов микроорганизмов. Морские животные могут подвергаться различным по интенсивности температурным воздействиям, диапазон которых отличается более чем в 30°C . Поскольку около 90 % морской воды имеет температуру ниже 5°C , сильно охлажденная вода является нормальной средой обитания морских животных, в которой происходит их адаптация к действию низкой температуры. В некоторых морях часто наблюдаются довольно сильные сезонные изменения температуры, однако и при этих условиях сохраняется двигательная способность рыб.

У рыб, живущих в антарктических водах при температуре $-1,9^{\circ}\text{C}$, в течение года происходят адаптивные процессы, которые существенно изменяют структуру и функцию мышц, что позволяет им передвигаться при таких низких температурах. В частности, у этого вида рыб в ходе приспособления к существованию в условиях низких температур довольно сильно изменяется характер биоэнергетики и ионного гомеостаза мышечных клеток. Эти изменения приводят к приобретению новых свойств животными, которые сохраняют способность активно функционировать в диапазоне как физиологических, так и околонулевых температур.

В поисках пищи многие рыбы мигрируют на довольно большие расстояния, в результате чего могут испытывать перепад температур в 10°C и более в течение суток. Поэтому у рыб в процессе эволюции выработались достаточно сложные биохимические системы адаптации, которые быстро реагируют на перепады температур, что позволяет им сохранять биоэнергетическую и синтетическую активность миоцитов и других клеток на довольно высоком уровне. Однако о деталях механизмов этих приспособлений известно очень мало. Следовательно, рыбы, живущие в морской воде при температуре ниже 0° в переохлажденном состоянии, балансируют на грани замерзания. Такое переохлаждение рыб возможно в воде, в которой нет кристаллов льда. Если в воде инициировать кристаллизацию, то при соприкосновении кристалла с поверхностью тела рыб последние промерзают и гибнут. Вместе с тем некоторые представители рыб, обитающих в арктических и антарктических бассейнах, соприкасаясь в верхних слоях с кристаллами льда, не замерзают. Например, треска, нототения и бычок летом имеют точку замерзания жидкости тканей в диапазоне $-0,77...-0,87^{\circ}\text{C}$, а зимой $-2,0^{\circ}\text{C}$. Хотя их температурный диапазон переохлаждения достаточно узок, это позволяет им сохранять высокую жизнедеятельность при низких температурах. Такая устойчивость этих видов рыб к холоду объясняется тем, что в их тканях и крови накапливаются биологические антифризы — линейные гликопротеины, обладающие свойствами снижать криоскопическую точку замерзания жидкой части тела до $-1,8...-2,0^{\circ}\text{C}$, т. е. до температур более низких, чем окружающая их вода Ледовитого океана.

Гликопептидные антифризы этих рыб состоят из повторяющихся последовательностей трипептида аланин — аланин — треонин, соединенного с дисахаридом галактозой и N-ацетилгалактозаминном. Связанные в линейные цепочки, эти молекулы существуют в виде нескольких отдельных молекулярных форм. Гликопептидные антифризы по своему строению у антарктических видов рыб одинаковы, хотя у отдельных видов вместо треонина в цепочке содержится аргинин. Пептидные биоантифризы также обнаружены у некоторых видов арктических рыб. Они содержат три различных пептида, состоящие всего из восьми аминокислот, аланин которых составляет $2/3$ общего остатка. Механизм действия биоантифризов еще далеко не ясен, однако они снижают температуру гомогенной гетерогенной нуклеации льда, хотя не предохраняют от индукции, формирования и роста кристаллов льда в сыворотке крови.

В водах Антарктики в течение года температура воды колеблется от $-1,0$ до $-1,9^{\circ}\text{C}$, и поэтому в сыворотке крови всех видов антарктических рыб содержатся антифризы. В январе в крови нототений содержится 3% белкового антифриза, в то время как в сентябре антифризы уже не обнаруживаются. Поскольку жидкая часть тела рыб гипосмотична по отношению к морской воде, для многих северных рыб температура моря, в которой они жи-

вут, может быть примерно на 1°C ниже равновесия точки замерзания сыворотки их крови. Однако при контакте со льдом в теле таких животных спонтанно возникает массивная индуцированная кристаллизация, которая является летальной для них. Поэтому северные рыбы избегают замораживания, погружаясь глубоко в воду, где контакт со льдом исключен и возможно их существование в состоянии переохлаждения.

В процессе холодовой адаптации растений в клетках также происходит накопление холодоустойчивых фракций белков, которые обеспечивают выживание растений в суровых зимних условиях. Эти факты свидетельствуют о том, что в процессе холодовой адаптации у животных происходят глубокие перестройки на уровне генетической информации, когда начинают функционировать определенные генетические участки, регулирующие синтез специфических холодоустойчивых белков, либо их комплексы.

У большинства низших позвоночных животных одним из существенных механизмов адаптации к низким температурам является поддержание текучести липидной фазы мембран клеток, что обеспечивает сохранение функций каталитических белков и генома клеток, которые полностью восстанавливаются при отогреве тела. Наиболее выражены механизмы биологической адаптации к низким температурам проявляются у животных, обитающих в водном окружении. К их числу следует отнести прежде всего перестройку генетического аппарата клеток, которые при переходе от одной температуры к другой начинают вырабатывать качественно новый спектр ферментов, и структурных белков, — термостойких антифризов.

Температура влияет на ферментативную активность двумя различными, но взаимосвязанными путями. Первый — это прямое влияние температуры на структуру белка *in situ*, второй — изменение скорости катализируемых ферментативных реакций. При охлаждении морских организмов для поддержания метаболических процессов осуществляется три процесса. Первый — предварительное накопление активного фермента в клетках; второй — активация новых ферментативных ансамблей, которые способны функционировать активно как при низких, так и при физиологических температурах, и третий — изменение вязкости липидного микроокружения фермента с целью устранения прямого термодинамического действия температуры на белки. Например, после акклимации к низкой температуре (5°C) в мышцах золотой рыбки увеличивается на 50 % абсолютное количество цитохромоксидазы, а в скелетных мышцах зеленой рыбы цитохрома *c* — на 66 %. При более низких температурах ($0\text{...}-1^{\circ}\text{C}$) скорость синтеза ферментов снижается на 40 %, однако при этом на 60 % возрастает их холодоустойчивость. Наряду с этим увеличивается активность гликолитических и других ферментов, участвующих в генерации энергии.

Молекулы ферментов проявляют неодинаковую активность при низких температурах. Некоторые из них могут оставаться актив-

ними, другие, наоборот, обратимо теряют активность, а третьи могут подвергаться необратимой денатурации. В процессе холодной акклимации при 2 и 17 °С ацетилхолинэстераза мозга радужной форели изменяет свои электрофоретические характеристики, т. е. в процессе акклимации изменяются свойства и функциональная активность этого фермента. Радужная форель в условиях естественного обитания испытывает сезонные колебания температуры в диапазоне 0—20 °С. При этом из всего набора ферментов, принимающих участие в адаптации к низким температурам, используется только два. У зеленой солнечной рыбки в результате акклимации при 5 или 25 °С изменяется активность нескольких ферментов, однако их изоэнзимный спектр при этом остается одним и тем же, за исключением эстеразы печени и глаза. Свободная энергия активации АТФаз у полярных (северных) рыб ниже, чем у рыб, обитающих в умеренных и тропических водах, хотя эти различия не очень значительны. Холодовая перестройка мембраносвязанной АТФазы в мышечных белках рыб заключается в том, что при этом появляются различия в четвертичной и даже третичной структурах белковой молекулы. Поэтому, выработка энергии белыми и красными мышцами у антарктических рыб при 0 °С происходит с такой скоростью и в таком объеме, как и у рыб, обитающих при температуре 15 или 25 °С.

Аналогичная температурная перестройка АТФаз обнаружена в миофибриллярных белковых комплексах, выделенных из мышц многих видов рыб, у которых как Ca^{2+} -регуляторная, так и каталитическая активность сохраняется в достаточно широких пределах температурных колебаний.

При снижении рН и температуры физиологические свойства клеток и текучесть мембран нарушаются, что влияет на активность ферментов. Однако в процессе природной акклиматизации различные виды гидробионтов способны регулировать уровень внутриклеточного рН и текучесть мембраны за счет реализации различных механизмов. Например, в тканях форели при снижении температуры тела до 5 °С уровень рН в мышцах не отличается более чем на 0,021. Между тем механизм регуляции рН в этих условиях остается неясным. Для многих мембраносвязанных ферментов рыб повышение текучести липидов имеет первостепенное значение в регуляции их каталитической активности.

Морские организмы литорических зон морей и океанов в процессе замораживания — высушивания изменяют величину своего кислотно-щелочного равновесия и жидкостный липидный состав мембран, который удерживается на протяжении всех дней пребывания в зоне низких температур. В ходе адаптации у этих животных появляются ферменты с различными кинетическими характеристиками, сохраняющие свою активность в широком температурном диапазоне.

Таким образом, гидробионты, испытывающие сезонные колебания температуры, способны изменять структуру и характер функционирования ферментов, а также экспрессию генома клетки,

который регулирует концентрацию антифризных белков в клетках, тканях и жидкостях организма. Уровень белкового синтеза и основной обмен у антарктических рыб летом значительно ниже, чем у тропических, так как регуляция этих процессов осуществляется температурой, которая влияет на экспрессию генома и активность ферментов, регулирующих, например, связывание полипептидов аминоксилотрансферазой в процессе трансляции генетической информации.

Кроме этих механизмов существуют другие возможности для перестройки метаболизма клеток в процессе понижения температуры. Например, жировые или печеночные клетки у рыб вырабатывают специальные вещества типа вителлогенина, в других типах клеток метаболизм изменяется за счет перераспределения функции ферментов, сдвига рН и изменения интенсивности биоэнергетики.

Как известно, клеточная активность во многом зависит от содержания АТФ, вырабатываемых в цикле трикарбоновых кислот в присутствии O_2 . Поэтому уровень внутриклеточного метаболизма может оцениваться по потреблению O_2 . Однако в процессе сезонной акклимации изменения в потреблении O_2 неоднозначны у различных особей.

Например, если золотая рыбка адаптируется при $5^\circ C$, в ее тканях быстро снижается потребление O_2 . После некоторого времени акклимации потребление O_2 вновь увеличивается до более или менее стабильных значений, что рассматривается как компенсаторный эффект при частичном приспособлении к холоду. Уровень потребления O_2 , однако, не является простым процессом, призванным лишь компенсировать изменения в клетке, связанные с влиянием холода. Этот процесс может быть связан с регуляцией кислотно-щелочного равновесия, процессов синтеза ферментов и другими причинами.

Потребление O_2 у летних и зимних животных различно. У летних оно всегда выше, так как они растут и осуществляют гематогенез. Однако у некоторых видов моллюсков сезонные изменения дыхания характеризуются более интенсивным поглощением O_2 зимой по сравнению с летом, т. е. более интенсивное дыхание происходит при низкой температуре окружающей среды.

Последние данные показывают, что интенсивность дыхания у большинства гидробионтов (членистоногие, моллюски и рыбы), наоборот, падает при понижении температуры, что связано с уменьшением скорости основного обмена и действием температуры окружающей среды. Уровень основного обмена у морских ракообразных, живущих при $25^\circ C$, в 6 раз выше по сравнению с аналогичным обменом ракообразных, живущих при $0^\circ C$. Следовательно, гидробионты, обитающие в холодных водах, способны достаточно хорошо адаптировать двигательный аппарат к функционированию в условиях низких температур.

Зимняя спячка (гибернация)

Гибернация — это особое состояние организма, которое характеризуется обратимым торможением метаболических и физиологических функций организма на фоне снижения температуры тела ниже физиологической, но выше 0°C . Механизм возникновения гибернирующего состояния у гетеротермных животных закреплен в ходе эволюции и генетически детерминирован. Детерминация этих процессов, очевидно, касается в первую очередь изменения функции генома нейронов, в результате чего при вхождении в спячку в организме животных появляются биоактивные вещества-регуляторы — так называемые триггеры спячки нейропептидной и белковой природы, а также вещества, обладающие периферической и центральной нефромедиаторной активностью (серотонин, катехоламины), способные влиять на обменные процессы и температуру тела животного.

Естественная сезонная спячка, возникающая у некоторых видов млекопитающих и птиц в ответ на стойкое изменение температуры окружающей среды и укорочение фотопериода, характеризующаяся глубоким снижением температуры тела и физиологических функций, может продолжаться от нескольких часов до нескольких недель и даже месяцев.

Сезонная спячка характерна для ежей, сурков, сусликов, хомяков, летучих и прыгающих мышей, у которых в состоянии гибернации температура тела снижается до 0°C , а продолжительность спячки составляет 6—8 мес.

Физиологические механизмы, контролирующие переход от активного к гибернирующему состоянию, до конца неясны, однако одним из них может быть годичный биоритм, который является генетически детерминированным циклическим процессом.

Существующая в природе несезонная спячка у хомяков, грызунов, некоторых видов приматов может наступать в любое время года как результат внезапного воздействия холода или кратковременного отсутствия корма. В таком состоянии у животных температура тела снижается до $5\text{--}10^{\circ}\text{C}$ на протяжении от 48 ч до нескольких недель.

Продолжительность светового периода также влияет на индукцию гибернирующего состояния у животных. При непрерывном действии света вхождение животных в цикл гибернации снижается на 77 % в феврале и на 140 % в октябре. При этом предгибернирующий период у животных заметно увеличивается, а частота вхождения в спячку снижается. При непрерывном действии темноты на охлажденных животных число негибернирующих особей снижается примерно на 50 %, а частота гибернации повышается на 176 % в феврале и на 147 % в октябре.

Физиологические проявления процесса гибернации. Гибернация характеризуется тремя основными циклами, или баутами: вхождение в состояние гибернации (подготовительный период), поддержание этого процесса (период развития и углубления гибер-

нации) и, наконец, период пробуждения (выход из состояния гибернации).

В процессе вхождения в состояние гибернации у животного снижаются частота и ритм сердечных сокращений, степень сосудистого тонуса. В результате активации функции парасимпатической нервной системы центральные и периферические сосуды сужаются. Изменение уровня сосудистого тонуса в период вхождения в спячку является очень важным физиологическим механизмом поддержания кровяного давления на необходимом уровне. В состоянии гибернации потребление O_2 тканями снижается, в результате чего апноэ, например, у сусликов может длиться до 40 мин, а у ежей — до 150 мин. В процессе спячки гибернирующие животные периодически просыпаются для того, чтобы осуществить физиологические отправления и немного согреться.

Период пробуждения у гибернирующих животных происходит с различной скоростью. Например, у небольших грызунов и летучих мышей это осуществляется в течение 20 мин, а у сусликов и сурков — несколько часов. Причем согревание тела дифференцировано: вначале согревается передняя часть тела, а затем — задняя. По сравнению с мелкими животными такой крупный по размерам представитель гибернирующих особей, как медведь, во время зимней спячки, длящейся около 100 дней, не употребляет пищи и не осуществляет никаких физиологических отведений. В качестве энергетической эндогенной пищи медведь, как и другие гибернанты, использует большие запасы бурого жира. Температура тела этого животного в период спячки колеблется от 31 до 33 °C, уровень метаболизма снижается на 50—60 %, а число сердечных сокращений — с 40 до 10 ударов в минуту. Однако в состоянии гибернации медведь может координировать свои движения, а самка даже рожать и вскармливать потомство. Поэтому считают, что эти животные находятся в состоянии так называемой поверхностной спячки, близкой к глубокому летаргическому сну.

Другие представители животных, например барсук, могут находиться в земляной норе в зимний период более 2 мес. и впадать в периодическую спячку продолжительностью 24—29 ч. При этом температура тела этих животных снижается до 29 °C, а число сердечных ударов 55—25 мин. Особенности зимней спячки этих животных позволяют считать, что они так же, как и медведь, впадают в состояние, подобное летаргическому сну. У таких гибернирующих животных, как вальдшнепы, суслики, хомячки, прыгающие лягушки, сердце продолжает функционировать при падении температуры тела почти до 0—7 °C, в то время как у животных, не способных впасть в спячку, остановка сердца происходит в температурном диапазоне 10—16 °C. Функциональная перестройка клеток миокарда, способных функционировать при низких температурах, осуществляется в период подготовки вхождения в спячку.

В регуляции температуры тела гибернирующих животных активное участие принимают нейрогенные и нейрохимические меха-

низмы. Так, суслики и сурки входят в состояние гибернации через массивную медленную волну сна, во время которого начинают снижаться температура тела и уровень метаболизма. Электрофизиологические исследования состояния дienceфальной области мозга ежей показывают, что нейрогенная активность этого отдела головного мозга снижается задолго до падения температуры тела. При этом вначале подавляется электрическая активность коры, затем нейронов ретикулярной формации и, наконец, лимбической системы. Во время гибернации при температуре мозга $\sim 6,0$ °C в большинстве случаев сохраняется спонтанная электрическая активность во всех его зонах, но особенно в двигательной и сенсорной частях коры, средней преоптической области и вентромедиальных ядрах гипоталамуса. Однако величина таких электрических сигналов снижена. В отделе среднего мозга электрофизиологическая активность нейронов сильно тормозится, что связано с подавлением импульсации ретикулярной формации со стороны гиппокампа, который поддерживает состояние гибернации.

Роль биогенных аминов. В механизмах зимней спячки, ее поддержания и пробуждения важную роль играют биогенные амины — катехоламины и серотонин. Биогенные амины как нейрогенные медиаторы активно включаются в регуляцию температуры тела гибернирующих животных, оказывая влияние на уровень секреции в гипоталамусе релизинг-гормонов гипофиза, т. е. контролируют механизмы торможения и возбуждения. Содержание биогенных аминов у гибернирующих животных существенно изменяется на протяжении годичного цикла.

Катехоламины являются важным фактором, регулирующим метаболизм у теплокровных животных, поскольку при повышении их концентрации уровень обмена веществ сильно возрастает. Содержание катехоламинов у животных, находящихся в состоянии зимней спячки, колеблется. По данным одних исследователей, оно хотя и несколько повышено, однако их биологическая активность не проявляется. Это объясняется появлением биологически активных веществ в период развития гибернации в крови зимоспящих, которые блокируют действие нейромедиатора. По данным других авторов, содержание в мозге зимоспящих адреналина и норадреналина снижено на 20—35 %. Изучение концентрации дофамина, норадреналина и адреналина в мозге и сердце активных и гибернирующих ежей, а также 13-полосатых сусликов показывает, что в процессе спячки содержание норадреналина и адреналина снижается в мозге, сердце, буром жире и надпочечниках по сравнению с другими органами и тканями. В гипоталамусе, продолговатом мозге и мозжечке у этих гибернирующих животных содержание адреналина заметно снижается еще до вхождения в спячку.

Учитывая важную роль катехоламинов в термогенезе, их усиленный выброс в кровь при выходе из спячки рассматривают как пусковой механизм процесса пробуждения. Действительно, введение норадреналина в мозг в дозе 15—50 мкг/кг ускоряет процесс пробуждения животного, а при его внутриартериальной инъекции

вызывает увеличение артериального давления и частоту сокращений сердца у сурков, хомяков и сусликов. Внутриаrтернальное введение дофамина в дозах 80—150 мкг/кг массы тела также вызывает пробуждение гибернирующих хомяков.

В период наступления зимней спячки у животных существенно изменяется обмен катехоламинов. Задолго до этого в головном мозге изменяются функции центральных адренергических механизмов и метаболизм адреналина модифицируется. В фазе спячки биологическая активность и общее содержание катехоламинов в нейронах гибернантов также изменяются. Это связано с двумя факторами: блокированием высвобожденного нейромедиатора из адренергических нейронов активными ингибиторами и исключением процесса реализации сигналов аденилатциклазного цикла в результате комплексования катехоламинов с биомодуляторами либо изменения конформационного состояния рецептора на мембране.

Роль серотонина. Одним из биологически активных веществ, осуществляющих контроль за процессом зимней спячки, является серотонин, который оказывает ингибирующий эффект на уровень метаболизма и сократительный термогенез, т. е. снижает температуру тела и потребность в кислороде тканей. Гипотермический эффект вызывает как центральный, так и периферический серотонин, хотя механизм их действия различен, а влияние на теплоотдачу противоположно. Так, центральный серотонин увеличивает теплоотдачу, а периферический, наоборот, ее снижает.

При введении сусликам за 1,5 мес до зимней спячки 5-окситриптофана (предшественник серотонина) доля длинноволнового сна увеличивается, снижаются температура тела и потребление кислорода. При введении золотистым хомякам веществ типа флюоксетина, паргиллина или метилтирозина, которые оказывают стимулирующее или ингибирующее влияние на метаболизм серотонина, частота вхождения в состояние гибернации увеличивается.

У краснощекого суслика возникновение зимней спячки и пробуждение от нее характеризуются значительными изменениями в уровне и обмене серотонина в мозге животных. При вхождении в зимнюю спячку содержание серотонина в ряде отделов головного мозга увеличивается, причем в гиппокампе его уровень повышается уже осенью до впадения в спячку. В процессе зимней спячки, когда температура тела животного понижается до 15—16 °С, но сон еще неглубок, содержание серотонина повышается также в заднем отделе мозга. В гипоталамусе, среднем и промежуточном мозге сохраняется лишь тенденция к повышению содержания этого биогенного амина, а в мозжечке и больших полушариях существенных изменений концентрации серотонина не происходит. Выраженность этих изменений нарастает по мере понижения температуры тела. При этом снижается активность систем, разрушающих серотонин.

По мере углубления спячки и снижения температуры тела до 3—4 °С уровень серотонина и 5-гидроксидолилуksусной кислоты

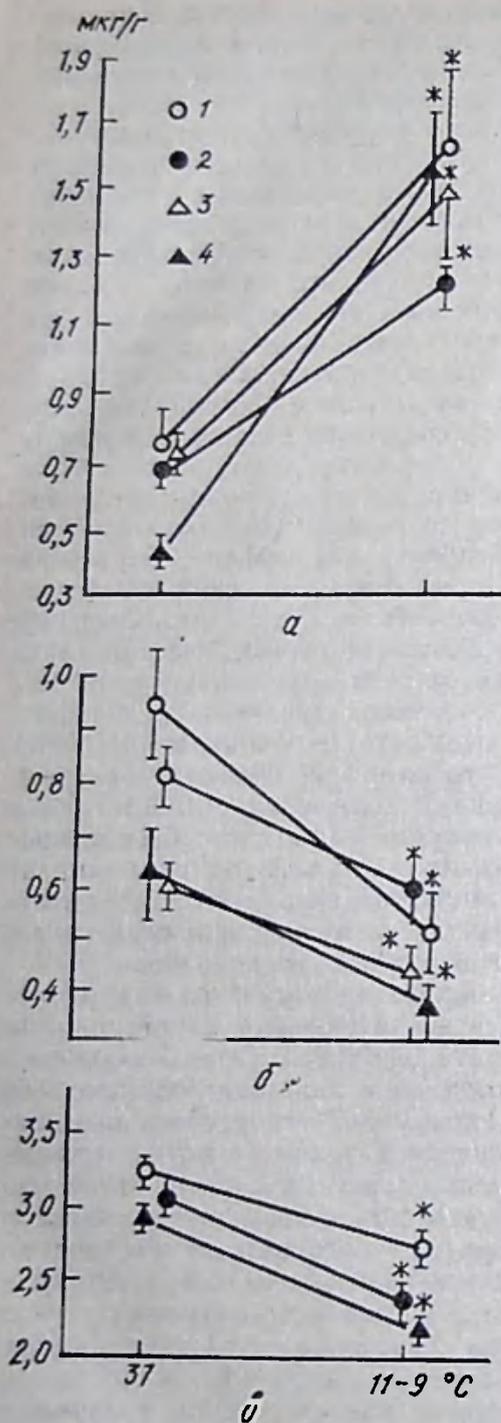


Рис. 96. Изменение уровня серотонина (а), гидроксиндолилуксусной кислоты (б) и активности МАО (в) у погружающихся в зимнюю спячку сусликов. По оси абсцисс — температура тела (°C):

1 — гипоталамус; 2 — средний мозг; 3 — задний мозг; 4 — гиппокамп. звездочка — $p < 0.05$ по сравнению с активным состоянием

в мозге краснощеких сусликов становится таким же, как и у бодрствующих животных. Как видно из рис. 96, при вхождении в зимнюю спячку и по мере снижения температуры до $11-9^{\circ}\text{C}$ у краснощекого суслика увеличивается уровень серотонина в тканях гипоталамуса, среднего и заднего мозга, а также гиппокампе примерно в два раза, однако при этом снижаются уровень 5-гидроксииндолилуксусной кислоты (5-ГИУК) и активность моноаминоксидазы (МАО) — фермента, индуцирующего окислительное дезаминирование серотонина до 5-ГИУК. У гибернирующего золотистого хомяка содержание серотонина в гипоталамусе во время спячки повышается в 24 раза.

Следовательно, повышение уровня серотонина в различных отделах мозга связано со снижением катаболизма этого биоминна. Конкретный механизм перестройки обмена 5-ГИУК у гибернирующих животных остается неясным, однако у зимне спящих он характеризуется особым видом метаболизма.

В процессе пробуждения животного катаболизм серотонина усиливается, а его функциональная активность в ряде отделов мозга снижается. Поэтому снижение активности серотонина является важным фактором пробуждения животного от зим-

ней спячки. Если ввести краснощекому суслику предшественника синтеза серотонина-5-гидрокситриптофан в дозе 100 мг/кг массы тела, то процесс пробуждения у него затягивается. Серотонин и его предшественники подавляют процесс разогревания тела и время выхода из состояния спячки. Это связано со способностью периферического серотонина оказывать сосудосуживающее действие. Торможение процессов тормогенеза осуществляется в основном периферическим серотонином, который эффективно снижает поглощение кислорода тканями и повышает время разогревания тела, тем самым уменьшая теплоотдачу (табл. 53). Эффект биогенных аминов зависит от способа введения. При введении раствора серотонина и 5-гидрокситриптофана пробуждающимся сусликам внутрибрюшинно время разогревания тела сильно тормозится, а при введении в третий желудочек мозга — наоборот, происходит быстрее.

Таблица 53. Время разогревания тела с 4,5 до 35 °С пробуждающихся от зимней спячки сусликов после введения серотонина и 5-гидрокситриптофана

Препарат	Время повышения температуры тела, мин	
	Внутрибрюшинно	В III желудочек мозга
Физиологический раствор	118±5	110±4
Серотонин	178±20 *	120±5
5-гидрокситриптофан	562±31 *	120±14

Примечание. Серотонин введен внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг, внутривисцерально — 100 мг, 5-гидрокситриптофан — 50 мг/кг и 100 мкг: * р < 0,05

Таким образом, повышение содержания серотонина в различных тканях мозга необходимо как для запуска процесса гибернации, так и для поддержания глубокой зимней спячки. Нейрохимическая регуляция температуры тела у гибернирующих животных осуществляется биогенными аминами мозга — норадреналином и 5-серотонином, действующими на преотническую область гипоталамуса. Микронъекции этих веществ в гипоталамус способствуют изменению поведения животных, находящихся в состоянии гибернации. Это свидетельствует о том, что аминергические и холинергические нейроны этой области являются центрами регуляции гибернации. Однако механизм их влияния на процесс пробуждения и вхождения в спячку остается во многом неясным. Внутривисцеральная микронъекция норадреналина сусликам вызывает увеличение выработки тепла в организме независимо от того, находилось ли животное в активном или гибернирующем состоянии. Поэтому этот биогенный амин вызывает повышенный термогенез при выходе из спячки, несмотря на то что температура его тела достигала почти 0 °С. Если ввести внутрь желудочка мозга серийскому хомячку серотонин, то, наоборот, происходит снижение температуры тела, т. е. биогенный амин подавляет выработку тепла и увеличивает его потерю в процессе спячки. В период вхождения в спячку у этого животного уровень 5-серотонина в 20 раз выше, чем у активных хомяков. Если сусликам ввести п-хлорфенилаланин или разрушить медиальные ядра гипоталаму-

са, синтезирующие 5-серотонин, то суслики теряют способность впадать в спячку. Наоборот, корм, обогащенный триптофаном, т. е. предшественником 5-оксисеротонина, способствует вхождению сусликов в состояние гибернации.

Серотонин периферических тканей в процессе зимней спячки регулирует уровень гипотермии, а серотонин головного мозга действует как ингибитор поведенческих и некоторых других физиологических функций. Гипотермия тела, индуцированная серотонином, связана со снижением потребления кислорода, теплопродукции и увеличением теплоотдачи тканями. Этот процесс под влиянием серотонина развивается довольно быстро и блокируется в присутствии циклогексимида. Действие периферического серотонина более медленное и продолжительное и сопровождается снижением потребления кислорода. Особенность этого биогенного амина подавлять поглощение кислорода и снижать температуру тела является существенной для развития регулируемой гипотермии при вхождении в фазу гибернации.

Вторым важным механизмом гибернизации является свойство периферического серотонина снижать теплопродукцию и теплоотдачу, т. е. экономно расходовать энергию. Следовательно, вклад серотонина в процесс гибернации будет зависеть от его содержания и катаболизма в различных отделах мозга.

Биохимия гибернации. При вхождении, углублении и выходе из состояния спячки в клетках и тканях гибернантов происходят сложные биохимические и нейрохимические изменения на уровне кислотно-щелочного равновесия, активности ферментов, нонтранспортных систем и эффектов гормонов.

В период гибернации, несмотря на торможение дыхательной активности, относительный баланс внеклеточного рН достаточно хорошо удерживается приблизительно в пределах 7,4, однако в тканях мозга и печени, диафрагме и скелетных мышцах рН внутри клетки несколько снижается. Физиологическое значение внутриклеточного ацидоза, возникающего во время спячки, пока не выяснено. Может быть, это связано с необходимостью ингибирования определенных метаболических систем. Например, при снижении рН тормозится активность ключевого фермента гликолиза — фосфофруктокиназы, а также активность норадреналина, который в физиологических условиях стимулирует термогенез и регулирует распад бурой жировой ткани.

При искусственном дыхательном ацидозе у хомяков тормозится функция гипоталамуса, что способствует вхождению животного в состояние спячки. Дыхательный ацидоз легко устраняется усилением вентиляции легких при выходе животного из спячки.

При пробуждении животных происходит быстрое разогревание их тела за счет распада бурой жировой ткани, которая содержит много липидов, митохондрий и отличается высокой цитохромоксидазной активностью, интенсивной васкуляризацией и симпатической иннервацией. У акклиматизированных к холоду крыс эта ткань обеспечивает 65—80 % общего термогенеза в период охлаж-

дения. Высокая термогенность этой ткани объясняется тем, что митохондрии способны быстро разобщать окислительное фосфорилирование на прямой путь окисления и в результате этого в организме пробуждающихся животных вырабатывается много эндогенного тепла, которое рассеивается по телу. Митохондрии бурой жировой ткани содержат особый белок — термогенин с M_r 3200, который образует связи с нуклеотидами и является естественным регулятором уровня АТФ в клетках.

В результате распада бурой живой ткани под воздействием норадреналина в жировых клетках активируется синтез с-АМФ и диацилглицерина, которые активируют мембраносвязанную фосфолипазу. В результате фосфолипазного гидролиза липидов образуются свободные жирные кислоты и ацетил-КоА, которые связываются с термогенином, в результате чего формируемый белком протонный канал становится проницаемым и накопленная энергия в жировых клетках рассеивается в виде тепла.

Хотя основным энергетическим материалом во время гибернации являются жирные кислоты, однако клетки центральной нервной системы для этих целей используют также глюкозу, т. е. во время пробуждения животного в качестве энергетического вещества для разогрева тела наряду со свободными жирными кислотами используется также сахар. Источником пополнения запасов углеводов в фазе гибернации являются процессы гликонеогенеза, в котором утилизируются предшественники аминокислот и глицерина. Наиболее выражены эти процессы у гибернирующих сусликов в печени и коре надпочечников. У арктических сусликов 2/3 запасов углеводов обеспечивает глицерин, который накапливается в тканях в результате распада триглицеридов.

Для процесса гибернации характерна потеря белков тканями, которая происходит постепенно. Например, у золотистых сусликов во время спячки содержание белка в скелетных мышцах снижается на 39 %, а в печени — на 22 %, в миокарде летучих мышей — на 47 % и существенно повышается при пробуждении. Поскольку продукты катаболизма белков используются в процессе гликонеогенеза, во время гибернации арктических сусликов существенно повышается активность ключевого фермента гликонеогенеза печени — фосфоэнолпируваткарбоксилазы, а также пируваткиназы, которые имеют более низкую температурную зависимость связывания с аллостерическими субстратами, активаторами и ингибиторами по сравнению с негибернирующими животными.

Процесс теплопродукции в теле гибернантов в существенной мере регулируется окислением сукцината в митохондриях, который по своей мощности превосходит окисление других субстратов цикла Кребса. При окислении сукцината увеличивается мембранный потенциал, транспорт восстановительных эквивалентов (НАД, НАДФ-Н) и Ca^{2+} . Окисление сукцината на НАДН в гомогенатах сердца гемийотермных и пойкилотермных животных отличается в 5—10 раз. В сердце кролика, голубя и крысы скорости дыхания без АДФ при добавлении сукцината и НАДН очень высоки, в то

время как тот же показатель в сердце новорожденной крысы, черепяхи и лягушки очень низкий. Термогенное дыхание отсутствует в сердце новорожденного животного, поскольку оно не способно регулировать состояние теплорвности.

В период гибернации, когда гомойотермные животные переходят в состояние пойкилотермии, роль сукцината как термогенного механизма образования макроэргов изменяется. При снижении температуры тела крысы на 5—10 °С фосфорилирующее окисление сукцината заметно тормозится во всех клетках организма, особенно в мозге. При этом наблюдается прямая корреляция между снижением температуры тела и интенсивностью окисления сукцината.

При вхождении в фазу зимней спячки у сусликов скорость дыхания митохондрий ингибируется, однако при этом степень активности окислительного фосфорилирования сохраняется на уровне, достаточном для поддержания температуры тела на несколько градусов выше температуры окружающей среды.

Причиной ингибирования окисления сукцината в условиях искусственной гипотермии является оксалат, который образуется в цикле Кребса из сукцината и подавляет активность сукцинатдегидрогеназы по механизму отрицательной обратной связи. Вторым фактором, ингибирующим окисление сукцината в процессе спячки, является серотонин, который регулирует процесс перехода к спячке. Снижение окисления сукцината в митохондриях при переходе к спячке достигает 50—75 %, однако это может быть частично устранено добавкой активаторов сукцинатдегидрогеназы — изолимонной или глутаминовой кислоты. При выходе из спячки происходит реактивация сукцинатдегидрогеназной активности, и скорость дыхания на сукцинате быстро восстанавливается до обычных физиологических уровней.

У сусликов в процессе зимней спячки значительно снижается скорость накопления Ca^{2+} -стимулируемого дыхания митохондрий печени при окислении сукцината и уменьшается скорость его аккумуляции в органеллах.

У гибернирующих животных скорость накопления Ca^{2+} в митохондриях в четыре раза ниже, т. е. степень энергизации митохондрий при зимней спячке снижена.

Такой термогенный гормон, как тироксин, регулирующий процесс выхода из спячки, увеличивает количество и скорость электрогенного входа K^+ в митохондрии. Скорость выхода K^+ при

Таблица 54. Содержание и скорость транспорта K^+ в митохондрии печени сусликов, находящихся в различных состояниях

Состояние животного	Температура тела, °С	Скорость транспорта K^+ , нмоль/мин · мг белка митохондрий	Количество, нмоль/мг белка митохондрий
Активное	37	41,9±5,9	89,5±5,6
Спячка	6	14,0±2,9	82,3±15,5
Пробуждение	16	63,7±0,8	168,3±3,7

спячке снижается в 3 раза по сравнению с активным состоянием и увеличивается в 4,5 раза при пробуждении животного, когда ему за 2—3 ч необходимо повысить температуру тела с 6 до 37°C (табл. 54). При этом скорости электрогенного входа K^+ , независимо от используемого субстрата, существенно снижена при спячке, т. е. проницаемость мембраны при спячке снижается.

Количество K^+ в митохондриях в период глубокой спячки не изменяется по сравнению с активным состоянием, несмотря на различия в скорости транспорта этого катиона, т. е. в период спячки ионные градиенты в клетке поддерживаются на таком же уровне, как и в период бодрствования.

Таким образом, имеется корреляция между динамикой K^+ в митохондриях и возрастанием температуры тела. Существующие различия в скорости транспорта K^+ в митохондриях животных, находящихся в различных состояниях, объясняются различиями в активности митохондриальной системы электрогенного транспорта этого катиона, в которой существенную роль играет белок с *M. m.* 60 кД.

Таким образом, интенсивность теплообразования у гибернирующих животных прямо связана с эффективностью процессов окислительного фосфорилирования и митохондриального окисления субстратов. Здесь важную роль играют митохондриальные популяции клеток бурой жировой ткани, которые являются основным поставщиком термогенного тепла в организме.

В тканях и органах животных в процессе гибернации накапливается α -токоферол, являющийся естественным ингибитором процессов перекисного окисления липидов. Накопление в мембранах клеток этого вещества имеет важное физиологическое значение, поскольку подавляет в состоянии гипобноза распад липидов до продуктов, которые являются токсичными для белков и мембран внутриклеточных органелл.

Температурная чувствительность мембраносвязанных ферментов у гибернирующих животных проявляется по-разному у различных животных. Например, у гибернирующих 13-полосных сусликов и негибернирующих морских свинок различий в активности ферментов на графиках Аррениуса не выявляется, а у сирийского хомяка, наоборот, активность ферментов, локализованных в плазматической мембране гепатоцитов, определяемая в координатах Аррениуса в состоянии спячки и при пробуждении, различна. Эти различия в активности ферментов связаны с их локализацией и характером липидного микроокружения в бислое мембраны.

В состоянии гибернации фазовый переход липидов во внешнем липидном монослое мембраны происходит при более низких температурах — при 13 или 4°C. Поэтому, в зависимости от локализации фермента в липидном бислое, температура фазового перехода и энергии активации этого процесса не изменяется у активных животных либо снижается в фазе гибернации. Различными методами обнаружено, что в миокарде суслика Ричардсона текучесть мембран в фазе спячки (по сравнению с активным состоя-

нием) существенно увеличивается. Аналогичное увеличение количества липидного бислоя обнаружено в микросомальных мембранах мозга сирийских и европейских хомячков в фазе гибернации. Анализ состава липидов мозга и почек хомячков, митохондрий печени и сердца сусликов и европейских хомячков показывает, что между индексом ненасыщенности липидов мембран и вхождением животного в состояние гибернации не выявляется прямой зависимости. Однако не исключено, что при понижении температуры тела в фазе гибернации происходят локальные изменения физико-химического состояния доменов липидов, окружающих интегральные белки, что приводит к изменению их ферментативной кинетики, обнаруживаемой в координатах Аррениуса.

В процессе гибернации происходят изменения активности ферментов углеводного и жирового обмена. Например, у домашней соны активность ключевого фермента пентозо-фосфатного шунта-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, которая поставляет НАДФ-Н для липогенеза, в 6 раз выше осенью, чем весной и летом. У сусликов, готовящихся к гибернации, активность ферментов печени, участвующих в процессах липогенеза, начинает повышаться вдвое уже в июне. При этом возрастает включение ^{14}C -глюкозы в жировую ткань в 80—100 раз. В период глубокой спячки у сусликов и ежей процесс липогенеза снижается в результате торможения активности печеночной глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и включения D-глюкозы в общие липиды. Следовательно, в летне-осенний период обмен липидов направлен на процесс ожирения, однако он тормозится в фазе глубокой гибернации. С целью более быстрого транспорта хиломикронных липидов к тканям у арктического суслика в зимний период в крови увеличивается в 4 раза концентрация сывороточного альбумина. У гибернирующей летучей мыши энергетические потребности также обеспечиваются в основном свободными жирными кислотами, поэтому окисление глюкозы может тормозиться как пальмитоилкарнитином, так и в результате нарушения функции фосфофруктокиназы — поливалентного аллостерического фермента с M_r 36 000, регулирующего скорость поступления глюкозы в цикле окисления и фосфорилирование фруктозо-6-фосфата, инициирующего процесс гликолиза. В результате снижения величины внутриклеточной рН и температуры тела во время гибернации этот фермент из каталитически активной тетрамерной формы диссоциирует на неактивную — димерную. Торможение функции фосфофруктокиназы способствует сохранению гликогена в мышцах в процессе спячки, который используется в процессе термогенеза при пробуждении животного.

Снижение температуры тела в процессе гибернации сопровождается также соответствующей перестройкой нонтранспортирующих мембраносвязанных переносчиков, и в первую очередь Na^+ - K^+ -АТФазы, поддерживающих ионную асимметрию в клетке. Так, у сусликов и хомячков в клетках коры надпочечников, печени, скелетных и гладких мышцах и эритроцитах K^+ лучше удерживаются после охлаждения животных до 5°C по сравнению с негибер-

нирующими животными. Например, у крыс и морских свинок при охлаждении до таких температур из клеток начинают вытекать K^+ и другие ионы. Способность клеток зимоспящих животных удерживать ионы связана с перестройкой функции Na^+-K^+-ATP -азы и барьерных свойств плазматической мембраны, которые предотвращают пассивную утечку ионов при $5^\circ C$. Таким образом, различие между зимоспящими и не впадающими в спячку животными состоит в том, что у гибернантов при околонулевых температурах активно работает Na^+ -насос. У колумбийских сусликов снижение температуры тела до $37-5^\circ C$ сопровождается увеличением сродства белкового переносчика к внешнему K^+ в 4 раза и внутриклеточному Na^+ в 3 раза. У морских свинок Ca^{2+} -зависимый транспорт калия в эритроцитах при $5^\circ C$ полностью подавлен, в то время как у сусликов он хорошо выражен. Хотя при $5^\circ C$ пассивный вход Ca^{2+} через плазматические мембраны эритроцитов морских свинок и ежей одинаков, однако у негиберирующих животных активность Ca^{2+} -насоса заторможена. Способность удерживать внутриклеточный K^+ гиберирующими животными является важной причиной увеличения их холодоустойчивости.

Гормональная регуляция процесса гибернации. Важное значение в физиологии гибернации имеет эндокринная сфера, которая наряду с центральной нервной системой обеспечивает последовательную перестройку обменных процессов и формирует адаптацию организма к действию низкой температуры. Характер перестройки функции эндокринной системы у гиберирующих животных на различных этапах (баутах) остается во многом невыясненным, так как у различных видов гиберирующих животных эндокринные железы функционируют неодинаково и, кроме того, у одного и того же вида активность разных желез на протяжении годичного цикла изменяется по-разному.

При максимальной активности желез внутренней секреции, которая наступает весной и летом, состояние спячки у животных никогда не возникает. К концу лета происходит заметное снижение гормональной активности, которое углубляется осенью и достигает очень низкого уровня во время спячки. Такая закономерность функционирования желез внутренней секреции типична для гипоталамо-гипофизарной системы, коры надпочечников и половых желез.

Другие эндокринные железы (поджелудочная, щитовидная, шишковидная) не подчиняются подобным закономерностям, и, например, у животных, впадающих в глубокую спячку (суслики, сурки), активность щитовидной железы снижается уже за несколько месяцев до гибернации. Однако зимой и весной активность этой железы у данных видов животных заметно повышается. У менее глубоко зимнеящих животных (хомяки, бурундуки) щитовидная железа находится в активном состоянии как до гибернации, так и во время спячки.

У животных, впадающих в глубокую спячку, наблюдается обычно ингибирование функции эндокринных желез, тогда как у

животных, находящихся в состоянии поверхностной спячки, эндокринные железы продолжают функционировать, хотя и на более низком уровне. Наблюдаемые у этих видов животных различия в функционировании эндокринных желез связаны с экологическими условиями существования.

Животные, впадающие в поверхностную спячку, обычно обитают в лесах, где солнечная радиация не так интенсивна, как на открытой местности, — среде обитания сусликов. Более того, хомяки и бурундуки перед спячкой запасают пищу и периодически просыпаются для ее потребления. Для животных, впадающих в состояние глубокой спячки, запастись кормом нет необходимости, так как они накапливают подкожный жир, который и является основным источником энергии во время гибернации. Поэтому снижение активности щитовидной железы в летний период у этих животных, очевидно, способствует накоплению у них жира.

Функция эндокринных желез у животных тесно взаимосвязана, так как одни виды гормонов действуют на активность других желез, подавляя или активируя их секрецию. Так, например, осенью и зимой секреция шишковидной железы увеличивается и вырабатываемый ею антигонадотропный гормон — мелатонин — оказывает ингибирующее влияние на секрецию половых желез, что предохраняет животных от воспроизведения в суровое время года.

Такие гормоны, как, например, мелатонин, глюкокортикоиды, норадреналин, серотонин, нейропептиды гипоталамуса, оказывают положительное влияние на процесс гибернации, т. е. увеличивают частоту спячки и сокращают срок предгиберирующего периода. Однако половые гормоны, и в частности тестостерон, оказывают тормозящее действие на гиберирующую способность животных. Необходимо учитывать, что существуют видовые особенности нейроэндокринной адаптации к температурным условиям среды. Например, перестройка этой системы у сурков может существенно отличаться от перестройки у особей, впадающих в несезонное оцепенение (китайский хомячок), поскольку они достаточно сильно отличаются запасами энергетических ресурсов и их использованием. Поэтому обобщения по характеру эндокринной регуляции у различных видов зимоспящих животных в ряде случаев представляют значительные трудности.

В целом можно отметить, что во время начальной фазы спячки функции многих эндокринных желез заторможены, затем они несколько реактивируются и быстро возрастают в фазе пробуждения весной. Однако функция эндокринной системы у гиберирующих животных в различных фазах спячки изучена в недостаточной мере, и это не позволяет обобщить механизмы, лежащие в основе инициации и развития процессов гибернации.

Гипоталамо-гипофизарная нейросекреторная система. Гипоталамо-гипофизарная нейросекреторная система (ГГНС) принимает участие в регуляции защитно-приспособительных процессов в организме, в том числе и такого важного видового процесса, как гибернация. Хотя роль и значение ГГНС у гиберирующих живот-

ных до настоящего времени изучены в недостаточной мере, однако исследования, проведенные на краснощеким (*Citellus erythrogenus Braudt*) и длиннохвостом (*Citellus undulatus Pallas*) сибирских сусликах, показали, что при погружении в спячку и до ее середины активность заднего отдела ГГНС снижается, а активность переднего увеличивается до декабря. С января нейросекреторная система у этих животных очень медленно начинает активироваться и ко времени пробуждения (март) в два раза превосходит активность в начале спячки. Аналогичные изменения активности ГГНС в ходе гибернации и пробуждения обнаружены у ежей и садовых сонь, у которых при пробуждении в кровь усиленно выделяется вазопрессин. Если, например, вазопрессорная активность плазмы крови у спящих сонь равна 37 ± 18 , то у животных уже через 3 ч после пробуждения она повышается в 9—20 раз.

У гибернирующих животных деятельность ГГНС контролируется внешними и внутренними факторами. К числу внешних факторов, индуцирующих процесс гибернации, следует отнести температуру, влажность и продолжительность светового дня. Внутренним фактором является уровень метаболизма, который контролируется функцией генетического аппарата. Регуляция генов, ответственных за уровень метаболизма, контролируется нейроэндокринной системой, т. е. существует обратная связь, при которой сигналы от экстеро- и интерорецепторов, достигнув различных отделов центральной нервной системы, перебрасываются на корковые нейроны, определяющие уровень нейросекреторной активности. Состояние и функция центров мозга, вовлеченных в регуляцию нейроэндокринных систем гипоталамуса в период зимнего оцепенения и спячки, остаются во многом невыясненными.

Кора надпочечников. Гормонам коры надпочечников, секреция которых регулируется гипоталамусом, принадлежит важная роль как в индукции, так и пролонгации процесса гибернации. К их числу относятся жирорастворимые стероидные гормоны — глюкокортикоиды, стимулирующие глюконеогенез, минералокортикоиды, поддерживающие водно-солевой баланс в организме, и стероиды промежуточного обмена, например кортикостерон.

Экспериментами по экстирпации различных желез внутренней секреции у гибернирующих животных установлено, что при удалении коркового слоя надпочечников животные не способны впасть в спячку. У адреналэктомированных животных после введения им кортизона и дезоксикортикостерона эта способность восстанавливается. Существует так называемый годовой цикл функциональной активности коры надпочечников, который характеризуется низкими показателями секреции в период зимней спячки, активацией его в период подготовки к пробуждению и максимальной активностью сразу после пробуждения.

У такого сезонного гибернирующего животного, как крапчатый суслик (*Citellus suslicus*), в период глубокой спячки (январь) активность коры надпочечников резко снижается. В период подго-

товки к пробуждению (февраль) в клетках коры надпочечников отмечаются признаки активизации секреторной деятельности органа: в клетках клубочковой зоны выявляется более развитый аппарат Гольджи, обнаруживаются клетки со сложными тубулярными образованиями в зоне гладкого эндоплазматического ретикулума, увеличиваются в размерах митохондрии. В середине марта, через 1—2 нед. после окончательного пробуждения, клетки клубочковой и пучковой зон у крапчатых сусликов уже интенсивно секреторируют в кровь гормоны коры надпочечников.

Период восстановления максимальной активности коры надпочечников занимает около месяца сразу после пробуждения. Перед впадением в спячку краснощеких сусликов происходит понижение уровня гормона в крови, а при глубокой спячке его содержание минимально. Весной происходит постепенное увеличение уровня кортикостероидов в крови, который достигает максимального значения после пробуждения.

В период зимней спячки секреция альдостерона у гибернарующих животных может происходить и при низкой температуре тела, в то время как секреция глюкокортикоидов на протяжении периода спячки не происходит, поскольку для их синтеза необходима высокая температура тела и присутствие АКТГ. Вместе с тем во время кратковременных спонтанных пробуждений надпочечники секреторируют необходимое количество глюкокортикоидов, которые, как известно, активируют ключевые ферменты глюконеогенеза — единственного поставщика энергии — глюкозы в условиях гибернации. Высокий или нормальный уровень альдостерона в крови необходим в связи с физиологической потребностью организма зимоспящих сохранять функцию натрий-калиевого гомеостаза в отсутствие потребления пищи и солей.

Между функционированием симпатoadреналовой и гипоталамо-надпочечниковой систем у зимоспящих животных существует тесная связь, хотя механизмы этой взаимосвязи недостаточно ясны. Известно, что стимулирующее действие адреналина и норадринина у животных проявляется главным образом весной, значительно слабее — летом, а осенью, перед впадением в спячку, этот эффект отсутствует. Такие колебания у краснощеких сусликов связаны с изменением холодочувствительности адренорецепторов и реактивности центральных ядер гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы.

До настоящего времени роль гормонов коры надпочечников в процессах гибернации остается во многом неясной. Не понятна также их функциональная активность во взаимосвязи с функционированием других желез внутренней секреции. Известно лишь, что у таких животных, как суслики и сирийский хомячок, адреналэктомиа устраняет процесс гибернации, а после имплантации ткани подпочечника способность к гибернации восстанавливается. Поскольку глюкокортикоиды оказывают крупномасштабное действие на метаболизм и термогенез, в настоящий момент трудно оп-

ределить механизм их влияния на процесс вхождения и поддержания фазы спячки.

Щитовидная и паращитовидная железы. Реализация процесса гибернации тесно связана с функционированием щитовидной железы, хотя ее роль и значение в этом процессе еще окончательно не выяснены. Щитовидная железа секретирует два тиреоидных гормона — α -тироксин и α -трийодтиронин (T_3 и T_4), которые с кровью попадают в органы-мишени, где оказывают соответствующее действие на обмен веществ.

Тиреоидэктомия, произведенная за две-три недели до вхождения животных в спячку, снижает способность животного к гибернации, а парентеральное введение трийодтиронина увеличивает число случаев вхождения в спячку, т. е. для развития и углубления процесса гибернации необходимо сохранение активности щитовидной железы. У сусликов и сурков снижение активности щитовидной железы происходит летом, т. е. за несколько месяцев до гибернации, а зимой, наоборот, секреция железы повышается.

У одного из самых больших видов сусликов *Mormota monax* зимой и весной концентрация T_3 и T_4 увеличивается на 65—75 % по сравнению с летним периодом. У 13-полосного суслика, который является типичным гибернирующим животным, также выявлено снижение секреторной функции щитовидной железы задолго до вхождения в состояние гибернации. При этом клеточная пролиферативная активность ткани железы снижается, в фолликулах накапливается коллоид и резко уменьшаются темпы органификации нуклеотидов и синтеза белка. На фоне этих перестроек в самой железе концентрация запасенного тироксина и трийодтиронина очень высока, однако молекулы гормонов в состоянии зимней спячки имеют очень низкое сродство к связыванию с транспортными белками. Наоборот, у таких гибернирующих животных, как сирийские, турецкие и европейские хомячки, щитовидная железа остается активной и в фазе спячки. Это связано, очевидно, с тем, что хомячки в фазе гибернации просыпаются и принимают корм.

Перед пробуждением активность щитовидной железы у гибернирующих животных резко повышается, поскольку для этого необходимы большие энергетические затраты. Однако не у всех видов гибернирующих животных наблюдаются такого рода изменения активности щитовидной железы, т. е. увеличение секреции T_3 и T_4 зимой и ингибирование этого процесса летом. Так, у *Citellus Golden, Turkish* и *European*, а также у бурундуков, которые относятся к семейству сусликов, уровень секреции тиреоидных гормонов в процессе гибернации и в период активности не изменяется. Следовательно, при глубокой гибернации у сусликов и сурков, а также при поверхностной спячке у хомяков и бурундуков функционирование щитовидной железы различно.

Однако механизм этих различий в содержании тиреоидных гормонов в крови различных видов гибернантов остается неясным. Возможно более высокий уровень гормонов в сыворотке крови

зимой обусловлен лучшей их связью с рецепторами при низкой температуре тела.

Ингибирование функции щитовидной железы у гибернирующих животных в конце летнего периода способствует снижению выработки эндогенного тепла и накоплению жира, а активизация секреции зимой рассматривается как подготовка животных к пробуждению в необходимый момент. Такая готовность к переходу в активное состояние очень важна, так как щитовидная железа играет исключительно важную роль в липидном и белковом обмене, стимулируя синтез РНК и белков в тканях, что способствует восстановлению органов в процессе весеннего пробуждения.

Клетки парашитовидной железы, секретирующие кальцитонин и регулирующие обмен кальция в костной ткани, в фазе гибернации не функционируют, в то время как клетки, секретирующие паратгормон (активное начало, мобилизующее Ca^{2+} из костной ткани), повышают свою активность. Очевидно, такая двойственная реакция клеток парашитовидной железы, возникающая в процессе гибернации, может объяснить тот факт, что в фазе спячки летучих мышей, арктических и 13-полосных сусликов, а также сирийских хомяков возникает достаточно выраженный остеопороз костной ткани скелета.

Поджелудочная железа. Поджелудочная железа относится к числу эндокринных тканей, которые в период спячки секретируют гормон в кровь в неполном объеме. Несмотря на то что в этот период островки Лангерганса у ежей, гибернирующих при $5^{\circ}C$, увеличиваются в размерах, содержание инсулина в крови снижается по сравнению с активными животными в 3,7 раза.

Иммунохимическими методами в этой фазе установлено, что ингибирование секреции и способности к связыванию с рецепторами инсулярных гормонов зависит от температуры тела, которая у ежей во время спячки снижается до $4-5^{\circ}C$. Однако при температуре тела выше $15-25^{\circ}C$ инсулин и глюкагон восстанавливают свою нормальную активность и влияют на уровень сахара крови. Секреция инсулина в крови начинает повышаться в момент, когда температура тела пробуждающегося животного достигает приблизительно $25^{\circ}C$. То же самое наблюдается и во время эпизодических спонтанных пробуждений у других гибернирующих животных.

Сезонные изменения функции поджелудочной железы отличаются у различных видов животных, и поэтому уровень обмена глюкозы довольно сильно изменяется от одного вида гибернирующего животного к другому.

Роль репродуктивных желез. Существует мнение, что период гибернации и период размножения можно трактовать как процесс, который контролируется главным образом половыми железами. Однако оказалось, что подавление функции половых желез не является необходимым для развития или торможения гибернации.

Изучение роли репродуктивных систем в процессах гибернации является важным, поскольку для млекопитающих, проживающих

в суровых условиях окружающей среды, сезонность воспроизведения имеет существенное значение. Роль гормонов половых желез у различных видов гибернирующих животных проявляется по-разному. У большинства зимоспящих животных процесс гибернации может протекать только при снижении функции гонад перед входением в спячку. Такое заторможенное состояние репродуктивных органов в зимние месяцы преследует две цели: во-первых, предохраняет животных от размножения в этот неблагоприятный период и, во-вторых, обеспечивает устойчивое гибернирующее состояние на протяжении длительного периода времени.

Органом, который реагирует на продолжительность светового дня, репродуктивный и гибернирующий цикл, является шишковидная железа, которая реагирует на изменение продолжительности светового периода секрцией антигонадотропных веществ. Увеличение времени светового дня ингибирует функцию шишковидной железы и тем самым стимулирует воспроизведение. Наоборот, укорочение времени светового дня активизирует шишковидную железу, что подавляет репродуктивную потенцию животного.

Удаление шишковидной железы, вырабатывающей мелатонин, снижает гибернирующую способность некоторых животных и увеличивает размеры половых желез. Парентеральное введение мелатонина животным увеличивает частоту гибернации с одновременным ингибированием активности гонад.

Роль шишковидной железы в регуляции отдельных стадий гибернации до настоящего времени выяснена неполностью. Удалось доказать, что удаление этой железы снижает длительность спячки только у некоторых гибернирующих животных, например у белоногих мышей и сирийских хомячков, но не оказывает влияния на золотистых хомячков, ричардсоновских и 13-полосных сусликов. Эктомия шишковидной железы у золотистых хомячков сокращает фазу спячки лишь на второй год после ее удаления. При этом пробуждение весной и восстановление половых функций у гибернантов происходит на полтора месяца раньше, чем у контрольных животных. Очевидно, эктомия шишковидной железы приводит к определенному эндокринному дисбалансу в организме, что нарушает гормональные годичные циклы гибернации и репродукции. Введение животным одного из гормонов шишковидной железы — мелатонина — увеличивает продолжительность спячки у белоногих мышей, сирийских и золотистых хомячков, но не оказывает влияния на 13-полосных и ричардсоновских сусликов.

Активность и роль половых желез в процессах гибернации у различных животных отличаются. Влияние половых желез на процессы гибернации обычно выясняется в опытах на кастрированных животных, содержащихся в условиях воздействия холода и темноты. Кастрированные животные входили в состояние гибернации значительно легче, чем контрольные: у них сокращался предгибернирующий период, а частота гибернации увеличивалась. Подкожное введение тестостерона кастрированным животным оказывает отрицательный эффект на индукцию процесса гиберна-

ции. Небольшие дозы гормона снижают частоту гибернации примерно на 49 % по сравнению с контрольными животными и на 67 % по сравнению с кастрированными. Более высокие дозы тестостерона полностью предотвращают гибернацию. Однако клеточные механизмы ингибирующего эффекта тестостерона на процесс гибернации не ясны.

Кастрация сусликов не оказывает влияния на ежегодную ритмичность гибернации, а у турецких хомячков, наоборот, удлиняет период спячки от 5—6 до 18 мес. Парентеральное введение тестостерона самцам сирийского хомячка и обоим полам турецкого хомячка тормозит длительность спячки. Как видно, у некоторых животных активность половых желез оказывает влияние на процесс спячки, хотя механизм этих процессов недостаточно изучен.

Антиметаболические пептиды и индукторы зимней спячки. На протяжении последних лет установлено существование в тканях зимоспящих животных биологически активных веществ, обладающих антиметаболическим и гипотермическими эффектами. Первые сообщения о веществах эндогенной природы, оказывающих влияние на зимнюю спячку, ее возникновение и пробуждение, были сделаны более 50 лет назад.

Вначале предполагали, что источником «гормона» гибернации является бурая жировая ткань. Однако в дальнейшем, при более строгой проверке, роль этой ткани как индуктора зимней спячки не была подтверждена, хотя она принимает активное участие в терморегуляции как гибернирующих, так и негибернирующих животных.

Несколько позже в мозге, крови и ряде периферических тканей зимоспящих животных были обнаружены вещества, способные подавлять метаболизм и снижать температуру тела у негибернирующих животных. Однако эти эффекты проявлялись у различных животных в неодинаковой степени. Например, переливание крови гибернирующего суслика другому активному 13-полосному животному стимулировало вхождение последнего в состояние гибернации даже в летний период.

Однако трансфузия сыворотки крови гибернирующих сусликов другим видам сусликов или хомячкам не вызывает подобных эффектов. Эти результаты свидетельствуют о существовании у реципиентов видоспецифической восприимчивости к действию индуктора спячки. Из мозга зимоспящих животных был выделен антиметаболический гормон, который был назван «антаболлин». Экстракты мозга некоторых видов рыб, введенные внутривенно крысам в дозе 300 мг/кг, вызывают у последних состояние оцепенения, снижение температуры тела на 3°C и потребления кислорода на 30—35°C. Экстракты мозга зимоспящих сусликов вызывают сходные гипометаболический и гипотермический эффекты. Однако экстракты мозга активных рыб и сусликов не вызывают явлений гибернации при введении их другим животным.

Частично очищенный активный агент, выделенный из экстрактов мозга гибернирующих рыб, представляет собой полипептид с

М. м. 80—140 кД, а из мозга зимоспящих сусликов — полипептид с М. м. 100—1000 кД. У крыс в условиях длительного голодания и воздействия холода также повышается уровень активного антиметаболического вещества в мозге, однако у зимоспящих животных в состоянии глубокой спячки его содержится в 10—50 раз больше. Эндогенные антиметаболические агенты выделены также из энтеринального слоя кишечника сусликов, которые после внутрибрюшинного введения белым мышам вызывают антиметаболический эффект.

После введения низких доз экстракта ткани тонкого кишечника температура тела у мышей снижается за 1 ч на 3,5 °С, а при введении больших доз — 33,6—32,8 °С. Максимальное снижение температуры тела мышей до 25 °С после введения экстракта кишечника наблюдается к 6—7-му часу. После введения экстракта кишечника суслика в дозе 1 мг/г уровень общего метаболизма снижается на 61 %, а в дозе 2 мг/г — на 76 %. При этом у мышей после введения экстрактов из ткани кишечника суслика снижается потребление кислорода, которое опережает падение температуры тела, т. е. наблюдается такая же закономерность, которая характерна для физиологического процесса вхождения в спячку зимоспящих млекопитающих. Очевидно, при вхождении в глубокую спячку у животных начинает синтезироваться одно или несколько эндогенных веществ, специфично ингибирующих это состояние. Эти вещества или факторы, скорее всего, видонеспецифичны и могут восприниматься рецепторами как гибернирующих, так и негибернирующих животных. Выраженный гипометаболический и гипотермический эффекты при внутрибрюшинном введении мышам оказывают также экстракты, полученные из надпочечников животных, находящихся в состоянии зимней спячки.

Таким образом, факторы, содержащиеся в экстрактах слизистой ткани кишечника, мозга и надпочечников, полученных от зимоспящих животных, вызывают характерные для гипобноза изменения метаболизма как у теплокровных, так и у холоднокровных животных. Одинаковая направленность действия этих факторов, выделенных из тканей животных в состоянии глубокой спячки, свидетельствует, что они представляют собой вещества, близкие по своей структуре и физиологическому эффекту. В организме зимоспящих животных накопление таких гипометаболических и гипотермических веществ снижает общий уровень метаболизма в 80—100 раз и изменяет регуляцию физиологических функций организма. Эти вещества получили общее название «триггеры спячки».

Молекулы этих веществ оказывают прямое действие на метаболизм в ходе подготовки животных к зимней спячке. Например, эритропоэтические ткани в ответ на действие «триггера спячки» начинают повышенным синтезом молекул гемоглобина, которые легко связывают кислород в тканях несмотря на то, что температура тканей гораздо ниже физиологических. По-видимому, «триггер спячки» изменяет структуру и функцию кислородпереносящих белков и структуру мембран эритроцитов. В состоянии гибернации в

крови сусликов появляются особые формы эритроцитов, которые отличаются повышенной осмотической и деформационной пластичностью по сравнению с эритроцитами нормальных животных и поэтому способны легче проходить через суженные кровеносные сосуды во время спячки. Появление белков и липопротеинов, сохраняющих более высокую подвижность клеточных мембран и препятствующих быстрому изменению их барьерных свойств, имеет также большое значение для выживания этих животных во время длительного гипотермического периода.

Гибернирующие животные в состоянии сна более устойчивы к действию специфических бактериальных и протозойных начал, в процессе гибернации происходит заметное ингибирование роста злокачественных новообразований. Гибернирующие суслики также достаточно устойчивы к летальным дозам ионизирующего излучения по сравнению с активными животными. Если будут получены «триггеры спячки» в очищенном состоянии, то их можно будет использовать для повышения устойчивости организма к действию различных патологических факторов, например для предупреждения осложнений при операциях на сердце и ряде других вмешательств, требующих существенного снижения уровня метаболизма и потребления O_2 в организме. Испытания, проведенные на крупных млекопитающих, показывают, что введение «триггера спячки» с М.м. 50 кД, локализованного в растворимой альбуминовой фракции плазмы, совместно с искусственной цереброспинальной жидкостью в желудочки мозга обезьян вызывают летаргические и опиагоподобные изменения в поведении животных на протяжении 3—5 ч, снижение температуры тела на $3^{\circ}C$ и частоты сердечных сокращений на 50 %.

Эффекты пептидов спячки могут быть у животных устранены или замедлены в присутствии опиагоподобных антагонистов, таких, как налоксан, налтрексон и др. Уровень белковых «триггеров спячки» сохраняется в крови зимой и затем резко снижается весной после пробуждения животных. Белковая природа триггера была доказана в опытах, в которых животным вводили гибернирующие белки, обработанные протеазой и нуклеазой. При обработке этих белков протеазой состояние гибернации не возникало, в то время как большинство животных, получавших препарат, обработанный нуклеазой, впадали в состояние спячки.

Предполагают, что гибернирующий «триггер спячки» — это скорее всего эндогенные опиагоподобные белки, синтез которых достаточно специфичен для гибернирующих животных. Однако негибернирующие животные, очевидно, содержат в мозге рецепторные участки, которые взаимодействуют с «триггером спячки» и вызывают состояние оцепенения. Исследования белковых экстрактов из субкортикальной ткани мозга гибернирующих сусликов показывают, что молекула «триггера спячки», появляющаяся в периферической крови, подобна или идентична по своей природе метаболитическому депрессанту-антаболону, т. е. она является низкомолекулярным нейрогормоном.

Нейрогормоны связываются в крови с фракцией альбумина, что предохраняет их от разрушения неспецифическими протеазами. Такой комплекс легко диссоциирует в тканях и влияет на метаболические процессы в клетках, а также изменяет состав и проницаемость мембран. Известно, что вещества, способные инициировать состояние, близкое к процессу гибернации, представляют собой нейротензины, бомбезины, опиаты, нейромедиаторы.

Нейротензин — это 13-аминокислотный пептид, локализованный в ткани мозга. Внутривенная инъекция этого вещества крысам вызывает гипотермию и гипергликемию, а мышам — снижение температуры тела на 3°C в течение 30 мин. Бомбезин представляет собой 14-аминокислотный пептид, который также локализован в ткани мозга млекопитающих. Введенный внутривенно крысам в дозе 0,1 мг он более эффективно, чем нейротензин, вызывает гипотермию и значительное снижение потребления кислорода тканями.

Эндогенные опиаты типа налоксана и эндорфина также обладают антиметаболическими свойствами. Накапливается все больше сведений об участии таких нейропептидов, как лей- и метэнкефалины, а также α -эндорфина в поддержании зимней спячки. Определенные концентрации лей- и метэнкефалинов радиоиммунологическим методом показывает, что содержание такого биоматериала в экстрактах головного мозга гибернирующих животных достоверно выше, чем бодрствующих. Высокий уровень α -эндорфина обнаружен в крови черного медведя в состоянии оцепенения. Поэтому поддержание процесса гибернации может быть связано с повышенной активностью опиоидов мозга.

В организме зимоспящих животных кроме факторов, индуцирующих спячку, существуют вещества, регулирующие пробуждение, — так называемые антитриггеры. Изменение соотношения триггеров и антитриггеров играет важную роль в регуляции процесса наступления спячки и ее прерывания. Согласно триггер-антитриггерной гипотезе зимней спячки к весне в организме усиленно продуцируются недифференцируемые молекулы антитриггера с большим молекулярным весом, которые образуют комплекс с молекулами триггера, инактивируя его. Инактивация триггера позволяет повысить достаточно быстро температуру тела и ускорить процессы метаболизма.

Таким образом, сейчас удалось обнаружить и выделить вещества эндогенной природы, инициирующие гипометаболическое состояние и снижение температуры тела при вхождении животных в состояние спячки.

СОХРАНЕНИЕ ГЕНОФОНДА
РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВКонсервация репродуктивных
клеток растений

Теоретическими и практическими вопросами, посвященными изучению механизмов действия низких температур на растительные объекты и разработкам методов их длительного хранения, занимается раздел криобиологии, который условно можно назвать криофитобиологией.

Криофитобиологию характеризуют как узкую отрасль науки, изучающую влияние холода на жизнеспособность и повышение устойчивости к нему биологических объектов растительного происхождения различного уровня организации. Одной из задач криофитобиологии является изучение механизмов естественной холодовой резистентности, а также создание эффективных методов криоконсервации ценных и исчезающих видов растений.

Сохранение генофонда редких и исчезающих видов растений может осуществляться, во-первых, на специально охраняемых территориях в виде ценопопуляций или в искусственно создаваемых ценозах, а также в ботанических садах и питомниках; во-вторых, путем сохранения геномов растений в виде семян, меристем, пыльцы и эмбрионов, а также других органов, несущих генетическую информацию в условиях криобанков.

Продолжительность жизни семян растений во многом зависит от видовых особенностей растений. По этому признаку растения делятся на три группы. К первой относятся растения, семена которых сохраняют всхожесть не более 3 лет (микробиотики), ко второй — от 3 до 15 лет (мезобиотики) и к третьей — свыше 15 лет (макробиотики). Большинство культурных растений относится к группе мезобиотиков. Период сохранения жизнеспособности семян всех видов растений можно существенно увеличить, если изолировать их от доступа тепла, влаги и кислорода. Например, уменьшение влажности семян на 1% удваивает продолжительность их жизни. Однако обезвоживание допустимо только до определенного предела. Большинство видов семян растений легко переносит высушивание до низкой влажности — 10—15% и ниже без потери всхожести. При снижении температуры на каждые 5°C продолжительность жизни семян растений увеличивается в два раза.

Существует взаимосвязь температуры хранения и содержания воды в семенах, поэтому их герметизация также увеличивает продолжительность жизни семян. В национальном хранилище в Япо-

нии семена высушивают до 4—6%-й влажности и хранят в герметической упаковке, а в хранилищах США семена сохраняют преимущественно в открытой таре при относительной влажности воздуха 32 %. В нашей стране используются оба указанных выше способа. Таким образом, хранение семян при пониженных температурах — наиболее старый метод их консервации на практике.

Одним из важных факторов для перехода репродуктивных клеток в состояние гипобиоза является снижение в биоматериале содержания свободной воды. При неполной дегидратации и длительном хранении клеток в условиях гипотермии (0—4 °С) частично осуществляют процессы аутолиза, что приводит к их гибели в процессе хранения. При этом в клетках могут накапливаться мутагенные вещества, которые вызывают изменения генетического аппарата клеток. Поэтому для сохранения наследственных свойств семян ценных коллекций периодически производят их пересевы и собирают свежие семена.

При полном анабиозе клетки и ткани практически приостанавливают как активное взаимодействие с внешней средой, так и обмен веществ. Поэтому в этом состоянии возможно чрезвычайно длительно (в течение десятков или сотен лет) сохранять генетические свойства растений. Для успешного замораживания растительных тканей используют различные криопротекторы или их комбинации. Многие виды криопротекторов, например полимеры (ПЭГ, ПВП), спирты (глицерин, 1,2-пропандиол), ДМСО и амины, весьма различны по своей эффективности при замораживании репродуктивных клеток растений. Если используют непроникающий криопротектор, то в зависимости от его природы и концентрации клетки будут частично дегидратироваться, а криоскопическая точка их замерзания снижаться в результате возрастания вязкости среды. В случае применения проникающих криопротекторов внутрь клетки они также оказывают влияние на точку замерзания и вязкость цитозоля, уравнивают осмотическое давление и таким образом оказывают стабилизирующее действие на клетки по коллигативному механизму.

Наиболее выраженным защитным действием при замораживании клеток капусты обладают сложные сахара, глицерин и некоторые другие соединения, которые позволяют сохранять жизнеспособность клеток на достаточно высоком уровне при их замораживании до —25 °С (табл. 55). Неплохой эффект оказывают также сахароза, сорбит, этиленгликоль, ДМСО и некоторые другие соединения. В последнее время для защиты клеток от повреждения морозом используют различные смеси криопротекторов.

Например, культуральные клетки сахарного тростника не сохраняются при замораживании под защитой полиэтиленгликолей, которые в индивидуальном виде не обеспечивают защиту клеток от разрушающего действия холода. Однако если в криозащитную смесь, содержащую 10%-й раствор ПЭГ, добавить глюкозу и ДМСО в концентрации 8 и 10 % соответственно, то клетки очень хорошо переносят криоконсервирование.

Таблица 55. Сравнительная криозащитная эффективность различных криопротекторных соединений при замораживании клеток капусты до — 25 °С

Слабая защита до — 70 °С	Защита средней степени до		Хорошая защита до — 20 °С	Очень высокая степень защиты до — 25 °С
	— 10 °С	— 15 °С		
Рафиноза Маннит	D-Глюкуроновая кислота	Аскорбат	Сахароза	Глюкоза
Глюкозамин	Оксипролин	Ацетамид	Сорбит	β-Метил-D-глюкозид
Галактуроновая кислота	Глутаминовая кислота	Метилацетамид	Лактат, пантотеновая кислота	Ксилроза
Диметилацетамид	Метилформамид	Диметилформамид	Метанол	Рамноза, эритрит
Ацетилглицерин	Диметилмочевина	Бетаинальдегид	Глицеральдегид	Ксилит
α-Аминомасляная кислота	N-Метилмочевина	Сок коры лжеакации	DMCO, 3-Диметилмочевина	Глицерин
α-и β-Глицерофосфат	Циклический диметилсульфонат, ацетилхоллин, N-метилперолидон, триэтиленгликоль		Метилглицин, метионин, сульфоксид, лактоамид	—

Такое благоприятное действие смеси криопротекторов может быть обусловлено снижением токсичности ПЭГ, а также смешиванием с веществами (DMCO, глюкоза), повышающими защитный эффект.

Достаточно длительное и более надежное хранение генетических ресурсов растений возможно только в условиях низкотемпературных банков, где репродуктивные клетки хранятся при температурах порядка — 120...— 196 °С. Для сохранения генетических биоматериалов пригодны семена, меристема, пыльца, эмбрионы и другие растительные фрагменты, несущие генетическую информацию. Однако создание криобанка семян не решает полностью проблему сохранения генофонда растений, так как большое число растений размножается вегетативным путем. Поэтому более важное значение для сохранения генома растений имеет криоконсервация меристемных тканей, что позволяет восстановить и размножить конкретный растительный генотип.

Криоконсервация семян

Сейчас разработаны рекомендации для сохранения в условиях криобанка семян большинства культивируемых видов растений. Предпочтительным является хранение семян при температуре — 18 °С либо ниже в воздухопроницаемой таре при влажности

семян 1—5 %. В этом случае семена могут сохранять свои свойства почти 400 лет, в то время как при температуре 5 °С воздухо- непроницаемых контейнерах они сберегаются не более 14 лет. В национальных лабораториях США 180 тыс. образцов семян сохраняются при 4 °С и 32% -й влажности в открытой таре или при —12 °С в закрытой таре. В Японии и ГДР семена в условиях хранения содержатся при температурах —1...—10 °С. Сейчас изучаются возможности криоконсервации семян культивируемых растений при сверхнизких температурах (—196 °С). Применение таких температур при достаточно низкой исходной влажности семян может обеспечить сохранение генетических ресурсов семян на протяжении сотен и более лет при соблюдении соответствующих оптимальных режимов их реконсервации.

В национальном хранилище семян нашей страны содержится около 400 тыс. образцов, которые сберегаются в герметизированной таре при температуре 4 ± 1 °С и влажности семян 2—9 %, в полужакрытой таре — при температуре 4 ± 1 °С и относительной влажности воздуха 30 %, что соответствует равновесной влажности семян на уровне 6—8 %. Для небольшого числа видов растений применяется хранение семян при температуре —10, —18 и —20 °С. По такой разработанной технологии генетические свойства семян сохраняются в течение 25—35 лет.

За рубежом генетические банки природной флоры создаются при крупных ботанических садах, например в Великобритании — в ботаническом саду Кью, в Швейцарии — в ботаническом саду Базеля. В нашей стране начаты работы по созданию коллекции семян нуждающихся в охране видов растений в Научно-исследовательском институте охраны природы и заповедного дела, где около 300 образцов семян заложены на длительное хранение при температуре 5 °С в герметизированной таре. Осуществляется также криоконсервация семян таких культивируемых растений, как зерновые, бобовые, овощные и технические культуры.

Низкотемпературное консервирование семян при температуре —196 °С является наиболее устойчивым и надежным методом, так как при такой температуре в биоматериалах практически прекращаются биохимические процессы, составляющие основу жизнедеятельности.

Консервация меристемной ткани. Генетический материал вегетативно размножающихся растений либо растений, семена которых невозможно замораживать, приходится сохранять путем консервации их верхушечных меристем. Практическая ценность меристем заключается в том, что их клетки могут непосредственно развиваться в растения. При клонировании меристем можно осуществить очень быстрое и в больших масштабах вегетативное размножение растений. Подсчеты показывают, что коэффициенты микроразмножения достигают 10^5 — 10^7 растений в год, т. е. в несколько тысяч раз больше, чем от применения обычного метода вегетативного размножения.

Для криоконсервации меристемной ткани необходимо их пред-

варительное культивирование *in vitro* в стерильных условиях, в результате чего ее клетки уменьшаются в размерах, лишаются крупных вакуолей и избыточной обводненности. Однако методика культивирования довольно трудоемкая и сложная, так как требует специальных питательных сред, температур, соблюдения влажности, состава среды. Полученные таким способом меристемные клетки могут быть заморожены прямым погружением в жидкий азот. Клетки растений больших размеров плохо поддаются замораживанию, так как содержат много воды и обширные вакуоли.

В культуральных условиях можно получать меристемные клетки небольших размеров после их частых пересадок в условиях измененной тоничности среды с использованием приемов закаливания при 0— —1,0 °С. После таких манипуляций меристемы лучше переносят замораживание, поскольку в мелких по размеру клетках отсутствуют крупные гидратированные вакуольные образования. Криоконсервирование меристемных клеток следует осуществлять особенно в тех случаях, когда в процессе длительного хранения генетического фонда семян они теряют свои свойства при подсушивании либо в случаях тканевых культур некоторых видов растений, для которых отсутствуют надежные методы вегетативного размножения.

Важным вопросом при консервации меристемных клеток является выбор объектов для этих целей, а также учет факторов, вызывающих изменение генотипа растения. При этом необходимо учитывать, что при размножении растений в культуре клеток часто возникают придаточные почки, в которых происходят мутагенные локальные процессы, ведущие к трансформации генома.

В настоящее время большинство видов декоративных растений сохранено благодаря развитию методов низкотемпературного замораживания меристемных тканей, т. е. разработаны приемы выращивания культур клеток, эквilibрации их в специальных защитных средах и режимы программного замораживания, чаще всего под защитой растворов ДМСО, глицерина и этиленгликоля. Существенным в технологическом цикле криоконсервирования репродуктивных тканей растений является сохранение свойств деконсервированных клеток в процессе их рекультивирования, и в частности способности к регенерации.

Сейчас имеются сведения об успешном замораживании меристемы различных видов дикого картофеля, гвоздики, пута, арахиса, клубники, моркови и других видов. Начало этим работам было положено в 1973 г., когда установили, что культура клеток моркови, замороженная до —196 °С и хранимая при этих условиях более 3 мес, сохраняла способность к дальнейшему росту и развитию. После этого в СССР, США, Англии, Японии были созданы криобанки для хранения репродуктивных клеток растений, в том числе 40—50 видов редких меристемных тканей и более 200 видов цветковых, декоративных ландшафтных растений, овощных, плодовых и лекарственных культур. В процессе микроклонирования культуры меристем могут быть получены растения, лишённые вирусов,

что является важным фактором генетической стабильности размножающихся растений.

Криоконсервация пыльцы и эмбрионов. Пыльца растений бывает двух типов: с высоким (50—60 %) и низким (10—20 %) содержанием воды. Сейчас разработаны способы лиофильной сушки пыльцы с низкой влажностью (2—5 %) и хранения в запаянных вакуумированных либо содержащих инертные газы ампулах. В последнее время работы по криоконсервации пыльцы и эмбрионов интенсифицируются, поскольку из них научились получать растения. Так, уже описано около 50 видов растений, из пыльцы и пыльников которых получены гаплоидные растения или гаплоидный каллус. Однако гаплоидные растения не дают жизнеспособных семян, поэтому необходимо удвоение их хромосомного аппарата путем обработки различными химически активными препаратами, например колхицином.

В настоящее время длительную консервацию генетических ресурсов растений осуществляют путем создания криобанков, в которых могут неограниченное время храниться семена, меристемные ткани, пыльца, эмбрионы и другие ткани растений, содержащие генетическую информацию. Можно также сохранять генофонд растений в природных ценопопуляциях питомников и ботанических садов, для которых материалами для размножения могут служить криобанки, а также естественные популяции. Наконец, вполне реально постоянное восстановление численности представителей генофонда редких и исчезающих видов растений в природных ареалах за счет реинтродукции.

Сохранение генофонда различных растений в указанных выше условиях позволит успешно осуществлять и решать вопросы клеточной и генной инженерии, поддерживать жизнедеятельность и устойчивость ценопопуляций и равновесие в природе.

Механизмы морозостойкости растений

Выведение и создание холодо- и морозостойких сортов культурных растений, используемых для производства пищевых продуктов и создания их запасов, имеют большое научное и народнохозяйственное значение. Зимостойкость растений — это свойство их переживать в условиях сезонного понижения температуры окружающей среды, сохраняя свой жизненный цикл. Основным механизмом, лежащим в основе морозостойкости, является способность растений предотвращать формирование внутриклеточных кристаллов льда и таким образом предохранять себя от гибели, когда температура окружающей среды снижается до $-30...-40^{\circ}\text{C}$. Это достигается путем дегидратации растительных клеток, в силу чего формирование кристаллов льда происходит лишь в межклетниках. Устойчивость определенного вида растений к воздействию низких температур генетически детерминирована, т. е. связана с экспрессией специфических генетических локусов и синтезом определенных продуктов, обеспечивающих стабильность структур клетки к

холоду. Свойство растений противостоять морозам начинает проявляться в тот период, когда снижается температура окружающего воздуха и уменьшается продолжительность светового дня. В этот период растение от летнего вегетирующего состояния переходит к зимней покоящейся фазе. Обязательным начальным этапом адаптации древесных либо других видов растений к морозу является их вступление в состояние глубокого покоя, который служит основой для развития последующих фаз морозоустойчивости (закаливания). При этом в тканях растений уменьшается концентрация стимуляторов роста и возрастает содержание ингибиторов метаболизма, которые тормозят обмен веществ в тканях растений до конца зимовки.

Торможение роста растений и вступление их в покой происходит под влиянием различных по своей природе ингибиторов: фенольных, терпеноидных соединений и особенно абсцизовой кислоты, которая оказывает влияние на холодоустойчивость даже у активно вегетирующих растений. В состоянии покоя природное или искусственное накопление в растениях ингибиторов роста повышает их морозостойкость примерно на 10 °С. Накопление ингибиторов роста в тканях растений протекает довольно медленно на протяжении 1—2 мес, и повышение их концентрации зависит от темпов похолодания и продолжительности фотопериода.

При вхождении в состояние покоя в начальных фазах в клетках происходит переориентация процессов синтеза и метаболизма белков, липидов, гликопротеинов, веществ гормональной природы и фосфорорганических веществ, которые формируют биоактивные соединения, необходимые для выживания в условиях отрицательных температур. Существенным этапом перехода растений к холодовой адаптации является изменение экспрессии генов, что выражается в ингибировании активных генов, в норме регулирующих рост, развитие и фотосинтез. Вместе с тем активируются гены, контролирующие холодоустойчивость, в результате чего в цитоплазме клеток морозостойких растений начинают накапливаться низкомолекулярные белки, синтезироваться специфические адаптогены и протекторы. На терминальном этапе эта перестройка завершается определенными структурными изменениями клеток и тканей растения. Последовательность этих процессов можно представить в виде следующей схемы.

Закаливание растений. Процесс закаливания — сложный биологический комплекс, который включает ряд последовательных фаз: инициаторную, или первую, фазу, при которой происходят торможение роста растений и переход его в состояние покоя; вторую фазу закаливания, характеризующуюся изменением формы клеток растений и их частичной дегидратацией; третью фазу закаливания, т. е. стабилизацию структуры и метаболизма, который переходит на более низкий уровень.

В первой фазе закаливания в клетках снижается концентрация ауксинов, повышается проницаемость мембраны для воды, которая частично мигрирует в межклетники. Развитие морозостойкос-

ти в первой фазе закаливания лучше протекает на свету, когда клетка способна больше накопить энергетических веществ за счет фотосинтеза, повысить синтез белков и запастись резервными липидными частицами, которые локализуются вдоль клеточных стенок.

Во второй фазе закаливания в клетках повышается концентрация сахаров и происходит торможение роста растений. В этой фазе также играет важную роль время светового воздействия. При отсутствии светового облучения во второй фазе закаливания при $-3...-7^{\circ}\text{C}$ морозостойчивость снижается на 30 % и более. Вторая фаза закаливания обычно протекает от 9 до 12 дней при температуре -3°C ($0- -2^{\circ}\text{C}$), причем важное значение имеет продолжительность первой фазы закаливания. Световое облучение с преобладанием коротких волн стимулирует синтез свободных аминокислот и белков в клетках. Растения, облученные таким светом, развиваются медленно и зимой отличаются высокой морозостойкостью. Закаленные во второй фазе растения достаточно хорошо переносят температуру -10°C , за исключением сорта ячменя Ченад-345 (табл. 56). Вторая фаза закаливания различных сортов длится неодинаковый период, протекание ее определяется условиями прохождения и формирования сорта. Это связано с различиями в направленности метаболизма углеводов и азотистых веществ в узлах кущения, а также с содержанием в них ростактивирующих соединений.

Таблица 56. Влияние закаливания на морозостойкость сортов озимого ячменя (количество живых растений, %)

Сорт	Незакаленные растения		Закаленные растения	
	-3°C	-10°C	-3°C	-10°C
Паллидум 14/14	27,8	0	100	100
Донской	16,7	0	100	56
Ширецкий	0	0	100	20
Ченад-345	0	0	100	0

Растения зимостойкого роста озимого ячменя Паллидум 14/14 быстрее проходили вторую фазу закаливания, чем другие виды растений, и этот сорт хорошо выживал при температурах порядка $-8...-10^{\circ}\text{C}$. В реализации различных фаз закаливания большую роль играет вода растений.

Роль воды в закаливании растений. Роль воды в адаптации растений к воздействию холода заключается в том, что в начальный период закаливания в клетках растений происходят определенные физико-химические изменения, которые способствуют их обезвоживанию, т. е. снижают вероятность развития внутриклеточных кристаллов льда. Поэтому степень холодовых повреждений растений определяется во многом условиями их водного режима.

В растительных тканях вода локализована во внутриклеточном и внеклеточном пространствах. Внутриклеточная вода в растительных клетках так же, как и в животных клетках, существует в виде трех фракций: свободной, связанной и прочно связанной. Фракция

связанной воды замерзает при температурах $-70...-80^{\circ}\text{C}$, а прочно связанной — при $-100...-130^{\circ}\text{C}$. Основная масса свободной воды внутри цитоплазмы клеток растений имеет свойства жидкого коллоидно-солевого раствора и является метаболически активной. Ее криоскопическая точка охватывает температурный диапазон от $-2...-5^{\circ}\text{C}$. Внеклеточная вода, локализованная в межклетниках, представляет собой разбавленный солевой раствор, который осуществляет медленный обмен с внутриклеточной водой; кристаллизуется она при температурах $-1...-2,8^{\circ}\text{C}$.

Одно из первых изменений, происходящих в начальный период закалывания растений, — уменьшение содержания свободной воды в клетках узлов кушения, что является очень важным фактором морозоустойчивости. Не все виды растений обладают способностью в период закалывания перераспределять воду из клеток в межклетники.

Например, в клетках незакаленной пшеницы содержится до 6 г воды, а после закалывания — 2 г. В последующем это происходит благодаря тому, что часть воды в узлах кушения переходит в межклетники, а в цитоплазме накапливаются водорастворимые белки. Хорошо закаленные узлы кушения озимой пшеницы, адаптированные при 0°C и медленно замороженные со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ до $-2...-5^{\circ}\text{C}$, при дальнейшем замораживании выносят температуру $-12...-19^{\circ}\text{C}$. Этот пример показывает, что водный баланс растительной клетки оказывает существенное влияние на их выживаемость в условиях низких температур. Степень дегидратации клеток зависит от условий и скорости их промораживания, накопления клетками адаптогенов и т. д.

В процессе закалывания мембраны растительных клеток изменяют свою проницаемость таким образом, что она позволяет быстро перераспределять фракцию свободной воды из цитоплазмы в межклетники. Поэтому морозостойкость растений во многом зависит от способности клеток перераспределять свободную воду из цитоплазмы в межклетники и повышать таким образом концентрацию фракции связанной воды внутри клеток. Опыты *in vitro* показывают, что сок, получаемый из закаленных растений озимой пшеницы и замороженный до -25°C , содержит намного больше воды в связанном состоянии, чем сок из незакаленных растений.

Замерзание вне- и внутриклеточной воды растений протекает по-разному. В фазе, предшествующей образованию внеклеточных кристаллов льда, клетки растений вначале переохлаждаются. Температура, при которой внутриклеточное содержание будет кристаллизоваться, зависит от концентрации растворенных в тканевой воде веществ. Обычно прежде чем происходит спонтанное образование центров кристаллизации в растительных тканях, они переохлаждаются от 3 до 8°C . При медленном замораживании в условиях переохлаждения формируются кристаллы внеклеточного льда, и свободная вода цитоплазмы начинает перераспределяться в растущие кристаллы льда вследствие более высокого давления ее паров. Это приводит к повышению концентрации растворенных ве-

ществ внутри клетки и снижению криоскопической точки ее замерзания. Степень обезвоживания клеток зависит как от температуры и темпов образования внешнего кристалла льда, так и от начальной концентрации растворенных веществ в цитоплазматической среде. Поскольку в процессе закаливания более или менее разбавленная фракция свободной воды мигрирует в межклетники, то при медленном замораживании она быстро кристаллизуется с образованием крупных внеклеточных кристаллов льда. Оставшаяся внутри клетки вода, наоборот, приобретает в процессе дегидратации свойства связанной воды, теряет способность кристаллизоваться при тех же величинах температур, при которых замерзает внеклеточная вода. При этом большую роль играет скорость замораживания. Если, например, узлы кущения озимой пшеницы холодоустойчивого сорта выдержать при -3°C в течение 16 ч, а затем медленно со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ заморозить, то они затем выдерживают температуры порядка $-18...-20^{\circ}\text{C}$. Если скорость замораживания повысить, например, до $15^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, то клетки погибают уже при температурах $-12...-13^{\circ}\text{C}$. Закаленные клетки при воздействии отрицательных температур обычно выживают, так как они легко переносят процесс дегидратационного сжатия, вызванного образованием внеклеточного льда. Устойчивость клеток к сжатию и образованию внеклеточного льда зависит от вида растений, стадии их развития, сезона года и других факторов.

Закаленные к холоду клетки растений способны также предотвратить криоденатурацию внутриклеточных биополимеров, поскольку они могут переохлаждаться до очень низких температур. Правда, предотвращение замерзания, достигаемое глубоким переохлаждением, может повышать холодоустойчивость только до определенного предела, который не бывает ниже температуры гомогенной нуклеации клеточного сока. Эти температуры колеблются в интервале $-29...-31^{\circ}\text{C}$. Более глубокое переохлаждение жидкой части цитоплазмы растений очень опасно, так как она находится в метастабильном состоянии, которое может при температурном сдвиге стать неустойчивым и при температуре гомогенной нуклеации может произойти быстрая внутриклеточная кристаллизация, являющаяся летальным фактором для клетки. Поэтому в природных условиях, когда температура окружающей среды снижается ниже -40°C , растения не способны пережить глубокое переохлаждение, так как при этих температурах паренхиматозные и меристемно-зачаточные ткани полностью разрушаются.

Индукторами гомогенной или гетерогенной нуклеации могут быть различные факторы и вещества, существующие в природе (кристаллики льда, инородные частицы и бактерии). Например, в повреждении неустойчивых к заморозкам видов растений принимают участие два вида энзифитных бактерий, которые индуцируют спонтанную кристаллизацию в клетках уже при температурах $-2...-5^{\circ}\text{C}$. Причем, имеется прямая зависимость количества активных центров кристаллизации от числа этих бактерий в тканях растений.

Процессы кристаллизации растительных клеток. Процессы замерзания растительных клеток, как и другого типа клеток, сильно зависят от таких внешних и внутренних факторов, как скорость и степень переохлаждения, собственная устойчивость растений к воздействию холода, строение и состав мембран и т. д. В принципе, процессы кристаллизации клеток растений при замерзании очень подобны процессам, протекающим в клетках других происхождении. Обычно может реализоваться два механизма: вне- и внутриклеточная кристаллизация жидкой фазы клеток. При росте внеклеточного кристалла льда, когда охлаждение достигает $-1... -2^{\circ}\text{C}$, клетки подвергаются дегидратации и протопласты на 50 % сжимаются в объеме.

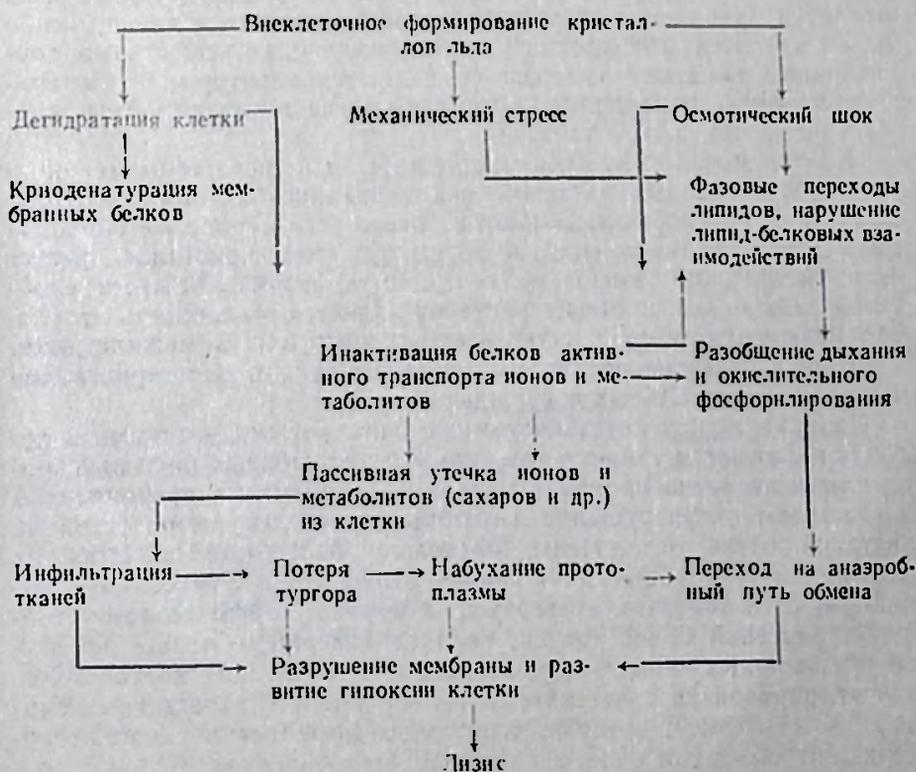
Обезвоживание при внеклеточном замерзании растительных клеток является следствием разницы химического потенциала молекул воды, переохлажденных внутри клеток, и молекул, локализованных в кристаллах наружного льда. У незакаленных к холоду растений явления, связанные с осмотической дегидратацией и сжатием протопластов, приводят к необратимым повреждениям мембранных и протоплазматических структур и гибели клеток уже при температурах $-1... -2^{\circ}\text{C}$. Морфологически это проявляется в том, что сразу же после оттаивания ядро клеток приобретает темную окраску вследствие денатурации хроматина. При этом наблюдается выраженный плазмоллиз клеток в результате потери барьерных свойств внешней оболочки. В закаленных сортах растений подобного рода морфологические изменения при указанных температурах не возникают, если время охлаждения кратковременное. Если же время экспонирования тканей растений увеличивается, то в них развиваются указанные выше изменения постепенно: наблюдается слабое потемнение ядра, развивается мелко- и крупнозернистая грануляция, протоплазма приобретает полосатый вид. Явление, при котором происходит критическое сжатие протопластов, сопровождающееся их гибелью, носит название «фростплазмоллиза». Причиной гибели клеток при фростплазмоллизе являются отделение плазмолеммы от клеточной стенки и ее низкотемпературная коагуляция.

Формирование внешних кристаллов льда в межклетниках морозостойких растений протекает гораздо медленнее, чем у теплолюбивых, причем кристаллы у них небольших размеров. В клетках морозостойких видов растений в результате сильного обезвоживания и сжатия внутри цитоплазмы кристаллы льда, как правило, не формируются. После потепления растаявшая вода межклеточников поступает в клетки и восстанавливает их форму и функцию. Однако при очень быстром замерзании в клетках растений могут образовываться внутриклеточные кристаллы льда, что приводит к их гибели.

Различают два типа внутриклеточного замерзания: вспышкообразное и замедленное. При вспышкообразном характере замерзания кристаллы льда в клетке образуются мгновенно, клетка быстро темнеет и разрушается. Это происходит в случае резкого

скачка холода в природе. При втором виде распространение кристаллов льда происходит более плавно, и динамику роста кристаллов в клетке можно наблюдать под микроскопом.

Клетки тканей незакаленных растений (например, томатов, фасоли, бахчевых) замерзают по типу вспышки даже при медленном охлаждении, а растений, способных к закаливанию (например, капуста, турнепс, шпинат, сахарная свекла), при медленном ($4^{\circ}/\text{мин}$) или быстром охлаждении замерзают по замедленному типу. У неспособных к закаливанию клеток протопласты полностью разрушаются, цитоплазма приобретает гранулярный или сетчатый вид, ядро сильно деформируется, плазматическая мембрана разрушается. В случае внутриклеточного замерзания клетки не будут разрушаться в том случае, если процессы кристаллизации и отогрева происходят очень быстро ($\sim 1000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). В этом случае формируются очень мелкие льдинки, не способные расти до критических размеров. Однако в природных условиях такие скорости замерзания растений не существуют. Поэтому практически клетки закаленных растений всегда подвергаются медленному охлаждению со скоростью, не превышающей $1-0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, которая не ведет к формированию внутриклеточных кристаллов льда (схема).



Обезвоживание является одной из важных причин повреждения растительных клеток при висклеточном замерзании. При увеличивающейся степени сжатия клетки углубляется температурный и осмотический стресс, который сильно влияет на устойчивость внешних мембран и внутриклеточных органелл протоплазмы. Существует, однако, определенная критическая величина вязкости цитозоля клетки, выше которой наступают необратимые изменения белков, и клетка становится нежизнеспособной.

Таким образом, уменьшение содержания воды в тканях зимующих растений осенью является важным приспособительным механизмом, способствующим переходу растений в состояние покоя. При этом большое значение имеет скорость снижения температуры воздуха и особенно почвы, поскольку переход от второй фазы закалывания к покоящемуся состоянию сопровождается снижением интенсивности метаболических процессов и структуры клетки, что приводит к снижению водопотребления такой клеткой. Снижение температуры почвы является важным, так как растения из холодной почвы поглощают воду менее интенсивно. Характерным является тот факт, что холодоустойчивые растения обычно имеют более простую морфологию и их меристемные ткани лучше защищены, чем теплолюбивых сортов. Морозоустойчивые растения способны быстро переориентировать свой метаболизм в ответ на воздействие низкой температуры путем синтеза специфических стресс-белков и накопления резервных веществ для восстановления (либо развития) после оттепели. Такими резервными веществами, тормозящими кипетку замерзания, являются некоторые виды арабиноксиланов, накопление которых в клетке тормозит рост и форму кристаллов внутри клеток.

Клетки меристемы, имеющие важное значение для выживания, у холодоустойчивых растений защищены ингибиторами замерзания. На поверхности этих клеток содержатся слизистые биополимеры, образующие пленку, в результате чего кристаллы растут очень медленно и имеют мелкозернистую форму. Важным свойством закаленных к холоду растений является способность их клеток перекачивать свободную воду из цитозоля в межклетники, в которых развитие процессов кристаллизации и рост кристаллов не вызывают летальных повреждений.

Разница между неустойчивыми и закаленными клетками к холоду заключается также в том, что у теплолюбивых растений кристаллы льда легко проникают через плазмолемму к протопластам и вызывают их разрушение. Подобные процессы у морозостойких растений очень ограничены, поскольку барьерные свойства их мембран и состав цитозоля сильно отличаются. Эти отличия заключаются в том, что, во-первых, мембраны клеток морозоустойчивых растений более текучи, так как содержат больше ненасыщенных жирных кислот, а, во-вторых, цитозоль таких клеток более концентрирован за счет синтеза и накопления криозащитных гидрофильных белков, которые достаточно эффективно снижают содержание объемной воды в клетке и, следовательно, создают воз-

возможность образования внутриклеточных кристаллов льда. Последствия действия внеклеточного льда в клетках растений можно представить в виде общей схемы, на которой представлены возможные пути влияния кристалла льда на метаболические системы клеток.

Структурно-функциональные изменения клеток растений. Одним из признаков при переходе растений в состояние покоя является заметное снижение интенсивности физиологических (рост, дыхание, морфогенез) и метаболических процессов (скорость ферментных реакций, накопление ингибиторов, переориентация синтеза РНК, белков и их комплексов). При отрицательных температурах скорость всех биохимических процессов в клетках замедляется, а некоторые из них полностью подавляются (например, активность гидролаз и каталаз). Переходу в такое состояние предшествуют циклические (фазные), морфологические и метаболические перестройки в клетке, которые в совокупности создают материальную основу для повышения их устойчивости к воздействию низких температур. Эти процессы представлены в виде общей схемы.



В результате реализации этих метаболических перестроек в закаленных к морозу растениях повышается содержание сахаров, растворимых белков, определенных форм рибонуклеиновых кислот, фосфорорганических соединений и ненасыщенных жирных кислот в составе липидов. В процессе закалывания в цитоплазме клеток появляются вещества-цитокнины, которые тормозят деградацию ее компонентов в результате подавления стимулирующего действия ауксинов, активирующих рост растений.

В результате уменьшения размера клеток под влиянием холодной дегидратации повышается вязкость цитоплазмы и мембран, увеличивается количество связанной фракции воды, что снижает вероятность формирования кристаллов льда внутри клетки. Перестройки такого типа в клетках холодостойких растений осуществляются в два этапа: вначале возникают быстрые неспецифические реакции на холодостресс — изменяется проницаемость мембран, снижаются мембранный потенциал и внутриклеточная величина рН, что приводит к изменению свойств белков цитозоля. На втором этапе развиваются специфические процессы, повышающие холодоустойчивость, к числу которых относятся синтез и накопление стресс-белков, сахаров и белково-углеводных комплексов в цитоплазме клеток. При постоянном и длительном действии пониженной температуры рост растения замедляется в результате пропорционального увеличения продолжительности всех фаз митотического цикла. Такие изменения состояния митотического цикла в клетке, происходящие при быстрой смене температурного режима, ведут к торможению процесса деления клеток. Для закаливания растений необходимо присутствие АТФ и НАДФН₂, что связано с активацией пентозофосфатного цикла в клетках, необходимого для восстановления НАДФ и функций мембран митохондрий для генерации АТФ. Метаболические процессы, происходящие в различных видах растений под действием сниженной температуры и укороченного фотопериода, довольно сильно отличаются. У растений холодоустойчивых сортов в клеточной оболочке увеличивается содержание сухого вещества за счет повышения концентрации целлюлозы и гемицеллюлозы, что коррелирует со снижением содержания общих пектинов и их растворимой фракции. Характерным является изменение метаболизма фенольных соединений, которые обладают антиоксидантными свойствами и способны существенно повышать стойкость биоструктур к холодострессу. В клетках растений, устойчивых к холоду, метаболизм фенольных соединений сдвинут в сторону образования лигнина, который повышает вязкоэластические свойства внешней оболочки, т. е. увеличивает ее механическую прочность. У этих растений общее содержание фенольных соединений очень низкое, за исключением β-оксибензойной кислоты, являющейся кофактором фермента оксидазы индолилуксусной кислоты, которая устраняет действие такого сильного ростового фактора, как индолил-3-уксусная кислота.

Перестройка плазматических мембран. Поскольку клетки закаленных растений способны вырабатывать криопротекторы типа арабиноксиланов и растворимых белков, адгезивная способность их мембран по отношению к кристаллам резко снижается. Этим свойством устраняется еще один криоповреждающий фактор, который представляет собой способность льда прилипать к стенкам клеток растений. Снижение этой способности связано с тем, что арабиноксиланы взаимодействуют с поверхностью кристаллической решетки льда и мешают росту и распространению кристал-

лов льда. Таким образом, эти соединения можно рассматривать как своеобразные ингибиторы замерзания.

Поверхностная мембрана протопластов незакаленных растений при осмотическом обезвоживании очень быстро теряет свои вязко-эластичные свойства и разрывается в момент растяжения. Это свидетельствует о том, что сократительные белки цитоскелета незакаленных растений не способны в период отогрева сохранять свои упругоэластичные свойства и тем самым предотвратить критическое увеличение размера и формы клеток. Наоборот, у закаленных к холоду растений вязкостные свойства белков цитоскелета изменяются таким образом, что они способны поддерживать формообразовательные процессы в клетках после оттаивания.

Важная роль плазмолеммы в криповреждении растительных клеток является предметом очень многих исследований, так как закаливание сопровождается рядом структурных и функциональных изменений качества и количества модификаций фосфолипидов, появлением в мембране дополнительных стабилизирующих белковых компонентов. Согласно гипотезе Дж. Левита и Г. Палта, первичные криповреждения мембран растительных клеток наиболее вероятны в системе белков, выполняющих активный транспорт ионов и метаболитов. В случае криоденатурации этих белков формируются каналы пассивной утечки ионов из вакуолей во внеклеточный раствор. В развитии холодового плазмолиза клеток в условиях внеклеточного замерзания большую роль играет уровень потери K^+ . При прогрессирующем выходе K^+ происходит набухание протоплазмы, хлоропластов и митохондрий, что способствует гибели замороженных клеток.

Ткани многих устойчивых северных древесных растений (например, ивы, тополя, березы) выживают зимой после воздействия очень низких температур ($-40...-50^\circ C$). В менее закаленных тканях тополя повреждения клеток происходят уже при температурах $-10^\circ C$. У неустойчивых к морозам растений повреждение мембраны заключается в том, что содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина снижается, концентрация фосфатидной кислоты увеличивается, что связано с активацией процессов ПОЛ и внутримембранных фосфолипаз в период замораживания и отогрева растения. Фосфолипазы, в частности фосфолипаза Д, широко распространены во внутриклеточных и плазматических мембранах клеток растений, хотя их физиологические и биохимические функции мало изучены. Известно, что фосфолипаза Д является низкомолекулярным белком, прочно связанным с мембраной либо локализованным в вакуолях.

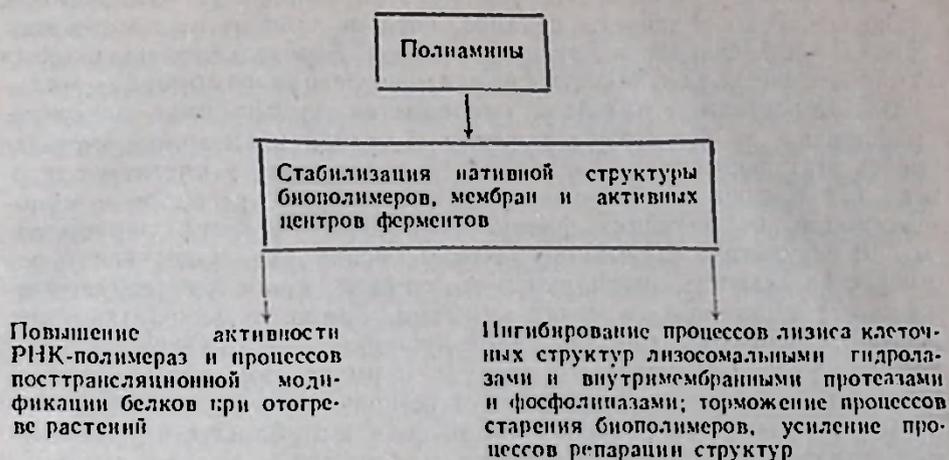
Активность связанной с мембранами фосфолипазы Д регулируется концентрацией Ca^{2+} или Mg^{2+} . Ионы Mg^{2+} оказывают ингибирующее действие на активность этого фермента в мембранах, например микросом, выделенных из тканей коры белой акации. Наоборот, ионы Ca^{2+} являются активаторами внутримембранных фосфолипаз, хотя механизм холодной активации фосфолипазы Д и ионами Ca^{2+} в растительных клетках во многом остается не-

выясненным. Однако по аналогии с клетками животного происхождения замораживание нарушает барьер проницаемости, в результате чего экзогенный Ca^{2+} входит внутрь клетки. С другой стороны, нарушение ионного гомеостаза в клетке нарушает прочность связи Ca^{2+} с кальмодулином, в результате чего он в ионизированной форме выходит в цитоплазму клеток. Следовательно, при замораживании клеток создаются условия для повышения концентрации Ca^{2+} внутри клетки и активации фосфолипазы Д, что сопровождается разрушением липидной матрицы. Кроме криповреждений липидных компонентов мембран в неустойчивых к холоду клетках, могут достаточно сильно повреждаться белки цитоскелета, которые прочно ассоциированы с внутренней поверхностью мембран при помощи белок-белковых и белок-липидных связей. Однако конкретные процессы, лежащие в основе перестройки белков цитоскелета в растительных клетках, остаются неизученными. Мало известно также о характере модификации углеводных компонентов мембран при закаливании растений. Известно лишь, что у растений неустойчивых видов при охлаждении в клетках резко замедляется синтез всех компонентов углеводной фракции клеточной оболочки, возрастает объем клеток и нарушается функция сократительных белков микротрубочек. Существенные отличия отмечаются также в метаболизме оксикоричных кислот и фенольных соединений, которые в клетках неустойчивых сортов интенсивно концентрируются.

Роль полиаминов. Существенную роль в поддержании жизнеспособности растительных клеток в условиях снижения температуры играют полиамины (путресцин, спермидин, спермин), концентрация которых в клетках при охлаждении возрастает. Полиамины как поливалентные органические катионы легко формируют ионные связи с отрицательно заряженными группами различных биополимеров и тем самым стабилизируют макромолекулярные структуры клеток, в том числе и мембраны. Благодаря образованию стереоспецифических комплексов они стабилизируют также нативную структуру ДНК, рибосом, регулируют проницаемость мембран.

Установлена способность этих соединений к селективной стимуляции отдельных этапов синтеза и модификации образовавшихся белков, процессов фосфорилирования негистоновых белков ядер, а также процессов транскрипции РНК. В суммарном виде возможные функции полиаминов при адаптации растений к понижению температуры и отогреве можно представить в виде схемы.

Аккумуляция полиаминов в адаптирующихся к холоду растениях носит защитный характер. Известно, что, например, в листьях овса при действии осмотического шока содержание полиаминов возрастает в 40 раз. Следовательно, в условиях холодового стресса биосинтез полиаминов в клетках растений в первой фазе активируется, в то время как концентрация ауксинов и других стимуляторов роста в тканях растений резко снижается. Поэтому полиамины относятся к соединениям, выполняющим важную роль



в ситуациях, когда растения подвергаются воздействию сильных экстремальных факторов. Эти соединения принимают участие в активации процессов дифференцировки и морфогенеза растений, которые нарушаются под влиянием холодового шока и замораживания, т. е. они практически выступают в роли своеобразных криопротекторов.

Роль углеводов. Углеводы являются основными защитными и энергетическими соединениями в растениях, которые входят в фазы закалывания. У зимующих растений при похолодании глубокой осенью крахмал в клетках исчезает, превращаясь в растворимые сахара, масла, лигнин и гемицеллюлозу. Между способностью к накоплению растворимых соединений и морозостойкостью существует прямая связь. Для морозостойкости растений имеют значение те низкомолекулярные сахара, которые содержатся в цитоплазме, а не в вакуолях. Защитная роль сахаров в отношении белков обратно пропорциональна их молекулярной массе.

В процессе закалывания растений к морозу в первой фазе происходит накопление сахаров (глюкозы, фруктозы, мальтозы, рамнозы и лактозы) в узлах кушения при температурах, близких к 0°C. Установлено, что в присутствии сахаров растения лучше выдерживают отрицательные температуры (табл. 57).

Таблица 57. Выживаемость растений пшеницы Мироновская 264, обработанных различными сахарами, в зависимости от температуры, %

Природа сахаров	Температура, °C					
	-14	-16	-18	-20	-23	25
Контроль	100	68	14	0	0	0
Глюкоза	100	100	46	18	0	0
Фруктоза	100	100	100	75	26	11
Сахароза	100	100	100	86	31	18

Во время второй фазы закалывания происходит дальнейшее повышение концентрации сахаров, которое зависит от темпов гидролиза олигосахаров и других углеводов. В результате повышения гидролитической активности ферментов углеводного обмена — мальтазы, инвертазы — мальтаза распадается на два вида глюкозы, рафиноза — на фруктозу и глюкозу. С углублением холодов активность этих ферментов увеличивается, и, наконец, в клетках растений все больше накапливается простых форм углеводов — моносахаридов, изменяющих физико-химические свойства протоплазмы. В результате связывания воды моносахарами существенно повышается вязкость цитоплазмы, что снижает криоскопическую точку замерзания воды в узлах кушения. Гидролиз олигосахаридов на моносахариды в клетках узлов кушения активируется уже при температурах окружающего воздуха порядка $-2...-3^{\circ}\text{C}$, причем у зимостойких сортов растений этот процесс характеризуется большей интенсивностью, поскольку они содержат больше криозащитных сахаров, например рафинозы и фруктозы, по сравнению с теплолюбивыми растениями. Чем выше морозостойкость, тем больше фруктозы и меньше глюкозы образуется в клетках растений.

При переходе от второй фазы закалывания в состояние покоя в протоплазме клеток растений под влиянием сахаров происходят характерные морфологические перестройки внутриклеточных оргanelл и мембранных структур, первыми признаками которых на субмикроскопическом уровне являются обособление протоплазмы от оболочки, сжатие протопластов и накопление в цитоплазме гранул липидной и липопротеидной природы. Такое явление обособления протоплазмы от плазматической мембраны иногда используют как показатель при диагностике растений на морозостойкость.

Роль структурных и функциональных белков. С наступлением холодов и вхождением в первую фазу закалывания в клетках растений активируется синтез РНК в водорастворимых белках, что способствует увеличению массы протопластов и плотности цитозоля. В этой фазе закалывания в клетках накапливаются также свободные аминокислоты, особенно аспарагиновая, глутаминовая, глицин, серин, аланин, аргинин и триптофан. Такие процессы у незакаленных растений не происходят.

В клетках закалывающихся растений простые белки формируют сложные комплексы с углеводами, в которых содержание углеводов, например пентоз, в 1,5—2 раза больше, чем в теплолюбивых растениях. Формирование таких гликопротеиновых комплексов также способствует снижению точки замерзания цитоплазматического содержимого подобно тому, как это происходит у некоторых холодоустойчивых рыб, накапливающих в крови бноантифризы — линейные гликопротеины, снижающие криоскопическую точку их жидкостей. В результате образования подобного рода комплексов формирование кристаллов льда и резкое обезвоживание клеток при низких температурах окружающей воды тормозятся. На синтез гликопротеинов в клетках растений существен-

ное влияние оказывает световое облучение. Поэтому длительное световое облучение в первой фазе закаливания играет важную роль для растения, поскольку в ней наряду с накоплением высоко- и низкомолекулярных белков повышается уровень витаминов, в частности аскорбиновой кислоты, которая играет важную роль в стабилизации биополимеров и поддержании их конформационного состояния. Защитное действие различных фракций водорастворимых белков заключается в том, что они способны активно связывать свободную фракцию воды клетки и таким образом переводят ее в связанное состояние. Поэтому под влиянием низких температур часть сложных белковых соединений переходит в более простые, т. е. их молекулы подвергаются диспергированию, что придает дополнительную устойчивость коллоидным системам цитоплазмы к морозам.

Ферментативная активность при вхождении растений в первую фазу закаливания характеризуется двухфазностью. Так, в первый период закаливания (сентябрь, октябрь) активность гидролитических ферментов возрастает и одновременно с этим увеличивается содержание растворимых сахаров. Ферментативная активность в клетках продолжает нарастать до вхождения их во вторую фазу закаливания и при отрицательных значениях температуры резко снижается.

В процессе закаливания клеток изменяются биосинтез и накопление глутатиона. При этом повышается уровень как окисленного, так и восстановленных форм глутатиона. Окисленный глутатион, содержащий S—S-группы, определяет синтетическую направленность действия папаина — фермента, влияющего на качественный состав белков цитоплазмы, а его восстановленная форма содержащая SH-группы, является кофактором гидролитического распада белка. В ходе холодого закаливания растений активность рибонуклеаз подавляется, что позволяет клетке накапливать водорастворимые белки и низкомолекулярные РНК. Эти изменения в активности ферментов могут отражать нарушения третичной и четвертичной структур ферментов и их изоферментный состав. В процессе холодого закаливания в клетках растений появляются новые типы ферментов, например оксидазы индолилуксусной кислоты.

Видно, что энзиматическая активность этих белков прежде всего направлена на распад крупных молекул до низкомолекулярных форм, что создает определенный криоскопический белковый «коктейль» в цитоплазме.

При закаливании в надземной части растений снижается активность полифенолоксидазы, аскорбиноксидазы и увеличивается активность пероксидазы, а в листьях и корнях нарастает активность протеаз. В первую фазу закаливания увеличивается содержание SH-групп белков на 20—30 % от исходного количества, которое в период перехода растения в состояние покоя не изменяется. Поэтому содержание SH-групп в листьях может служить своеобразным индикатором морозостойкости растений.

Регуляция биосинтеза белков и нуклеиновых кислот. При закаливании растений холодом на первом этапе включение аминокислот в белки повышается, а при заморзании резко снижается. Если ткани растений обработать специфическими ингибиторами синтеза РНК (актиномицин D, рифамицин, 5-фторурацил) и белка (циклогексамид, хлорамфеникол), то морозоустойчивость растений не развивается, так как перед вхождением в фазу закаливания не происходит запасания пластических и энергетических ресурсов в клетке. Существенное влияние на механизмы адаптации растительных клеток к холоду оказывают так называемые стресс-белки.

Белки, синтезирующиеся в клетках растений под действием низкотемпературного стресса, носят общее название стресс-белки по аналогии с ранее выявленными у дрозофил белками теплового шока.

Эти белки в составе тканей растений под влиянием холодового воздействия появляются в результате изменения экспрессии генов. При этом индуцируется синтез специфических мРНК и модифицируется их трансляция, что влияет на структуру синтезируемых полипептидов. Появление стресс-белков в клетке может быть обусловлено похолоданием и сокращением фотопериода, а также в результате действия различных ядов, разобщителей дыхания и окислительного фосфорилирования, гипоксии и других экстремальных факторов.

Конкретные внутриклеточные механизмы, ведущие к изменению экспрессии генома в ответ на внешнее низкотемпературное воздействие, остаются невыясненными.

В целом изменение экспрессии генома клетки в ответ на экстремальное воздействие можно представить себе в виде двухфазной реакции. В первой фазе сигналы через систему аденилатциклазы и вторичных мессенджеров передают информацию в ядро, где взаимодействуют с соответствующими генами и изменяют характер их экспрессии. Во второй — внутриклеточные изменения, соответствующие поступившему температурному сигналу, включают метаболическую цепь выражения гена, начиная от процессов транскрипции до трансляции и последующего образования соответствующих стресс-белков. Хотя механизм действия температурозависимых стресс-белков до конца остается неясным, однако их появление в цитозоле обычно связывают с устойчивостью клеток к воздействию экстремальных факторов.

Гипотезы индукции синтеза стресс-белков в клетках. Существует несколько гипотез механизма действия индукторов стресс-белков. В одной из них предполагают (Х. Линдерс), что индукторы стресс-белков могут блокировать перенос электронов и окислительное фосфорилирование в митохондриях. С одной стороны, подавление процесса генерации и аккумуляции энергии в клетке влияет на экспрессию генов, с другой — под влиянием холодового воздействия из митохондриальных мембран выделяется белок, несущий информацию о необходимости изменения экспрессии генов.

Обнаружены также цитоплазматические белки, которые *in vitro* активируют гены стресс-белков в изолированных ядрах, выделенных из клеток, не подвергавшихся стрессу.

Согласно концепции Дж. Левитта, первичные процессы при холодном стрессе развиваются с участием плазматической мембраны, когда изменяются форма и объем клеток, а также развивается процесс деградации фосфолипидов. Такая перестройка при холодном стрессе может вызвать генерацию соответствующих сигналов, поступающих в ядро клетки, и изменить активность генетических локусов.

Гипотеза Д. Неймана предусматривает участие белков цитоскелета в формировании ответа генома клетки на стрессовое воздействие, поскольку трехмерная сеть цитоскелета простирается в ядро и его матрике тесно связан с процессами активности генов. При различных внешних воздействиях может происходить перенос цитоскелетного белка с М.м. 45 кД из микросом в ядро с его одновременным фосфорилированием. Этот белок, связываясь с хроматином, вызывает изменение экспрессии генов. При температурном стрессе около ядра могут концентрироваться активные филаменты цитоскелета, изменяющие экспрессию генома. Механизм действия индукторов стресс-белков, изменяющих активность генов, остается невыясненным. Могут ли они непосредственно влиять на макромолекулярные структуры генома или сдвигать каким-то образом параметры внутриклеточной среды, в которой появляется белковый триггер, остается неясным.

Существует гипотеза, согласно которой при стрессе индуцирующие факторы приводят к появлению в цитозоле аномальных белковых молекул, которые влияют на функцию генов. Указанными выше индукторами могут быть аминокислотные аналоги, которые встраиваются в белки либо индукторы, возникающие в результате изменения терминации белкового синтеза (например, соединения типа пуромидина). Не исключено, что в роли индукторов могут выступать денатурированные белки, например после воздействия на них биохимических реагентов (протеаз).

Синтез многих стресс-белков в клетках эукариот сопровождается формированием в цитоплазме большого количества аденилированных нуклеотидов или, как их называют, «стрессовых алармонов», которые играют регуляторную роль в процессе приспособления клетки к стрессу. В клетках эукариот в цитозоле выявлен так называемый фактор транскрипции теплового шока белковой природы, активность которого в отсутствие стресса очень низкая. При стрессе этот фактор по неизвестным механизмам активируется и стимулирует транскрипцию стрессовых мРНК и, следовательно, соответствующих белков.

Роль фитогормонов и регуляции экспрессии генов в синтезе стресс-белков. У высших и низших позвоночных активация генетического аппарата происходит под влиянием гормонального сигнала, который является универсальным механизмом быстрой температурной адаптации с участием аденилатциклазной системы. Ана-

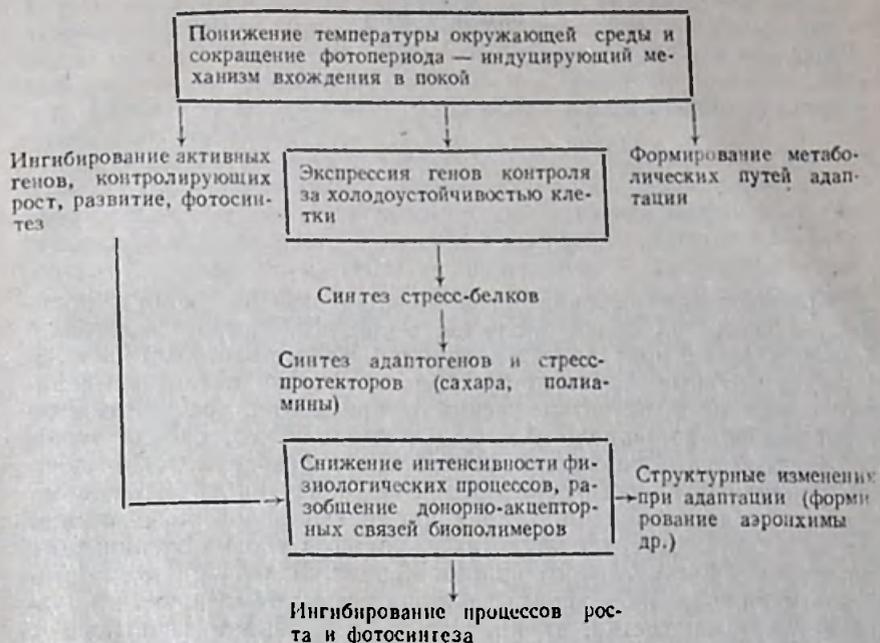
логичного рода механизмы активации «холодовых генов» могут существовать и в клетках растений в фазах закалывания, хотя эти механизмы очень мало изучены.

Известно, что при экстремальных воздействиях фитогормоны сильно влияют на экспрессию генов. В частности, при стрессе происходит освобождение абсцизовой кислоты из связанной формы, которая влияет на синтез мРНК и образование полисом. На уровне синтеза мРНК у растений стрессовое воздействие приводит к развитию двух процессов: индукции синтеза мРНК, транскрибирующей стресс-белки, и супрессии синтеза других видов мРНК. Наиболее чувствительным этапом транскрипции к внешнему стрессу является процесс инициации, в котором принимают участие РНК-полимеразы. Последние отличаются различной термоллабильностью, поэтому «запуск» процесса инициации в условиях холодного стресса может сильно изменяться. Процесс трансляции при температурном стрессе обычно замедляется, поскольку изменяется процесс фосфорилирования и дефосфорилирования белков рибосом. Сигналом ингибирования процесса трансляции является структурная перестройка плазматических мембран, что изменяет характер потока информации через аденилатциклазную систему и функцию цитоплазматических протеникиназ.

Феномен холодного стресса, выражающийся в изменении экспрессии гена, характерен практически для всех видов прокариот и эукариот, в том числе и растений. Стресс-белки, синтезируемые в клетках прокариот и эукариот, отличаются тем, что все они являются кислыми белками и условно разделяются на большие с $M. m.$ 68—100 000 и малые с $M. m.$ 15—30 кД. Появление или потеря организмом температурной устойчивости всегда совпадает с накоплением или деградацией стресс-белков. Термоустойчивость организмов не развивается, если в клетках не появляются стресс-белки, например при подавлении их синтеза ингибиторами транскрипции и трансляции.

Синтезируемые в клетках стресс-белки локализируются в виде депо в плазматических мембранах, мембранах аппарата Гольджи, цитоскелете, ядре, где могут связываться с хроматином и влиять на его пространственную организацию и активность. Такая перестройка хромосомного аппарата может быть направлена на повышение температурной резистентности клеток. Не исключено, что стресс-белки в физиологических условиях выполняют какие-то функции в ядре, цитоскелете, цитоплазматической мембране, а также регулируют активность ферментов. Биохимическая роль стресс-белков в клетках растений при холодовом стрессе изучена в недостаточной мере. В общем виде механизмы вхождения растительных клеток в состояние зимнего покоя могут быть представлены в виде схемы.

**Механизмы вхождения растительных
клеток в состояние зимнего покоя**



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Криобиология — сравнительно молодая отрасль знаний, сформировавшаяся на стыке биологии, медицины, химии, физической химии, а также ряда других дисциплин, базисом для которой послужили крупные достижения в области физики низких температур и успехи в развитии учения о криопротекторах. Развитие криобиологии претерпело значительную эволюцию, пройдя этапы от эмпирического подхода к разработке способов криоконсервации различных биологических объектов, к научно обоснованному подходу исследований процессов, протекающих под воздействием холода и при отогреве в объектах различного уровня организации животного и растительного происхождения. Благодаря этому выявлены общие закономерности действия низких температур и криопротекторов на клетки, ткани, органы и организм животных и человека. Успешному развитию криобиологии способствовали криобиохимические исследования, позволившие установить механизмы криоповреждений различных субклеточных структур: ядра митохондрий, рибосом, лизосом, а также изолированных биополимеров (каталитические и структурные белки, ДНК и т. д.) и биологических мембран, регулирующих процессы жизнедеятельности и их направленность. Это позволило выяснить состояние мембранного аппарата и белков цитоскелета, чувствительных к действию замораживания — оттаивания и к охлаждению на этапе предподготовки клеток к замораживанию. Изучение структурно-функционального состояния биомакромолекул, каталитических белков и структурных перестроек компонентов мембран под влиянием охлаждения позволило понять природу криолабильности и криорезистентности мультэнзимных комплексов, мембран и клеток в целом. Подобного рода исследования имеют практическую ценность, так как изменения активности ферментов при замораживании — отогреве служат чувствительным показателем нарушения структурных и метаболических сдвигов в клетках и тканях и позволяет использовать эту информацию для диагностики глубины криоповреждения с целью прогноза их жизнеспособности. Теперь становится ясным, что начальным звеном повреждения мембран под влиянием низких температур является их лабилизация, вызванная изменением физико-химического состояния липидов, подвергаю-

шихся фазовым переходам и латеральной сепарации, а также структурных белков приводящие к формированию дискретных зон и каналов утечки для молекул воды и ионов. Изменение ионного гомеостаза клетки нарушает ее основные метаболические циклы и дополняет дезинтеграцию ее составных элементов. Эти исследования позволили описать закономерности развития криповреждений на клеточном уровне и разработать новые принципы криозащиты клеток и тканей.

Поскольку процессы жизнедеятельности протекают в сложных биологических комплексах, весьма актуально использование биофизических методов исследования при изучении более тонких изменений, происходящих в белках и липидах клеток и модельных систем на различных этапах их подготовки к охлаждению, замораживанию и отогреву. К числу таких биофизических методов следует прежде всего отнести оптическую спектроскопию, ЭПР, ЯМР, рентгенографию и т. д. Применение метода позволило, например, с достаточной долей достоверности изучать процессы внутриклеточной кристаллизации и получать информацию о структурно-функциональном состоянии биоструктур в условиях сверхбыстрого охлаждения и применения витрифицирующих растворов, применение которых все больше внедряется в практику криобиологии.

Успешное развитие фундаментальных исследований способствовало разработке эффективных методов криоконсервации клеточных суспензий человека и животных. Системный подход к изучению механизмов криповреждения и криозащиты органов позволяет рассчитывать на прогресс и в этой области, который связан с преодолением развития тепловой ишемии тканей, разработкой составов перфузата, способов перфузии, решением проблемы равномерного охлаждения — отогрева тканей, в связи с чем перспективным следует считать физические факторы воздействия с помощью ультразвука, магнитного поля, СВЧ отогрева и т. д.

Важное значение приобретает криоиммунология, задачей которой является изучение иммунобиологических свойств деконсервированных клеток и тканей при трансплантации их реципиентам. Особое внимание последние годы уделяется криоконсервированию тканевых лимфоцитов, что связано с расширением показаний к их применению при лечении иммунодефицитных состояний различного генеза. Сейчас уже разработаны эффективные способы низкотемпературного консервирования тканевых лимфоцитов и лимфоцитов периферической крови. Исключительно важно для клинической практики также определение иммунологических свойств тканей после криоконсервации, поскольку это связано с изменением сроков приживания их в организме реципиента. Одним из промежуточных состояний живой материи между биозом — активной жизнедеятельностью и анабиозом — полной, но обратимой остановкой жизнедеятельности — является гипобиоз, изучение которого имеет большое значение как для познания закономерностей перехода одного состояния в другое, так и в связи с возможностью

использования этого состояния в экспериментальной и клинической медицине. Гипотермию широко применяют в целях подавления реакции организма или отдельных тканей на патологический раздражитель, в связи с чем ее можно рассматривать как универсальный прием повышения устойчивости к действию различных экстремальных факторов, в частности на травму, кислородное голодание, шок, кровопотери, ожоги и т. д. Сейчас разработаны и в ряде случаев применяются способы общей, чаще всего кранио-церебральной, гипотермии при лечении ишемической болезни сердца, инфаркте миокарда, шоке. Общая гипотермия также используется как фактор, обеспечивающий временное отключение кровотока, лимфо-ликворообращения, ограничивающее распространение в организме различных болезнетворных агентов, отравляющих веществ, токсинов и радиоактивных веществ. Выяснение механизмов холодового анабиоза и радиационного анабиоза исключительно важно для понимания основ жизнедеятельности организма и сущности жизни. Познание биологических закономерностей, лежащих в основе существования живой системы животного и растительного происхождения в условиях низких температур даст возможность направленно воздействовать на них с целью повышения холодостойкости, а в медицинском аспекте — создать экспериментальную модель анабиотического состояния высших животных.

Криофизиология — совсем молодая область криобиологии. Холодоустойчивость растений является наиболее сложной формой адаптации, поскольку появление ее связано не только с действием низких температур, но и с влиянием на эти организмы целого комплекса экзогенных условий, возникающих еще до наступления холодов, например с изменением светового дня, влажности и т. д. Молекулярные механизмы адаптации живых систем к холоду до конца не изучены. Известно, что в состоянии глубокого покоя у деревьев и кустарников происходит накопление большого количества сахаров, изменяется соотношение свободной и связанной воды, повышается водорастворяющая способность тканей вследствие повышения их осмотических и коллоидных свойств, что приводит к разносторонним структурным изменениям белков протоплазмы клеток, в нужном для повышения морозостойкости направлении. К числу универсальных механизмов холодоустойчивости принадлежит способность клеток животных растений и микроорганизмов изменять соотношение липидных фракций и их жирнокислотный состав, а также состояние цитоскелетных и цитозольных белков-регуляторов. Это важно для дальнейшего развития фундаментальных основ криобиологии, так как нормальное функционирование ферментных систем, ассоциированных с мембранами, существенное значение имеют уровень подвижности углеводородных цепей жирных кислот в липидах и состояние внутримембранных и транспортных и рецепторных белков плазматической мембраны. Сейчас становится ясным, что наряду с некоторыми приспособительными механизмами на изменение температуры окружающей среды, связанными с наследственно закрепленными

признаками, могут наслаиваться адаптивные механизмы, возникающие в организме под непосредственным воздействием температурных условий в период так называемой закалки, что используется в практических целях. Механизм холодоустойчивости животных и растений исключительно сложный и связан с физико-химическими и биологическими свойствами биообъектов, отличия у которых замечаются не только на уровне отдельных видов, но и в пределах одного и того же вида. Более того, отдельные клетки и ткани функционируют на основе специфических обменных процессов, обусловленных наследственными признаками и реагирующих на изменение условий внешней среды по-разному. Выяснение биологических закономерностей существования живых систем животного и растительного происхождения в условиях низких температур позволит в дальнейшем направленно воздействовать на повышение их холодоустойчивости.

Хотя материалы данной книги освещают теоретические, экспериментальные и прикладные аспекты криобиологии, играющие важную роль в сфере современной медицины, биологического производства, сельского хозяйства, в настоящее время рассматриваются как минимальная основа теоретической и прикладной криобиологии, так как бурный прогресс науки ежедневно вносит новые коррективы в понимание сущности механизмов криорезистентности и криолабильности.

Авторы благодарны за помощь, оказанную при подготовке монографии В. А. Бондаренко, А. Н. Гольцеву, А. К. Гулевскому, Ю. В. Калугину, Л. Г. Кулешовой, В. Д. Зинченко, А. В. Зинченко, А. Ю. Петренко, Е. В. Кудокоцевон, Л. П. Кравченко, Т. П. Говорухе, Э. И. Обозной, Г. Ф. Жегунову.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Актуальные проблемы криобиологии* / Под ред. А. М. Белоуса, Н. С. Пушкаря.— Киев: Наук. думка, 1981.— 605 с.
- Александров В. Я.* Клетки, макромолекулы и температура.— Л.: Наука, 1975.— 328 с.
- Бабийчук Г. А., Шифман М. И.* Нейрохимические процессы в центральной нервной системе при гипотермии.— Киев.: Наук. думка, 1989.— 150 с.
- Низкие температуры в медицине* / Под ред. К. С. Тернового, Л. Г. Гассанова.— Киев.: Наук. думка, 1988.— 279 с.
- Бекер М. Е.* Обезвоживание микробной биомассы — Рига: Зинатне, 1967 — 361 с.
- Белоус А. М., Бондаренко В. А.* Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев.: Наук. думка.— 1982.— 257 с.
- Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П.* Молекулярные механизмы криоповреждения мембран // — Итоги науки и техники / ВИНТИ. Сер. Биофизика.— 1978.— 9.— С. 80—114.
- Белоус А. М., Цветков Ц. Д.* Научные основы технологии сублимационного консервирования.— Киев.: Наук. думка, 1985.— 207 с.
- Белоус А. М., Гордисенко Е. А., Розанов Л. Ф.* Замораживание и криопротекция.— М.: Высш. шк., 1987.— 3.— 80 с.
- Белоус А. М., Грищенко В. И., Паращук Ю. С.* Криоконсервация репродуктивных клеток.— Киев.: Наук. думка, 1986.— 181 с.
- Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С.* Криоконсерванты.— Киев.: Наук. думка, 1979.— 198 с.
- Богач П. Г., Курский М. Д., Кучеренко Н. Е. и др.* Структуры и функции биологических мембран — Киев.: Виш. шк., 1981.— 336 с.
- Болдырев А. А.* Биологические мембраны и транспорт ионов.— М.: Изд-во Моск. ун-та., 1985.— 20 с.
- Голдовский А. М.* Анабиоз и его практическое значение.— Л.: Наука, 1986.— 167 с.
- Гулевский А. К., Бондаренко В. А., Белоус А. М.* Барьерные свойства биомембран при низких температурах.— Киев.: Наук. думка, 1988.— 205 с. Жизнь микробов в экстремальных условиях / Под ред. Д. М. Кашнера.— М.: Мир, 1987.— 519 с.
- Исков В. Г., Берестовский Г. Н.* Динамическая структура липидного бислоя.— М.: Наука, 1981.— 292 с.
- Клетки и температура среды* / Под ред. М. А. Хеноха.— М.: Изд-во иностр. лит., 1964.— 260 с.
- Криобиология и биотехнология* / Под ред. А. А. Цуцаевой и др.— Киев.: Наук. думка, 1987.— 213 с.
- Криоконсервирование клеточных суспензий* / Под ред. А. А. Цуцаевой.— Киев.: Наук. думка, 1983.— 240 с.
- Криопротекторы* / Под ред. Н. С. Пушкаря, М. И. Шраго, А. М. Белоуса и др.— Киев.: Наук. думка, 1978.— 201 с.
- Лозина-Лозинский Л. К.* Очерки по криобиологии.— Л.: Наука.— 1972.— 262 с.

Луговой В. И., Моисеев В. А. Влияние низких температур на растворимые ферменты // Итоги науки и техники / ВИНТИ Сер. Биофизика.— 1979.— 9.— С. 53—79.

Наук В. А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации.— Кишинев: Штиинца, 1991.— 197 с.

Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей.— Киев: Урожай, 1968.— 248 с.

Практическая криомедицина / Под ред. В. И. Грищенко, Б. П. Сандмирского.— Киев: Здоров'я, 1987.— 247 с.

Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цветков Ц. Д. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования.— Киев: Наук. думка, 1984.— 260 с.

Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Шткин Ю. А. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.— Киев: Наук. думка, 1977.— 238 с.

Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию.— Киев: Наук. думка, 1975.— 342 с.

Реакция клеток и их белковых компонентов на экстремальные воздействия / Под ред. М. А. Хеноха — М.; Л.: Наука, 1966.— 261 с.

Самыгин Г. А. Причины вымерзания растений.— М.: Наука, 1974.— 341 с.

Синьков В. В. Структура одноатомных жидкостей, воды и водных растворов электролитов.— М.: Наука, 1976.— 255 с.

Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения.— М.: Изд-во иностр. лит., 1963.— 272 с.

Терехов Н. Г., Петров М. М. Клиническое применение консервированных эритроцитов.— Киев: Здоров'я, 1983.— 142 с.

Угаров Г. С. Эколого-физиологические аспекты адаптации организмов к низким положительным температурам.— Якут. кн. изд-во, 1988.— 203 с.

Ушатинская Р. С. Скрытая жизнь и анабиоз.— М.: Наука, 1990.— 180 с.

Франкс Ф. Вода и водные растворы при температурах ниже 0 °С.— Киев: Наук. думка, 1985.— 386 с.

Холодовой стресс и биологические системы / Под ред. А. А. Цунаевой.— Киев: Наук. думка, 1991.— 172 с.

Хочачка Д., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации к холоду.— Новосибирск: Наука, 1975.— 148 с.

Хочачка Д., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация.— М.: Мир, 1988.— 568 с.

Шумаков В. И., Штенгольд Е. Ш., Онищенко И. А. Консервация органов.— М.: Медицина, 1975.— 249 с.

Эволюционные аспекты гипобноза и зимней спячки / Под ред. Е. М. Крепса.— Л.: Наука, 1986.— 144 с.

Юрченко Т. И., Козлова В. Ф., Скорняков Б. А. и др. Влияние криопротекторов на биологические системы.— Киев: Наук. думка, 1989.— 238 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	
Глава 1. История и задачи криобиологии	
Глава 2. Концепции, теории и факторы криповреждений биообъектов	
Криповреждения клеток при медленном замораживании	
Криповреждения клеток при быстром замораживании	
Глава 3. Значение фракции воды в температурной стабилизации биополимеров, клеток и тканей	
Глава 4. Структура и физико-химические свойства льдов	
Глава 5. Замораживание биообъектов: механизмы и динамика процессов кристаллообразования	
Механизмы кристаллизации	
Фазовые диаграммы (диаграммы состояния)	
Глава 6. Криопротекторы и криоконсерванты	
Криопротекторы	
Криоконсерванты	
Глава 7. Криобиохимия ферментов и ферментных систем	
Влияние низких температур на изолированные ферменты	
Криочувствительность ферментов в составе мембран и клеток	
Глава 8. Низкотемпературные изменения плазматических мембран	
Структура, функции и модели мембран	
Модификация мембранных белков	
Модификация липидов мембран	
Температурно-зависимые изменения мембран внутриклеточных органелл	
Температурный шок клетки	
Методы исследования мембран	
Глава 9. Криоконсервация клеточных суспензий человека и животных	
Криоконсервация клеток крови	
Криоконсервация иммунокомпетентных клеток	
Криоконсервация репродуктивных клеток животных	
Низкотемпературная консервация микроорганизмов и низших эукариот	
Методы оценки жизнеспособности деконсервированных клеток	
Методы отогрева замороженных биообъектов	

	Глава 10. Консервация тканей и органов	271
	Гипотермическая консервация тканей	272
	Гипотермическая консервация органов	285
	Низкотемпературная консервация органов	293
	Аппаратура для консервации органов	296
	Методы оценки жизнеспособности консервируемых органов и тканей	299
	Глава 11. Основы сублимационной консервации	304
	Замораживание биоматериала	304
	Сублимационная сушка	307
	Технологический процесс сублимационной консервации	308
	Аппаратура и оборудование сублимационной сушки	313
	Глава 12. Применение охлаждения и низких температур в экспериментальной и клинической медицине	315
3	Общая гипотермия тела	316
5	Общее охлаждение (замерзание) организма в естественных условиях	326
32	Местная гипотермия тканей и органов	329
41	Локальная криотерапия тканей и органов	332
50	Гипотермическая и криогенная техника в медицине	352
	Глава 13. Естественный ана- и гипобиоз	364
	Анабиоз	365
52	Мезобиоз	368
63	Гипобиоз	370
	Зимняя спячка (гибернация)	376
	Глава 14. Сохранение генофонда растительных объектов	398
72	Консервация репродуктивных клеток растений	398
85	Криоконсервация семян	400
88	Механизмы морозоустойчивости растений	403
88	Заключение	422
88	Рекомендуемая литература :	426
108		
112		
114		
117		
122		
122		
134		
151		
168		
184		
190		
194		
200		
211		
225		
251		
266		
269		

CONTENTS

Prediction	3
Chapter 1. History and tasks of cryobiology	5
Chapter 2. Conceptions, theories and factors of bioobject cryoinjuries	32
Cell cryoinjuries under slow freezing	41
Cell cryoinjuries under rapid freezing	50
Chapter 3. Significance of water fraction in temperature stabilization of biopolymers, cells and tissues	52
Chapter 4. Structure and physico-chemical ice properties	63
Chapter 5. Bioobject freezing	72
Crystal formation mechanisms	72
Phase diagrams	85
Chapter 6. Cryoprotectants and cryopreservatives	88
Cryoprotectants	88
Cryopreservatives	108
Chapter 7. Enzyme cryobiochemistry and enzyme systems	112
Effect of low temperatures on isolated enzymes	114
Enzyme cryosensitivity in membranes and cells	117
Chapter 8. Low-temperature changes in plasma membranes	122
Membrane structure, functions and models	122
Membrane protein modification	134
Membrane lipid modification	151
Temperature dependent changes in membranes of intracellular organelles	168
Cell temperature shock	184
Methods of membrane study	190
Chapter 9. Cryopreservation of human and animal cell suspension	194
Blood cell cryopreservation	200
Immunocompetent cell cryopreservation	211
Cryopreservation of animal reproductive cells	225
Low-temperature preservation of microorganisms and eucariots	251
Methods of evaluation of thawed cells viability	266
Methods of thawing of frozen bioobjects	269

Chapter 10. Preservation of tissues and organs	271
Hypothermic tissue preservation	272
Hypothermic organ preservation	285
Low — temperature of plants frost resistance	293
Equipment for preserving organs	296
Methods of viability evaluation of preserved organs and tissues	299
Chapter 11. Bases of sublimation preservation	304
Freezing of biomaterial	304
Sublimation drying	307
Technology of sublimation preservation	308
Apparatuses and equipment of sublimation drying	313
Chapter 12. Application of low temperature cooling in experimental and clinical medicine	315
General body hypothermia	316
General cooling (freezing) of organism under natural conditions	326
Local tissues and organs hypothermia	329
Local tissues and organs chyotherapy	332
Hypothermic and cryogenic technique in medicine	332
Chapter 13. Natural anabiosis and hypobiosis	364
Anabiosis	365
Mesobiosis	368
Hypobiosis	370
Hibernation	376
Chapter 14. Preservation of gene fund of plants	398
Preservation of plant reproductive cells	398
Mechanisms of plants frost resistance	400
Hypotheses of stress — proteins synthesis induction in cells	403
Conclusion	422
Recommended literature	429

Наукове видання
Національна академія наук України
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

Білоус Аполлон Максимович
Гриценко Валентин Іванович

КРІОБІОЛОГІЯ

(Російською мовою)
Київ, видавництво «Наукова думка»

Оформлення художника *Г. М. Фінька*
Художній редактор *Г. О. Сергєєв*
Технічний редактор *С. Г. Максимови*
Коректори *Л. Г. Бузіашвілі, Є. О. Міхалець*

Здано до набору 02.11.93. Підп. до друку 28.01.94.
Формат 60×90/16. Папір друк. № 2. Вис. друк. ум.
друк. арк. 27,0. ум. фарбо-відб. 27,0. Обл.-вид. арк. 30,72.
Зам. 3—2620.

Видавництво «Наукова думка», 252601 Київ 4, вул. Те
рещенківська, 3.

Віддруковано з матриць Головного підприємства респу-
бліканського виробничого об'єднання «Поліграфкнига»,
252057 Київ 57, вул. Довженка, 3 в Жовківській книжко-
вій друкарні. 292310 Жовква, Львівської обл., вул. Васи-
ланська, 8. Зам. 1.

