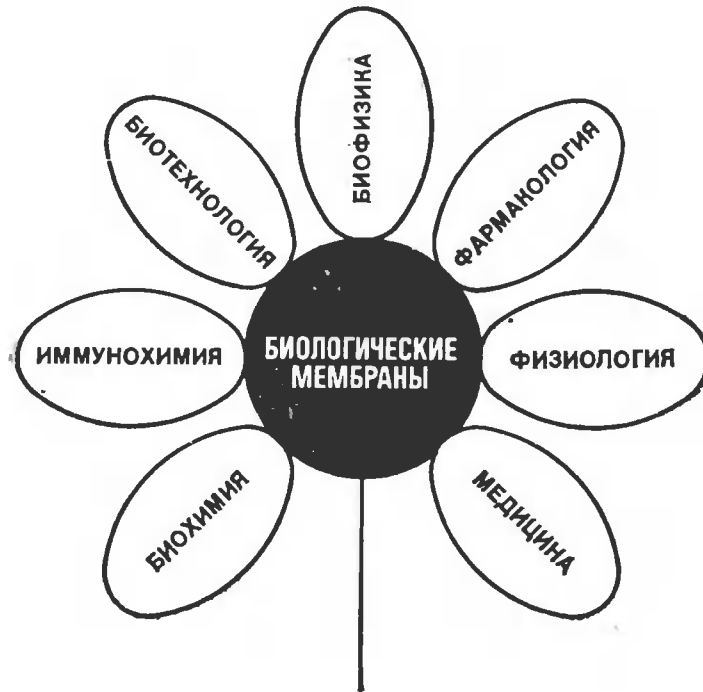


# БИОХИМИЯ МЕМБРАН

А. М. БЕЛОУС  
Е. А. ГОРДИЕНКО  
Л. Ф. РОЗАНОВ

## Замораживание и криопротекция





# **БИОХИМИЯ МЕМБРАН**

Под редакцией  
А.А. Болдырева

**Книга 3**

А. М. БЕЛОУС  
Е. А. ГОРДИЕНКО  
Л. Ф. РОЗАНОВ

# Замораживание и криопротекция

Допущено Министерством высшего  
и среднего специального образования СССР  
в качестве учебного пособия для студентов  
биологических и медицинских специальностей  
высших учебных заведений



МОСКВА  
«ВЫСШАЯ ШКОЛА» 1987

ББК 28.05  
Б 63  
УДК 577.1

**Рецензенты:**

кафедра молекулярной и прикладной биофизики Харьковского государственного университета имени А. М. Горького (зав. кафедрой д-р биол. наук, проф. В. В. Лемешко);  
д-р физ.-мат. наук С. И. Аксенов (биологический факультет Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова)

**Биохимия мембран: Учеб. пособие для биол. и мед. спец.**  
Б 63 вузов/Под ред. А. А. Болдырева. Кн. 3. А. М. Белоус, Е. М. Гордиенко, Л. Ф. Розанов. Замораживание и криопротекция. — М.: Высш. шк., 1987. — 80 с: ил.

В пособии изложены основные понятия и современные данные о влиянии пониженных (до 0°C) и низких (до — 196°C) температур на мембранные структуры различного уровня организации. Описаны факторы, влияющие на структурно-функциональную целостность мембран, механизмы термального шока. Подробно рассмотрены способы и технические средства замораживания и криопротекции мембранных структур, их отогрева после замораживания. В специальной части даны методики замораживания — отогрева различных мембранных структур, включая субклеточные органеллы и клетки в связи с их консервацией и длительным хранением.

Б 2007020000(4309000000)—442 19—87  
001(01)—87

ББК 28.05  
57.04

**Учебное издание**

**Аполлон Максимович Белоус,  
Евгений Александрович Гордиенко,  
Леонид Федорович Розанов**

**ЗАМОРАЖИВАНИЕ И КРИОПРОТЕКЦИЯ**

Зав. редакцией А. Г. Гаврилов. Редактор А. С. Орлова. Мл. редакторы И. М. Павлова, Е. И. Попова. Художественный редактор Т. А. Колейкова. Художник В. Н. Хомяков. Технический редактор Т. Н. Полунина. Корректор С. К. Завьялова.

ИБ № 6417

Изд. № Е-535. Сдано в набор 06.04.87. Подп. в печать 27.07.87. Т-15645. Формат 60×90<sup>1/16</sup>. Бум. тип. № 1. Гарнитура литературна. Печать высокая. Объем 5 усл. печ. л. 5,37 усл. кр.-отт. 5,14 уч.-изд. л. Тираж 8500 экз. Зак. № 1383. Цена 15 коп.

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул., д. 29/14.

Московская типография № 8 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 101898, Москва, Центр, Хохловский пер., 7.

© Издательство «Высшая школа», 1987

---

# Предисловие

---

В настоящее время непрерывно возрастает роль мембранологии как основы повышения эффективности технологических процессов в различных областях народного хозяйства и методов лечения в медицине. Наука о мембранах является важной составной частью и молодой области науки — *криобиологии*, в задачи которой входит разработка способов длительного консервирования биологических объектов в жизнеспособном состоянии путем их глубокого замораживания. Большинство представлений о механизмах криоповреждения и криозащиты клеток связано с биологическими мембранами как наиболее чувствительному к низкотемпературному воздействию компоненту консервируемых биоматериалов. Поэтому представляется оправданным и целесообразным выпуск данного пособия в серии «Биохимия мембран».

В первой части книги изложены наиболее известные гипотезы и теоретические представления о воздействии глубокого охлаждения и других факторов, сопровождающих низкотемпературное консервирование, на сохранность консервируемых клеток. Во второй части кратко описаны конкретные способы криоконсервирования некоторых биологических объектов.

Это первая и поэтому не лишенная недостатков попытка создать учебное пособие на данную тему. Оно может быть полезным для студентов — биологов, медиков, аспирантов, а также молодых ученых, занимающихся разработкой способов низкотемпературного консервирования биологических объектов.

Авторы

# Криповреждение и криозащита клеточных структур

# 1

## Глава 1. Физические процессы, протекающие при замораживании — отогреве растворов и биологических суспензий

Процесс низкотемпературного консервирования клеточной суспензии схематически можно представить в виде нескольких последовательных стадий:

замещение физиологической среды, которая в норме окружает клетки, криозащитным раствором (обычно гипертоническим) и экспозиция в нем клеток в течение определенного промежутка времени при постоянной температуре (от нескольких секунд до нескольких часов);

глубокое охлаждение взвеси клеток в криозащитном растворе по определенной программе (обычно до температуры  $-(80-196)^{\circ}\text{C}$ );

длительное хранение биологического материала при постоянной низкой температуре (в холодильнике, парах жидкого азота или непосредственно в жидком азоте);

отогрев объекта по заданному режиму до положительной (выше  $0^{\circ}\text{C}$ ) температуры;

замещение криозащитного раствора физиологически индифферентной средой.

Почему для длительного сохранения биологических объектов в обратимом состоянии используют низкие температуры? Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо заметить, что скорость большинства протекающих в природе процессов экспоненциально понижается с понижением температуры и пропорциональна так называемому *активационному множителю*  $\exp(-NU_a/RT)$ , где  $U_a$  — энергия активации процесса,  $N$  — число Авогадро,  $R$  — универсальная газовая постоянная,  $T$  — абсолютная температура. Как правило, стабильное состояние системы соответствует минимуму энергетического потенциала  $U$  и отделено от другого стабильного состояния *энергетическим барьером* (рис. 1).

При флуктуационном переходе из состояния  $A$  в состояние  $B$  система должна преодолеть энергетический барьер  $U_0-U_A$ , а

при обратном переходе — из состояния  $B$  в состояние  $A$  — энергетический барьер  $U_0 - U_B$ . Переход  $A \rightarrow B$  может соответствовать (при подходящем выборе параметра  $x$ ) и переходу атома из одной молекулы в другую (при химической реакции), и образованию зародыша кристаллов в переохлажденной жидкости, и образованию макроскопической поры в мембране, подвергающейся растяжению. Вероятность ( $W$ ) перехода  $A \rightarrow B$  связана с энергией активации  $U_0 - U_A$  следующим образом:

$$W \sim e^{-N(U_0 - U_A)/RT},$$

т. е. резко падает с понижением абсолютной температуры. Это резкое падение скорости протекания химических реакций и всех других физико-химических процессов активационного типа с понижением температуры обуславливает возможность длительного хранения биомембран или клеток при низких температурах.

Среднее время, за которое осуществляется переход  $A \rightarrow B$ , пропорционально множителю  $e^{N(U_0 - U_A)/RT}$ , т. е. экспоненциально возрастает с понижением температуры. Следовательно, если достаточно быстро (со скоростью  $\dot{T}$ , удовлетворяющей условию  $|\dot{T}| \gg \frac{T_0 - T_1}{\langle t \rangle (T_0)}$ ) охладить систему, которая в исходный момент времени находилась в состоянии  $A$  (см. рис. 1), от температуры  $T_0$  до температуры  $T_1$ , то переход  $A \rightarrow B$  вообще не успеет произойти, хотя он и является энергетически выгодным. Здесь  $T_1$  — температура, при которой время перехода из состояния  $A$  в состояние  $B$  увеличивается до значений, превышающих продолжительность эксперимента.

Накопленные к настоящему времени многочисленные данные по низкотемпературному консервированию биологических суспензий показывают, что процесс длительного хранения биологических объектов при низкой температуре как таковой не оказывает существенного влияния на сохранность клеток и мембран после замораживания — оттаивания. Поэтому проблему длительного консервирования биологических объектов в жизнеспособном состоянии можно было бы считать решенной, если можно было бы быстро (за время, в течение которого состояние системы не успеет отклониться от начального состояния) охладить их, например, до температуры жидкого азота ( $-196^\circ\text{C}$ ), а затем так же быстро отогреть до исходной температуры.

Исходя из подобных соображений в 50—60-е годы американский криобиолог Б. Дж. Льюйет и его сотрудники усиленно

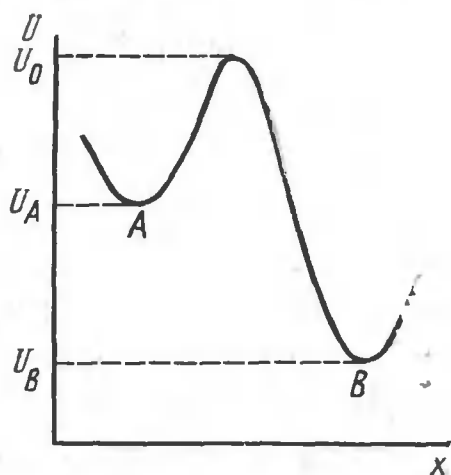


Рис. 1. Зависимость энергетического потенциала системы от параметра  $x$ , характеризующего ее состояние (объяснение см. в тексте)



изучали возможность обеспечения структурно-функциональной сохранности клеток с помощью так называемого *сверхбыстрого охлаждения*, осуществляемого, например, диспергированием мелких капель клеточной суспензии непосредственно в жидкий азот, распылением на сильно охлажденную металлическую пластину и т. п. Теоретическая оценка показывает, что для стабилизации исходной структуры водного раствора (т. е. *стеклования*) скорость его охлаждения должна выражаться величиной не менее  $10^4$  °C/с. В ряде случаев действительно удавалось добиться частичного стеклования в вязких растворах и клеточных суспензиях в процессе сверхбыстрого охлаждения. Однако в процессе отогрева, особенно при температурах, близких к температуре плавления, метастабильная стеклообразная фаза, как правило, переходила в термодинамически стабильную, кристаллическую, так что структура раствора не сохранялась в неизменном состоянии на протяжении всего цикла охлаждения — отогрев.

В настоящее время способ сверхбыстрого охлаждения в силу указанной причины и других недостатков практически не применяется. Не исключено, однако, что метод сверхбыстрого охлаждения может оказаться приемлемым для низкотемпературного консервирования единичных клеток, т. е. в тех случаях, когда объем образцов чрезвычайно мал, ибо по мере уменьшения объема образца вероятность флуктуационного зарождения кристаллов в нем также уменьшается, а склонность к переохлаждению, наоборот, увеличивается.

При всех способах, которые сейчас применяют на практике для низкотемпературного консервирования биологических объектов, в них (на перечисленных выше этапах) происходят глубокие изменения, в том числе кардинальная перестройка структуры системы, изменение ее агрегатного состояния, состава и других физико-химических свойств. Основная масса повреждений клеточных структур в период замораживания прямо или косвенно связана с образованием *кристаллов льда*. Для того чтобы в первом приближении оценить, в каких крайне неблагоприятных условиях оказываются клетки (мембраны) при осуществлении процедуры их низкотемпературного консервирования, необходимо кратко рассмотреть некоторые физико-химические процессы, протекающие в консервируемой клеточной суспензии на этапе замораживания.

Обычно наиболее значительной по объему составной частью криозащитной среды является водный раствор так называемого *криопротектора*, который в жидком состоянии смешивается с растворителем в произвольных отношениях, но полностью вытесняется кристаллами льда в жидкие межкристаллические каналы при фазовом переходе. В настоящее время в качестве криопротекторных веществ чаще других применяют *глицерин* и *диметилсульфоксид*. Кроме криопротектора и воды криозащитные среды, как правило, содержат в сравнительно небольших коли-

чествах соли (в частности,  $\text{NaCl}$ ), а также другие вещества (компоненты буферных сред, сред для культивирования данного типа клеток *in vitro* и т. д.).

На рис. 2 и 3 приведены диаграммы плавления смесей глицерина и диметилсульфоксида с водой, т. е. графически изображена зависимость температуры плавления этих смесей от концентрации криопротектора в растворе. Точка 0 представляет собой точку плавления чистого льда. Как видно из диаграмм плавления, увеличение исходной концентрации глицерина (ди-

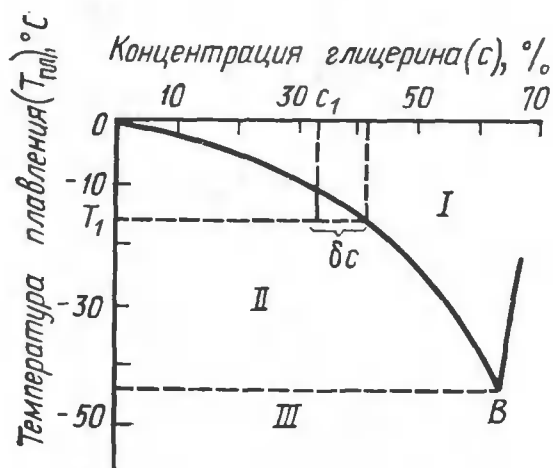


Рис. 2. Диаграмма плавления водного раствора глицерина

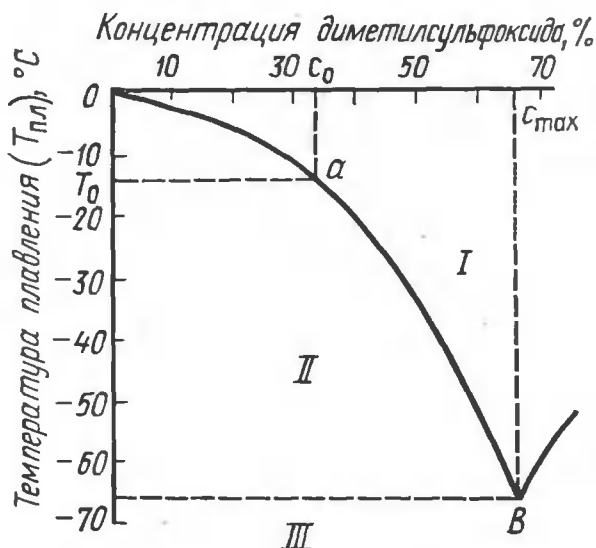


Рис. 3. Диаграмма плавления водного раствора диметилсульфоксида (объяснение см. в тексте)

метилсульфоксида) от 0 до 66,7% (70%) приводит к понижению температуры плавления раствора от 0 до  $-46,5^{\circ}\text{C}$  ( $-66^{\circ}\text{C}$ ). Точка  $B$  называется *эвтектической* — ниже температуры, соответствующей этой точке (область  $III$ ), раствор целиком находится в твердом состоянии. В области  $I$  весь раствор находится в жидком состоянии; в области  $II$  кристаллы льда сосуществуют с жидким раствором глицерина (диметилсульфоксида) в соответствующей концентрации.

На рис. 3 изображен процесс затвердевания (при медленном охлаждении) двухкомпонентного раствора, исходный состав которого соответствует концентрации  $c_0$  (рис. 3). Когда по мере охлаждения температура указанного раствора снизится до значения  $T_0$ , в нем (если время выдерживания раствора при этой температуре достаточно велико) возникнут кристаллы льда. В процессе дальнейшего охлаждения количество льда будет увеличиваться, а концентрация криопротектора (и других растворенных в небольших количествах веществ) в жидкой фазе, сосуществующей с кристаллами, — повышаться. Следовательно, точка, соответствующая жидкофазному состоянию, будет перемещаться вдоль кривой плавления  $a-B$ . При температуре  $T_B$

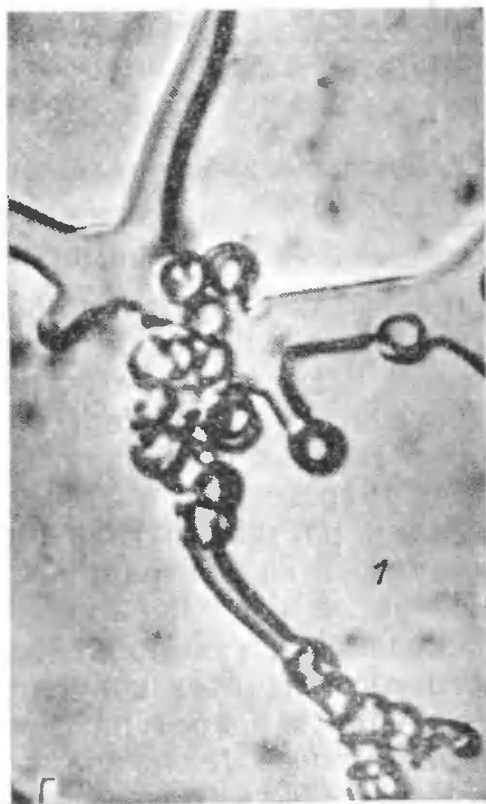
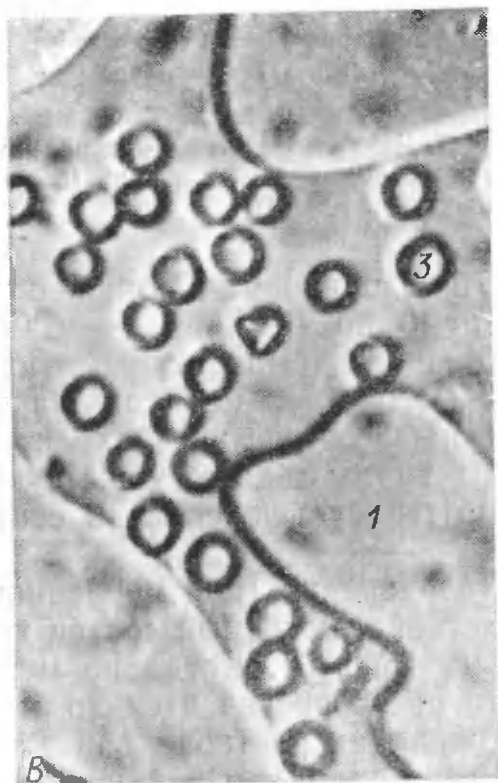
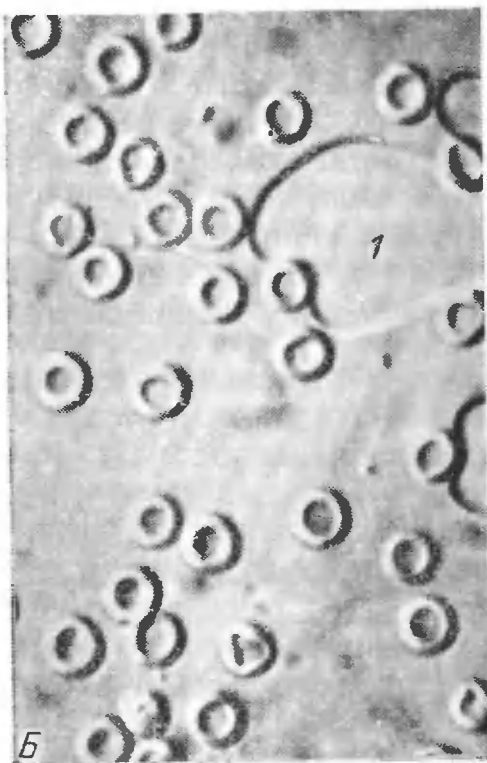
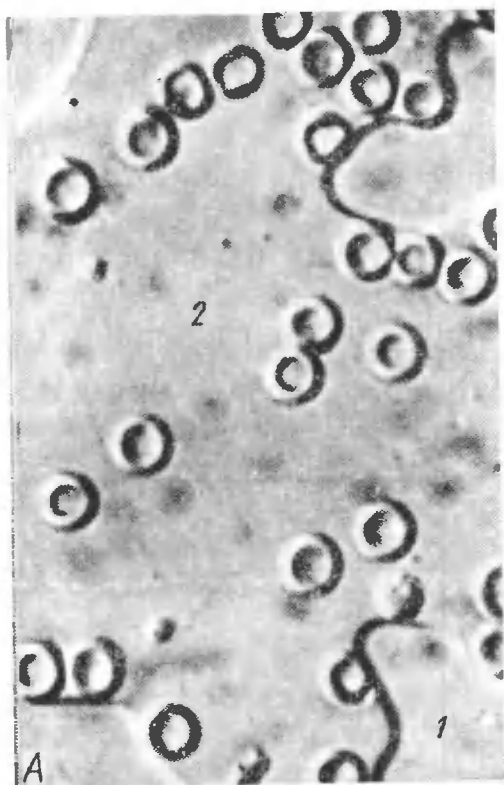


Рис. 4. Отодвигание эритроцитов человека растущими кристаллами льда в жидкие межкристаллические каналы (А — Г):  
 1 — кристаллы льда, 2 — жидкие каналы, 3 — эритроциты

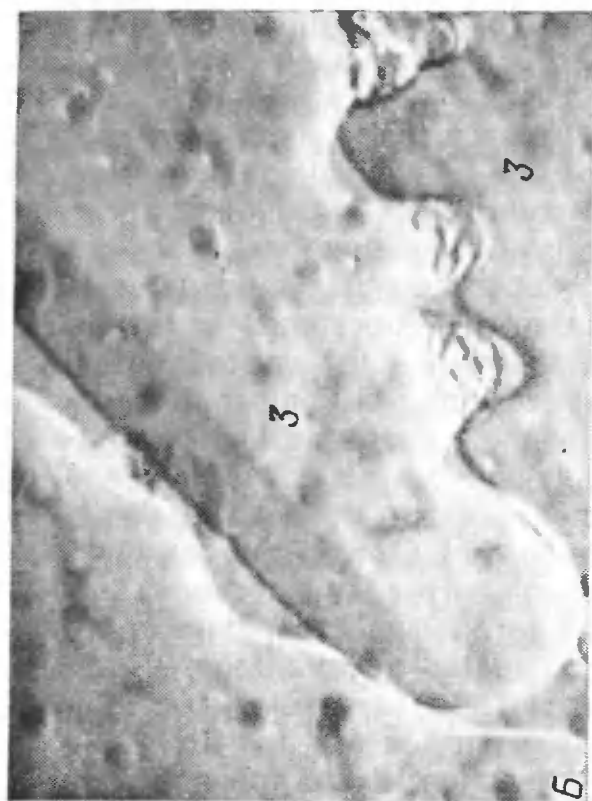
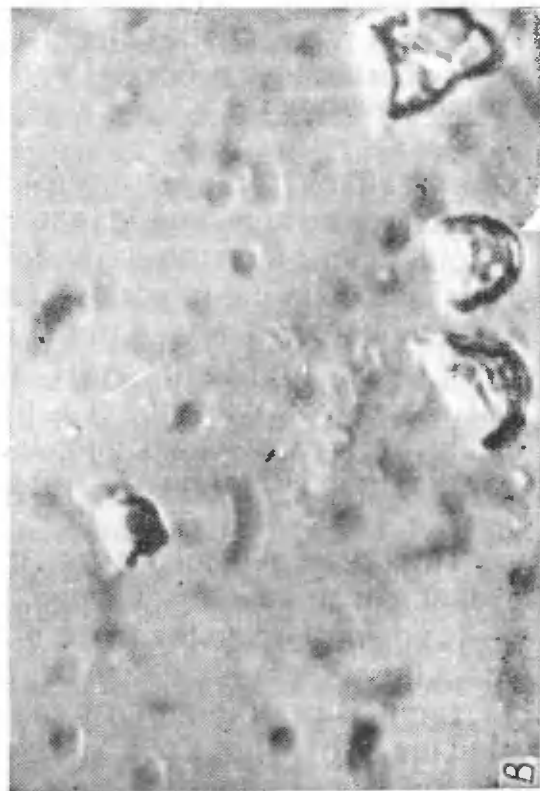


Рис. 5. Деформация клеток перитонеального экссудата мыши при медленном замораживании до  $-10^{\circ}\text{C}$  (А, Б) и восстановление их формы при отогреве (Б):  
1 — клетки, 2 — жидкие каналы, 3 — кристаллы льда

раствор затвердеет полностью, и кристаллы чистого льда, образовавшиеся выше эвтектической точки, будут сосуществовать со смесью более мелких кристаллов, соответствующей эвтектическому составу  $c_{\text{мах}}$ .

Экспериментально установлено, что кристаллы льда в охлаждаемой клеточной суспензии образуются первоначально вне клеток. Тот факт, что внеклеточное кристаллообразование пред-

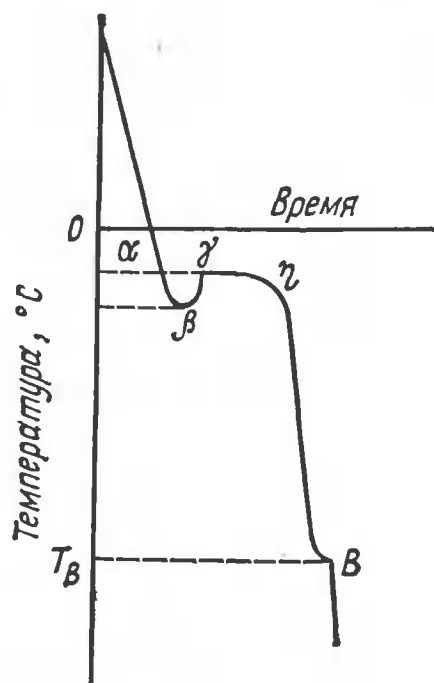


Рис. 6. Типичная термограмма замораживания клеточной суспензии

шествует образованию льда внутри клеток, объясняют отсутствием в цитоплазме гетерогенных центров кристаллизации и способностью плазматической мембраны предотвращать проникновение внеклеточного льда даже в переохлажденную (до определенного предела) клетку. По определению, если при температуре  $T_1$  концентрация растворенных внутри клетки веществ равна  $c_1$ , то недонасыщение цитоплазмы по отношению ко внеклеточному раствору имеет величину  $\delta c$  (см. рис. 2).

Из-за непрерывного превращения воды в лед концентрация растворенных в жидкой фазе веществ по мере охлаждения кристаллизующейся клеточной суспензии повышается. Подавляющее количество клеток, как правило, отодвигается гранями растущих кристаллов льда в жидкие области (каналы) (рис. 4). Часть

клеток захватывается внутрь кристаллов. В обоих случаях повышается осмотическое давление внеклеточной жидкой среды по отношению к внутриклеточной жидкой фазе и нарушается термодинамическое равновесие между клеткой и окружающей ее жидкой средой, что приводит к обезвоживанию и деформации клеток (рис. 5). При этом изменяются ионная сила раствора, омывающего клетки, его рН, вязкость и другие физические свойства, что, в свою очередь может повлечь за собой денатурацию, коагуляцию и выслаивание вне- и внутриклеточных белков.

Типичная термограмма процесса замораживания клеточной суспензии приведена на рис. 6. Почти горизонтальная площадка  $\gamma$ — $\eta$  возникает вследствие выделения скрытой теплоты кристаллизации на движущейся границе раздела фаз лед — жидкий раствор. В стационарном случае ее величина равна убыли тепла за счет его отвода от границы раздела фаз через кристалл в хладоагент. Вследствие этого эффекта градиент температуры в области жидкой фазы, где находится точечный датчик температуры, отсутствует фактически до подхода к нему фронта кри-

сталлизации. Чем ближе датчик температуры расположен к стенке контейнера, через которую осуществляется теплоотвод от образца, тем короче оказывается горизонтальная площадка  $\gamma-\eta$ . В предельном случае, когда размер датчика температуры соизмерим с характерным размером образца, горизонтальная площадка на термограмме превращается в излом. Размер и форма кристаллов льда, образующихся при замораживании, чрезвычайно разнообразны и зависят как от условий охлаждения, так и от свойств самого раствора. Это иллюстрируют рис. 7 и 8.

Участок термограммы  $\alpha-\beta$  (см. рис. 6) соответствует переохлаждению системы до начала кристаллизации в ней; оно необходимо для того, чтобы в растворе образовались кристаллы льда за время, сравнимое с временем эксперимента. Исследуя влияние переохлаждения на клетки, П. Мейзур (1967) установил, что само по себе переохлаждение до субнулевых температур (без кристаллизации вне- и внутриклеточной воды) не приводит к повреждению клеток (рис. 9).

Эксперимент и теория показывают, что с ростом степени переохлаждения раствора вероятность и скорость его кристаллизации вначале повышаются, достигают максимума (при определенном значении переохлаждения), а затем быстро снижаются.

Образование кристаллов льда в водном растворе происходит за счет случайных тепловых флуктуаций. Возникновение в переохлажденной жидкости очень мелких «кристаллических зародышей» связано с образованием границы раздела двух фаз и по этой причине приводит к проигрышу в поверхностной энергии. Однако, с другой стороны, переход системы в кристаллическую фазу приводит к выигрышу в ее объемной энергии. При увеличении размера кристаллического зародыша поверхностная энергия увеличивается медленнее, чем уменьшается объемная энергия. Поэтому, если кристаллический зародыш путем флуктуации достиг определенного критического размера, то энергетически выгодным оказывается его самопроизвольный рост. По мере увеличения степени переохлаждения величина критического радиуса становится все меньше и образование зародышей облегчается. В дальнейшем вероятность зародышеобразования снижается, что обусловлено высокими значениями вязкости раствора, особенно в области пониженных температур, соответствующей большим переохлаждениям. Именно благодаря этому обстоятельству, которое приводит к снижению (практически до нуля) скорости роста кристаллов, при достаточно быстром охлаждении вязкие жидкости «не успевают» закристаллизоваться, частично стекляясь.

Излом в точке  $B$  на термограмме (см. рис. 6) обусловлен выделением тепла при затвердевании областей, в которых концентрация раствора соответствует эвтектической точке. Чем выше исходная концентрация охлаждающего раствора, тем

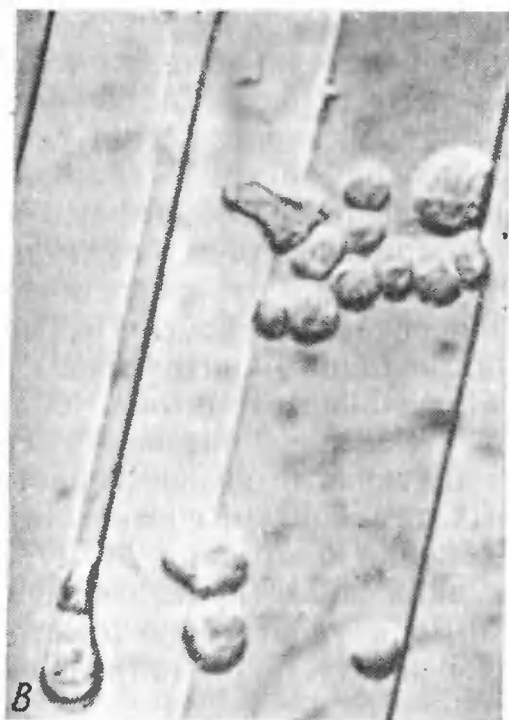
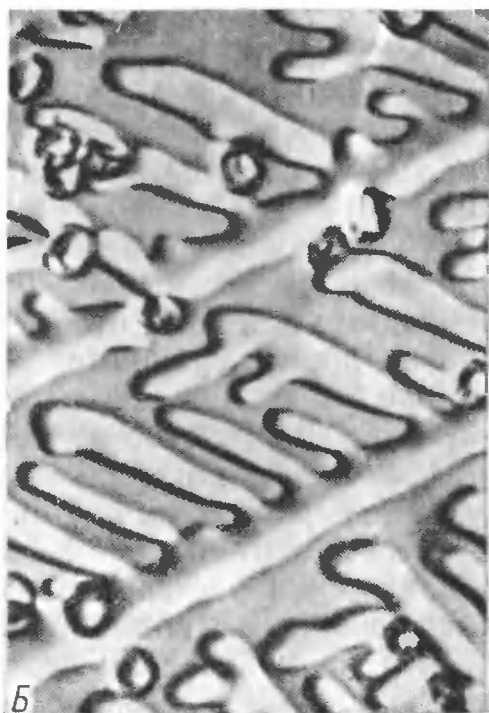
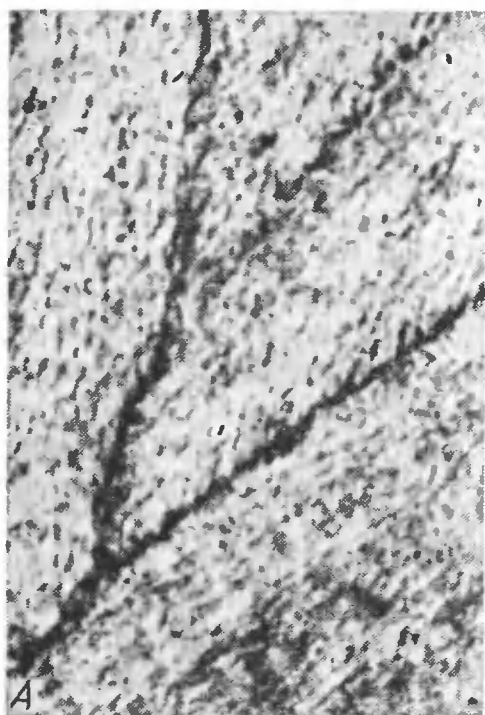


Рис. 7. Типы кристаллических структур, образующихся при различных скоростях замораживания клеточных суспензий. А — 60 °С/мин; Б — 10 °С/мин; В — 1 °С/мин



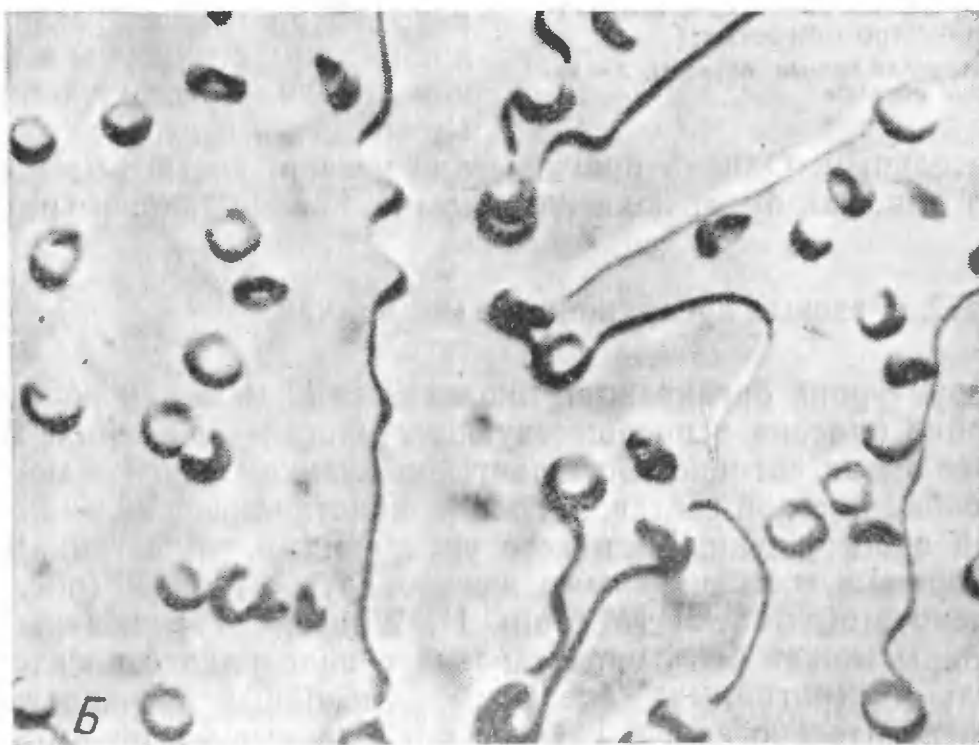
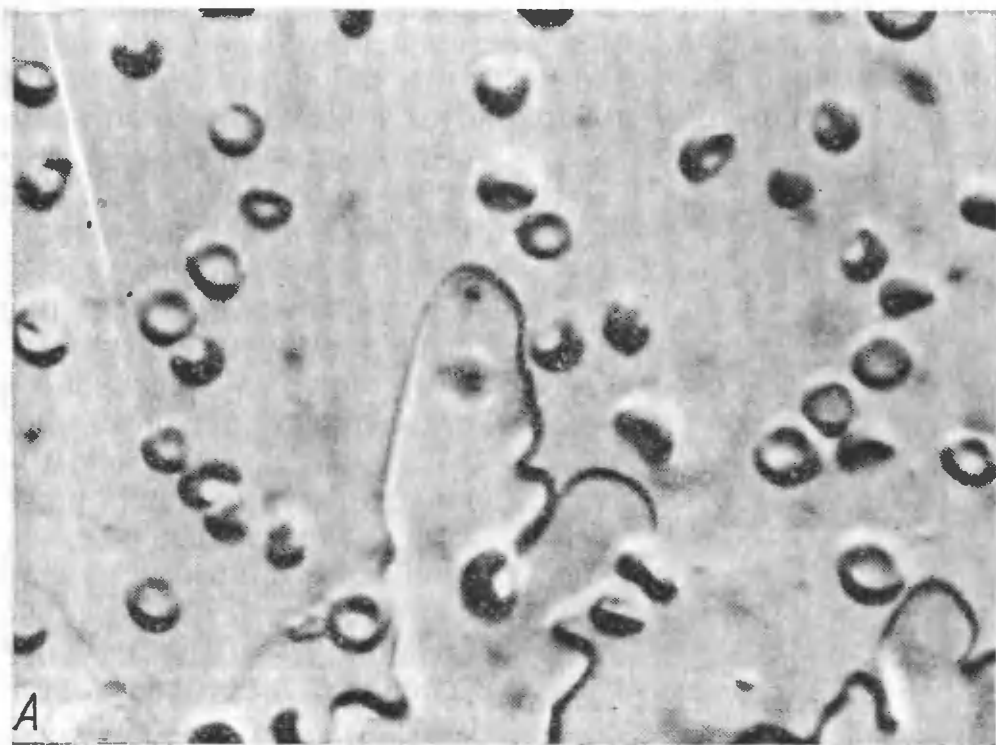


Рис. 8. Рост дендрита (А, Б) в суспензии эритроцитов в 20%-ном растворе глицерина при скорости охлаждения 1 °С/мин



больший его объем будет затвердевать в эвтектической точке и тем длиннее будет площадка при эвтектической температуре  $T_v$ .

Реально образующиеся в растворе при замораживании кристаллы и замерзший раствор в целом являются *метастабильными системами*. Поэтому мелкокристаллическое тело со временем

становится крупнокристаллическим вследствие роста более крупных кристаллов за счет мелких. Этот процесс называется *рекристаллизацией* и с повышением температуры протекает быстрее. Некоторое представление о рекристаллизации дает рис. 10, на котором видна динамика укрупнения размеров кристаллов льда.

Таким образом, в процессе низкотемпературного консервирования клетки оказываются в условиях, настолько далеких от тех, в которых они обычно функционируют, и подвергаются воздействию такого количества неблагоприятных факторов, что на первый взгляд сохранение их структуры и функции после замораживания — хранения — отогрева кажется

удивительным. Однако практические успехи, достигнутые криобиологами, как будет показано дальше, вполне закономерны.

## Глава 2. Фазовые превращения в мембранах

Структурная организация биологических мембран достаточно подробно описана в предшествующих книгах этой серии. В последнее время активно обсуждается «домённая модель» мембраны, основу которой составляет жидкокристаллический липидный бислой с погруженными в него скоплениями, пластинками и платформами, не связанными жестко друг с другом (рис. 11). Согласно этой модели (М. Jain, Н. Whitte, 1977) поверхность мембраны может быть представлена в виде ряда относительно стабильных (ригидных) платформ, способных передвигаться друг относительно друга. Такие упорядоченные платформы (домены) могут состоять из одного или разнородных компонентов (например, белков и липидов), причем они разделены полями относительно жидких липидов или другими разупорядоченными участками мембранного бислойа. Как упорядоченные (ригидные), так и разупорядоченные участки обладают характерными для

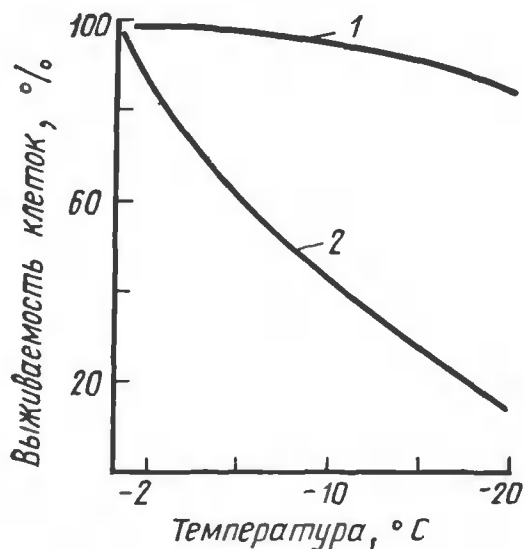


Рис. 9. Выживаемость клеток культуры ткани почки китайского хомячка, охлажденных со скоростью 1,6 °C/мин до различных температур и быстро отогретых:

1 — переохлажденные образцы, 2 — замерзшие образцы

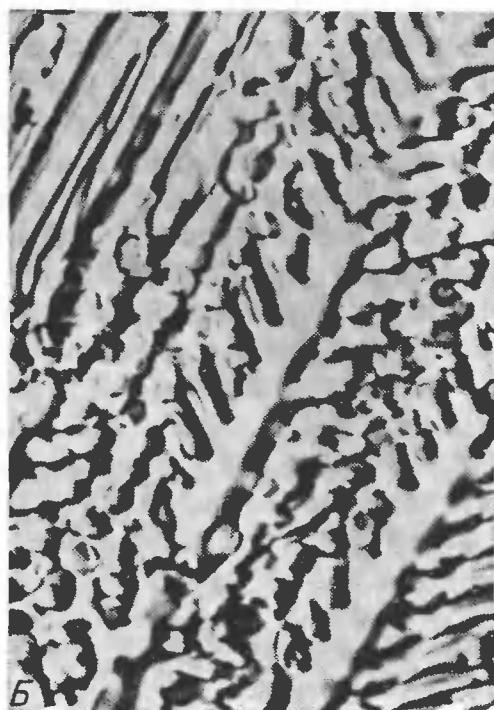


Рис. 10. Динамика (А, Б, В) рекристаллизации в 20%-ном водном растворе полиэтиленоксида (М.М.400)

них свойствами, что обусловлено природой их компонентов. Некоторые из платформ пронизывают липидный бислой мембраны на всю глубину, другие находятся ближе к поверхности. Размер, форма, время жизни, а также подвижность таких платформ в достаточной мере не выяснены, однако считают, что природа и свойства компонентов в разных платформах мембраны различаются.

Эти различия в организации могут быть обусловлены не только свойствами определенных молекулярных компонентов, но и их конформационным состоянием и специфичностью межмолекулярных взаимодействий между отдельными компонентами. Отграничение упорядоченных доменов от разупорядоченных (жидких) является следствием специфических межмолекулярных взаимодействий. Таким образом, компоненты платформы могут быть организованы в двухмерную, плотно упакованную решетку с близкими или эквивалентными единицами, тогда как в разупорядоченных областях эти единицы организованы более или менее случайно.

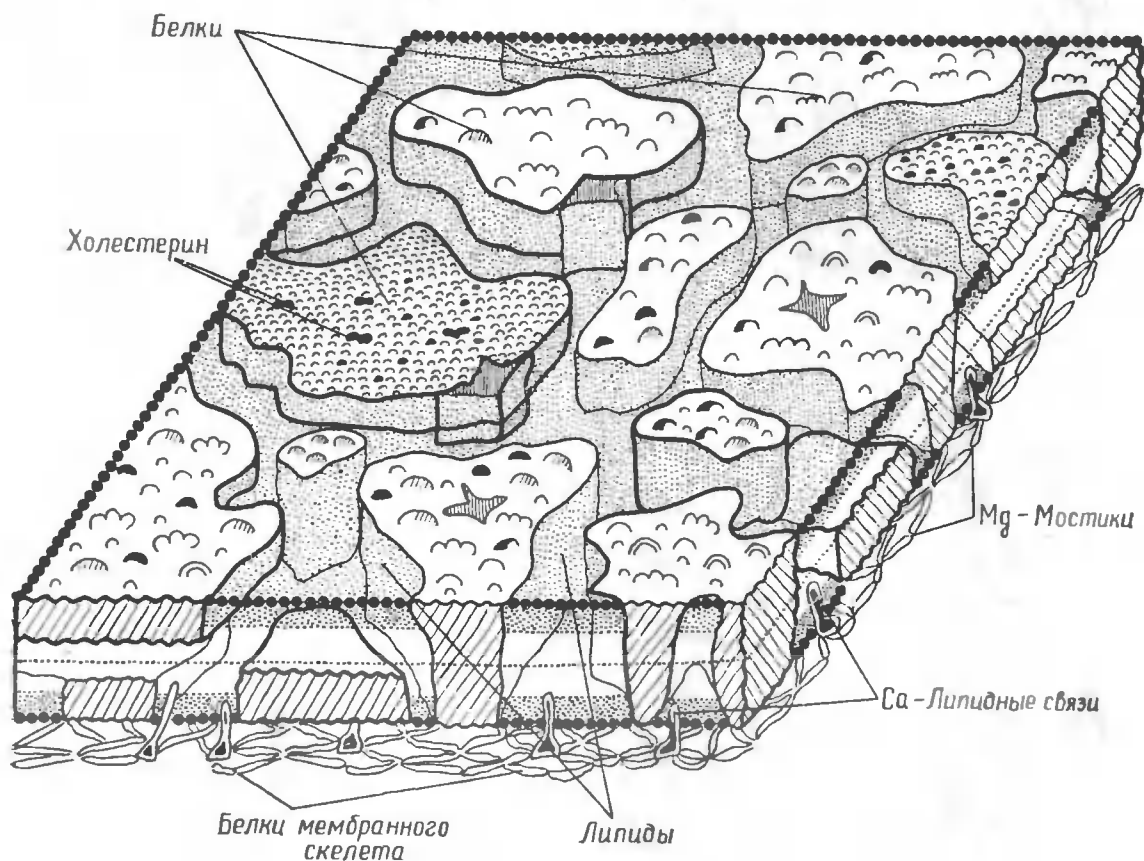


Рис. 11. Структура биологической мембраны

Даже в организованных доменах могут быть выявлены структурные дефекты нескольких типов: разрывы, дислокации, субструктурные фазы. И хотя строгое функциональное и структурное значение указанных дефектов в мембране не определено, есть основания считать, что они служат своеобразными *каналами*, в которых осуществляется быстрая диффузия веществ. Образование дезорганизованных участков в плоскости бислоя может быть вызвано такими экстремальными причинами, как компрессия, натяжение, скачок температуры, а также деформация и изменение топографии поверхности.

Исследования с помощью электронного микроскопа четко показывают, что в биомембранах наблюдается периодическая

реорганизация ее компонентов, находящихся в различном фазовом состоянии. Существование таких фаз может быть связано с механической деформацией клеток. Взаимосвязь клеточного движения с мембранными процессами на ее поверхности дает основание предполагать существование процесса агрегации липид-белковых и белок-белковых комплексов в некоторых участках мембраны. При этом могут наблюдаться локальные движения поверхностных рецепторов клетки (диффузия, образование бляшек), морфологические изменения (образование пузырьков, складок), а также генерализованные структурные нарушения, изменяющие форму и движение клетки. Эти процессы в мембранах клетки носят индуцированный характер (как, например, при взаимодействии гормона с мембраной). Это было показано при изучении распределения гликопротеиновых лектинов (конконавалина А) и специфических поверхностных антигенов, выявляемых с помощью флуоресцентных антител.

Характер указанных выше процессов сильно зависит от температуры, рН, осмотического давления, мембранного потенциала и ряда других факторов, которые могут вызывать сегрегацию (отделение) или агрегацию (скопление) мембранных компонентов, переход липида из жидкокристаллического состояния в гелевую фазу либо наоборот (фазовый переход), конформационные изменения в мембранных компонентах, кластеризацию липидов и белков в отдельных фазах и т. д.

Поэтому низкотемпературные эффекты в биомембранах сводятся к нескольким важным физико-химическим механизмам, влияющим на результаты замораживания различных биологических объектов. К их числу могут быть отнесены термотропные фазовые переходы липидов, температурозависимые изменения структуры мембранной воды, сегрегация и агрегация белков, нарушение барьерных свойств мембран, биохимическая модификация структурных компонентов мембран под влиянием процессов перекисного окисления и гидролиза липидов мембранными фосфолипазами и некоторые другие механизмы.

**Термотропные структурно-фазовые переходы липидов.** Процесс температурозависимого фазового перехода из жидкокристаллического в гелеобразное состояние приводит к образованию весьма ригидной мембранной структуры, пластичность которой резко отличается от состояния мембран, находящихся при физиологических температурах.

В гелевой фазе длинные оси жирнокислотных цепей фосфолипидов наклонены примерно на  $30^\circ$  по нормали к плоскости бислоя, а цепи их принимают трансконфигурацию по  $C=C$ -связям, т. е. при понижении температуры происходит как переход липида в новое фазовое состояние, так и изменение его конформационного состояния. В связи с этим такие термотропные перестройки липидов в мембранах принято называть *фазово-структурными*.

Для каждого типа липидных молекул характерна своя температура кооперативных фазово-структурных перестроек, определяемых как *фазовый переход*. При воздействии отрицательных или пониженных температур на липосомы, субклеточные органеллы или плазматические мембраны клеток перестройка их компонентов будет протекать по-разному. То, что многие плазматические мембраны сильно обогащены холестерином, обуславливает отсутствие во многих из них переходов, регистрируемых, например, методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) или ЭПР-спектроскопии. Это является следствием специфического влияния холестерина на упаковку липидов и его способности в концентрации выше 33 моль% маскировать либо предотвращать фазово-структурные переходы. Поэтому, например, в мембранах эритроцитов жидкокристаллическое состояние липидов может сохраняться до температуры  $-20^{\circ}\text{C}$ , а в мембранах митохондрий оно исчезает уже в области  $0^{\circ}\text{C}$ .

Температура фазового перехода зависит от длины и степени насыщенности его жирнокислотных звеньев (составляющих гидрофобные «хвосты» молекул), а также природы полярной головки. В механизмах холодовой адаптации особо важная роль отводится степени насыщенности: с увеличением числа двойных связей в жирнокислотных хвостах липидов температура фазового перехода понижается, что позволяет мембране нормально функционировать в области пониженных температур.

В двухкомпонентных смесях фосфолипидов с сильно различающимися температурами фазовых превращений переходы наблюдаются независимо, а в диапазоне температур между переходами жидкокристаллическая фаза и фаза твердого геля сосуществуют. В разделении фаз на этапе фазового перехода важная роль отводится *латеральной диффузии*. В более сложных смесях кооперативность перехода становится менее выраженной, и он протекает в достаточно широкой температурной зоне, поскольку холестерин, повышающий плотность упаковки молекул фосфолипидов в жидкокристаллическом бислое, сильно модифицирует мембрану: температурные границы фазового перехода фосфолипида в присутствии холестерина размываются (рис. 12).

Агрегатное состояние мембранных липидов существенно влияет на клеточные функции. Известно, что на этапе фазового перехода резко меняется проницаемость мембран для ионов и метаболитов, облегчается взаимодействие гормонов с рецепторами и т. д. Поэтому с точки зрения криобиологии характер фазово-структурных переходов липидов в биомембранах имеет значение не только для определения уровня их холодового повреждения, но и для прогнозирования процессов репарации мембранных структур в фазе отогрева замороженной системы.

Дело в том, что в области низкотемпературного фазового перехода и особенно фазового разделения липидов уровень дефектности мембраны возрастает, что является негативным про-

цессом, приводящим к утечке содержимого из клетки в момент ее отогрева. В этом смысле существенное значение имеют латеральное разделение липидов в плоскости бислоя (которое облегчается в условиях низких температур) и время релаксации этого процесса после отогрева, когда необходимо реализовать механизм «заживления» возникших трансмембранных дефектов.

Согласно криофрактографическим данным в нативных мембранах, содержащих смешанные липидные бислои в состоянии геля, при низких температурах содержатся домены, которые достигают нескольких микрометров в диаметре; в определенных участках бислоя их может быть до нескольких сотен. Состав, размер таких доменов и время их релаксации зависят от природы липидов, скорости охлаждения и конечной температуры замораживания мембран. Следовательно, при температурах, когда липиды переходят из жидкого состояния в твердое, в мембране сосуществуют твердые и жидкие зоны, в результате чего в бислое образуются разнородные кластеры липидов. Эти кластеры представляют собой короткоживущие динамические образования соседних липидных молекул, характеризующиеся координированным движением. Молекулярная плотность внутри кластера выше, чем в менее организованных областях, причем внутренняя вращательная свобода молекул в кластере ограничена. Методом ЯМР-спектроскопии и криофрактографии показано, что в бислоях диолеиллецитина при  $+30^{\circ}\text{C}$  кластеры отсутствуют, однако охлаждение приводит к их появлению в количестве 50% при  $2^{\circ}\text{C}$ ; при  $-22^{\circ}\text{C}$  этот липид переходит в состояние геля.

С понижением температуры доля структурированных липидов в мембранах увеличивается, область кластеров расширяется, а мембранные белки перемещаются ближе к поверхности мембраны. Подобный эффект «выдавливания» белков из мембраны при охлаждении может быть обнаружен с помощью флуоресцентных зондов. Следовательно, образование кластеров в мембранах при снижении температуры существенно влияет на липид-белковые взаимодействия и модифицирует активность ферментов. Изложение материалов о значении фазово-структурных превращений липидов мембран в холодовых повреждениях

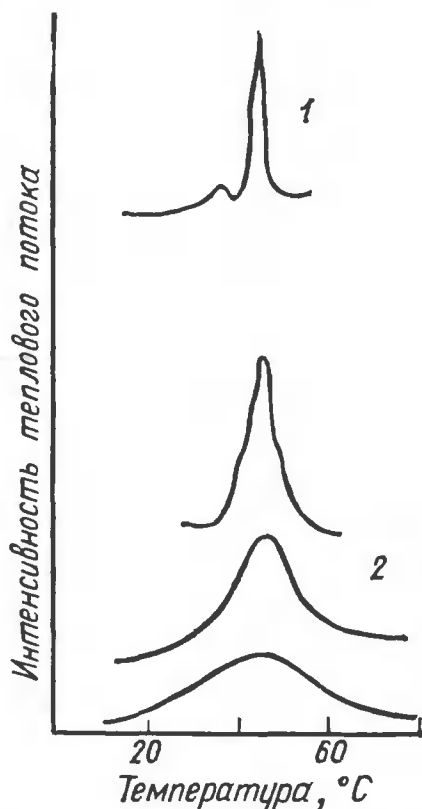


Рис. 12. Фазовая диаграмма плавления фосфолипидов в отсутствие (1) и в присутствии (2) холестерина



биологических объектов описано в специальной литературе (А. М. Белоус и др., 1978).

**Температуро-зависимые изменения структуры воды.** Криоповреждения клеток либо других биологических структур, обусловленные изменением фазового состояния белков или липидов, существенно зависят от *степени гидратации мембран*. Вода стабилизирует структуру мембраны, поэтому выяснение роли воды в поддержании структуры мембраны является одним из важных подходов к пониманию механизмов криповреждений мембран при охлаждении и замораживании. В процессе охлаждения происходит два типа изменений в поверхностной (*вицинальной*) воде: кооперативные процессы, захватывающие большое количество молекул воды, и процессы, сопровождающиеся изменением ее структуры. Существенной особенностью *вицинальной* воды является наличие структурных переходов при 45 и 15°C.

Существуют сведения о том, что *фазовые переходы вицинальной воды* являются одним из факторов холодового шока клеток. Важное значение в поддержании структуры мембраны имеют фракции мембраносвязанной воды. В связи с этим процесс низкотемпературной дегидратации мембраны (особенно при глубоком замораживании, когда вода переходит в кристаллическое состояние) оказывает существенное влияние на физиологическую интеграцию клетки. В липидных системах существует несколько типов воды (табл. 1). Методом дифракции нейтронов выяснено, что два первых слоя из 11—12 молекул, входящих в состав полярных областей липида, формируют гидратную оболочку, которая не принимает участия в процессах, связанных с растворением веществ; она осмотически не активна. Эта фракция воды не кристаллизуется даже при температурах —100°C, а может быть, и ниже. При вымерзании свободной воды связанная с биополимером фракция частично остается жидкой при —(60—50)°C. На степень связывания воды молекулами липида влияют природа биополимера и наличие примесей. Например, при добавлении стерина в систему из яичного фосфатидилхолина (1:1) число прочно связанных молекул воды увеличивается вдвое. Это происходит потому, что холестерин связывает дополнительное количество молекул воды ОН-группами, а также модифицирует полярные головки фосфолипида таким образом, что их средняя площадь увеличивается, повышая тем самым возможность гидратации.

Среди различных фракций воды основную роль играет *мембраносвязанная* и, очевидно, *межбислойная* фракции, которые контролируют латеральную диффузию гидратированных полярных групп липидов и белков, ионную проницаемость и работу мембраносвязанных ферментов. Тот факт, что в сравнительно узком интервале температур (0÷—35°C) происходит значительная дегидратация полярных головок липидов, имеет, вероятно, существенное значение для стабильности липидного

бислоя при более низких температурах. В нативных клетках и тканях также присутствуют фракции воды, которые не кристаллизуются при очень низких температурах. Так, при замораживании мышц лягушки ниже  $-70^{\circ}\text{C}$  замерзает только 80% имеющейся воды, остальная, сохраняющая подвижность вплоть до  $-(80-90)^{\circ}\text{C}$ , представляет собой фракцию, прочно связанную с белками.

**Таблица 1.** Типы воды и число молекул  $\text{H}_2\text{O}$  на молекулу фосфолипидов по данным  $^3\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии в температурном диапазоне  $+18 \div -22^{\circ}\text{C}$

Фракции воды	Яичный фос- фатидил- холин	Яичный фос- фатидил- этаноламин	Фосфатидил- серии из мозга быка
Внутренняя (межмолекулярная)	1,0	1,0	1,0
Основная (мембраносвязанная)	11,0	11,0	10,0
Межбислойная (захваченная ме- жду слоями)	11,0	—	120,0
Свободная (жидкая)	23,0	12,0	140,0

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, этиленгликоля, то могут формироваться и аморфные, так называемые *витрифицированные структуры*. Процессы, протекающие в замороженных биологических объектах и мембранах при участии различных фракций воды, имеют исключительно важное значение для их низкотемпературной консервации.

**Сегрегация и агрегация белков.** При охлаждении мембран клеток наблюдается миграция мембранных белков и их агрегация в белковые домены, вертикальная транслокация и другие виды перемещений, зависящие от фазово-структурного состояния липидной матрицы. Уже было отмечено, что завершение кристаллизации липидов сопровождается сильным латеральным сжатием бислоя и «выдавливанием» поверхностных и интегральных белков или их кластеров из липидного матрикса. *Процесс агрегации* белков тесно связан с латеральным разделением липидов в мембране. *Процесс сегрегации* (разделения) мембранных белков зависит от характера поперечной асимметрии липидов. Так, при охлаждении лимфоцитов в их ядерных мембранах белки «вымораживаются» из одного монослоя в противоположный (перпендикулярно плоскости мембраны). Важным фактором, обуславливающим такую направленность процесса, является асимметричное распределение холестерина, который ограничивает латеральную диффузию белков и предотвращает фазовое разделение липидов. Следовательно, асимметричное «вымораживание» белков будет предпочтительнее происходить



в мембранах митохондрий, чем эритроцитов, мембрана которых обогащена холестерином.

В какой степени агрегация белков связана с нестабильностью в зоне низких температур, неизвестно, однако можно полагать, что белковые агрегаты, «выдавленные» в наружный монослой, наиболее уязвимы для действия повреждающих факторов среды, таких, как повышенная осмотическая активность среды, рН и т. д. В некоторых природных мембранах имеются простые механизмы, дискриминирующие низкотемпературную белковую агрегацию. Например, в мембранах *Staphylococcus aureus* содержится повышенное количество разветвленных жирных кислот, которые при фазовом переходе образуют плотную решетку, предотвращающую выдавливание белков из липидного матрикса при низких температурах. Низкие температуры оказывают повреждающее действие на АТФазы мембран клеток, особенно если их медленно замораживать.

Как видно из табл. 2, при медленном (1—2°С/мин) замораживании мембран саркоплазматического ретикулула из скелетных мышц кролика эффективность работы Са-транспортирующей системы после отогрева падает параллельно снижению температуры. При температурах —(75—196)°С скорость аккумуляции Са<sup>2+</sup> снижается практически вдвое.

**Таблица 2. Функциональная активность Са-транспортирующей системы мембран ретикулула после отогрева в зависимости от скорости охлаждения и конечной температуры замораживания**

Этапы охлаждения	t, °С	Скорость гидролиза АТФ, мкмоль/мг белка в 1 мин	Скорость аккумуляции, мкмоль Са <sup>2+</sup> /мг белка в 1 мин	Коэффициент эффективности, Са <sup>2+</sup> /АТФ
Контроль	+4,0	1,46	2,65	1,80
Начало кристаллизации	—8,0	1,68	2,10	1,26
Эвтектическая зона раствора	—25	2,00	1,56	0,78
Зона рекристаллизации твердой фазы	—75	2,10	1,54	0,73
	—196	2,10	1,42	0,68

При этом чувствительность фермента к внешнему и аккумулярованному Са<sup>2+</sup> возрастает (рис. 13). Учитывая тот факт, что чувствительность фермента к Са<sup>2+</sup> зависит от физического состояния липидов, следует полагать, что при замораживании — отогреве нарушается состояние анулярных липидов. Следовательно, увеличение чувствительности АТФазы к иону-активатору наряду с изменением липидного окружения переносчика и реактивацией его выходящим из везикул кальцием является одной из основных причин активации фермента после замораживания — отогрева. Этот процесс схематически представлен на рис. 14. В результате нарушения структуры и фазового состоя-

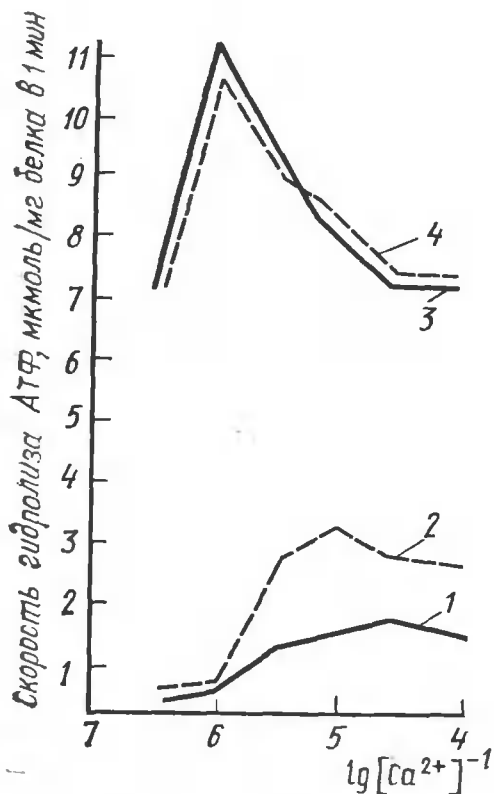


Рис. 13. Влияние низких температур на чувствительность Са-АТФазы к  $Ca^{2+}$  внешней среды:

1 — Са-АТФаза в мембранах саркоплазматического ретикулума (контроль), 2 — Са-АТФаза в мембранах саркоплазматического ретикулума после быстрого замораживания, 3 — изолированная Са-АТФаза, 4 — изолированная Са-АТФаза после быстрого замораживания — отогрева

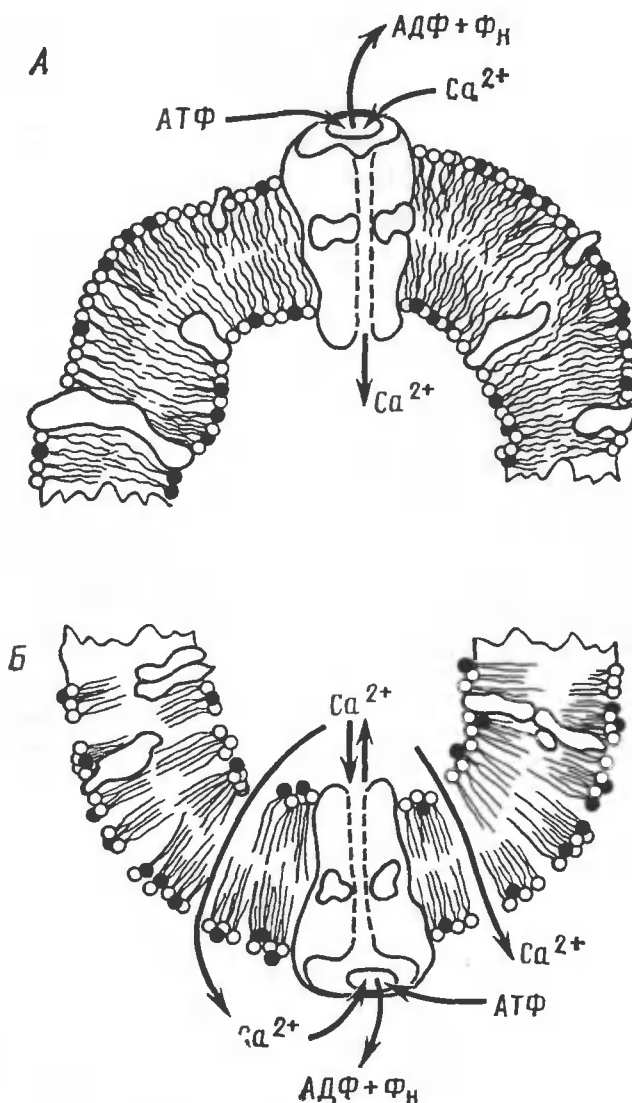
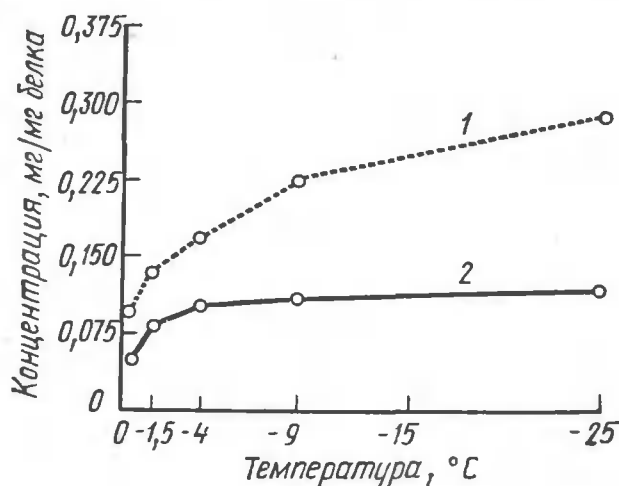


Рис. 14. Механизм нарушения функционирования Са-АТФазы мембран саркоплазматического ретикулума под влиянием холодового воздействия. А — в норме; Б — после замораживания — отогрева

ния основной массы липидного бислоя мембраны, окружающей Са-АТФазу, происходит утечка транспортируемого  $Ca^{2+}$  из везикул саркоплазматического ретикулума как через систему активного транспорта, так и посредством пассивной диффузии. Выходящий из микросом  $Ca^{2+}$  реактивирует Са-АТФазу. Однако несмотря на это скорость аккумуляции  $Ca^{2+}$  уменьшается довольно значительно за счет быстрого выхода его из везикул вследствие нарушения барьерных параметров мембран.

**Температурная модификация мембран.** В процессе низкотемпературного воздействия в мембранах клеток и внутриклеточных органелл развиваются биохимические реакции (перекисное окисление липидов, активация внутримембранных фосфолипаз и лизосомальных гидролаз), снижающие уровень фосфолипидов в мембранах и модифицирующие реакционно-активные группировки белков. Эти процессы в мембранных структурах клеток



**Рис. 15.** Влияние медленного замораживания митохондрий из печени крыс, суспендированных в 0,1 М KCl на уровень свободных жирных кислот (1) и лизосомальных гидролаз (2)

реализуются главным образом в температурном диапазоне  $0 \div 25^{\circ}\text{C}$ , когда в закристаллизованной матрице сохраняются жидкие микрофазы, содержащие высокие концентрации электролитов и солей, изменяющих осмотическую активность среды и pH.

Интенсивность этих процессов зависит от степени охлаждения биообъекта, наличия криопротекторных добавок, конечной температуры охлаждения и сроков хранения материала при низких температурах. Реальность про-

текания процессов перекисного окисления липидов при низких температурах хорошо прослеживается в опытах на митохондриях, изолированных из печени крысы, которые медленно замораживали до  $-25^{\circ}\text{C}$ , а затем отогревали в присутствии 40%-ной трихлоруксусной кислоты, тормозящей перекисное окисление липидов. При этом в составе мембраны накапливаются лизофосфатиды, лизолецитины и свободные жирные кислоты (рис. 15).

Этот факт может быть истолкован как результат гидролиза фосфолипидов в связи с низкотемпературной активацией мембраносвязанных фосфолипаз. Определено, что максимальная активность фосфолипазы  $A_2$  при замораживании митохондрий наблюдается при температурах  $-(5-25)^{\circ}\text{C}$ , т. е. при температурах начала и завершения фазово-структурного перехода липидов внутренней мембраны, когда ее дефектность и проницаемость для  $\text{Ca}^{2+}$  повышается.

Триацилглицеридлипаза дрожжей также активируется при их замораживании до  $-20^{\circ}\text{C}$ . Развитие этих процессов в мембранах приводит к деградации липидов, уменьшению их содержания в замороженном объекте. Это иллюстрирует табл. 3, из которой видно, что после медленного ( $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) замораживания эритроцитов до  $-25^{\circ}\text{C}$  в мембранных липидах повышалось содержание моно- и диглицеридов и снижался уровень фосфати-

дилхолина, фосфатидилэтаноламина и других фракций (кроме сфингомиелина) в результате низкотемпературной активации перекисного окисления липидов. При этом сверхслабая хемилюминесценция, возникающая в процессе автоокисления липидов при замораживании эритроцитов, сопровождалась изменением спектра и интенсивности медленной и быстрой вспышек свечения.

Таблица 3. Изменение фосфолипидного состава эритроцитов человека в процессе хранения при  $-25^{\circ}\text{C}$ , %

Природа фосфолипида	Контроль (без замораживания)	Низкотемпературное хранение, недели	
		6	8
Фосфатидилхолин	29,9	14,4	15,2
Сфингомиелин+фосфатидилинозит	25,3	28,0	25,8
Фосфатидилэтаноламин	24,3	4,6	4,4
Фосфатидилсерин	14,8	4,5	4,6
Суммарные липиды	5,4	6,8	9,2

Интенсификация процессов гидролиза фосфолипидов в мембранах митохондрий, эритроцитов и других клеток становится возможной также благодаря и тому, что при низкотемпературном воздействии разрушаются природные антиоксидантные системы. Установлено, например, что в процессе замораживания митохондрий они теряют эндогенный глутатион, который является эффективным фактором защиты от процессов перекисного окисления липидов. Появление в составе мембраны перекисных группировок приводит к резкому ослаблению связей липидных молекул друг с другом, белками и другими компонентами, повышает вероятность окисления SH-групп белков, что существенно модифицирует функционирование ферментов-катализаторов, ионных переносчиков и т. д. Лизосомы, очень чувствительные к воздействию низких температур, в процессе замораживания — отогрева разрушаются, существенно повышая концентрацию в цитоплазме высокоактивных гидролаз, которые оказывают лизирующее действие на внутриклеточные структуры, например ядра, митохондрии и т. д. (табл. 4).

Как видно из табл. 4, активность лизосомальных ферментов в надосадочной жидкости при замораживании лейкоцитов человека со скоростью  $1-2^{\circ}/\text{мин}$  все более возрастает в зависимости от глубины охлаждения, но наиболее выражено в диапазоне температур до  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Мембраны митохондрий, так же как и лизосом, весьма неустойчивы к действию охлаждения и особенно замораживания. Это происходит потому, что свойства липидов митохондриальных мембран отличаются от свойств липидов в других мембра-

**Таблица 4. Активность лизосомальных ферментов в среде 0,15M раствора NaCl при медленном замораживании лейкоцитов человека**

Температура замораживания, °C	Активность ферментов, мкмоль субстрата/мг белка в 1 мин			
	РНКаза	ДНКаза	Катепсины	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

нах. Во-первых, содержание липидов в мембранах митохондрий довольно низкое (27% массы), что соответствует высокой *плавающей плотности* мембраны. Во-вторых, невысокое содержание холестерина (менее 4% от общего содержания липидов) обуславливает легкую солюбилизацию мембран детергентами, ионной силой, рН, т. е. теми факторами, которые создаются в жидких микрофазах в температурном диапазоне 0 ÷ —25°C. В-третьих, основными фосфолипидами мембран митохондрий являются фосфатидилхолин (41%) и фосфатидилэтаноламин (33%), которые содержат ненасыщенные ацильные группировки в С<sub>2</sub>-положении. При низкотемпературном воздействии они могут легко подвергаться перекисному окислению, поскольку митохондрии насыщены железосодержащими белками.

При замораживании, когда происходит разрушение мембраны кристаллами льда, субстрат окисления (фосфолипиды) и катализатор (железосодержащие белки) изменяют свою пространственную и структурную упорядоченность таким образом, что процессы перекисного окисления липидов ускоряются. В-четвертых, 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 и содержат большое количество полиненасыщенных жирных кислот.

Более того, мембраны митохондрий различаются по содержанию холестерина, который локализован преимущественно в наружной мембране. В связи с этим ее липиды слабо защищены от термотропных фазовых превращений, поэтому последние возникают уже при умеренно пониженных температурах. Методом электронно-микроскопической криофрактографии обнаружено, что при температурах —(5—15)°C в мембранах митохондрий выявляется отчетливое фазовое разделение липидов. При этом дыхательная активность и окислительное фосфорилирование митохондрий резко снижаются, из матрикса в среду выходят

$K^+$  и  $H^+$ , а также некоторые маркерные ферменты, например малатдегидрогеназа, цитохром *c*, т. е. мембрана полностью теряет свои барьерные свойства.

Замораживание — отогрев клеток (например, гепатоцитов) выявило криолабильность и такой мембраносвязанной ферментной системы, как *аденилатциклаза*. При криовоздействии активность аденилатциклазы снижается за счет повреждения специфического фтор-регуляторного участка ГТФ-связывающего белка и нарушения взаимодействия между рецепторами и указанным выше регулятором. Существенную роль в криоповреждении аденилатциклазной системы играют солевые эффекты и сдвиг  $pH$ ; они вызывают диссоциацию комплекса. При этом нарушение структурно-функциональных свойств данной системы во многом сопряжено с изменениями структуры плазматической мембраны клетки, модификацией структуры викальной воды и молекул липидов, а также нарушением взаимодействий белок-липидных комплексов.

Из приведенных данных следует, что подавляющее число мембранных структур клеток обладает повышенной чувствительностью к низким температурам. Это обуславливает необходимость использования специальных приемов замораживания и защитных веществ (криопротекторов) при криоконсервации различных биологических объектов с тем, чтобы возникающие в процессе охлаждения повреждения мембран смягчить либо свести до минимума.

### Глава 3. Криопротекторы

Вещества, способные предотвращать развитие повреждений биологических объектов при их замораживании и последующем отогреве, называют *криопротекторами*. К эффективным криопротекторам относятся вещества, принадлежащие разным классам химических соединений. Это спирты (этиленгликоль,  $\alpha$ -пропиленгликоль, глицерин), амиды (диметилацетамид), оксиды (диметилсульфоксид), искусственные полимеры (поливинилпирролидон, оксиэтилированный крахмал, полиэтиленгликоль). Приведенный список не исчерпывает ни классов веществ, в которых могут встретиться эффективные криопротекторы, ни перечень криопротекторов в названных классах.

Криопротекторы используют в составе *криозащитных сред* — водных растворов криопротекторов, в которых могут присутствовать различные органические и неорганические добавки. При добавлении этих сред к клеточным суспензиям (выдерживание в них тканевых препаратов или перфузия ими органов) физико-химические свойства вне- и внутриклеточных растворов изменяются так, что последующие изменения при замораживании — отогреве оказываются менее губительными для клеточных структур, чем изменения, происходящие при замораживании — отогреве в незащищенных объектах.

Вопрос о том, какими свойствами должен обладать эффективный криопротектор, до сих пор не имеет исчерпывающего ответа, хотя некоторые из этих свойств известны. Криопротектор должен быть нетоксичен, хорошо растворим в воде, эффективно снижать количество вымораживаемой (в виде чистого льда) воды при каждой данной температуре и полностью предотвращать кристаллизацию воды из эвтектической смеси криопротектор — вода, поддерживать в растворенном состоянии соли и белки вплоть до эвтектического перехода в аморфное состояние. Полезным, но не обязательным для криопротектора свойством является его способность легко проникать через клеточную мембрану.

Как же реализуются эти свойства в процессе замораживания биологических структур? В присутствии криопротектора вымораживание фракции воды из криозащитной среды протекает в широкой температурной зоне и завершается, когда концентрация невымерзшей воды достигает величины 20—30%. Увеличение исходной (до замораживания) концентрации криопротектора приводит к снижению роста концентраций вне- и внутриклеточных солей. В присутствии криопротекторов соли либо вообще не концентрируются до повреждающих пределов, либо эти пределы достигаются в зоне температур, когда развитие повреждений протекает медленно.

Возникающие при вымораживании воды из криозащитной среды гипертонические (но не достигающие повреждающего предела) концентрации криопротектора вызывают обезвоживание клеток, что, в свою очередь, повышает концентрацию внутриклеточных коллоидов. Последние в высоких концентрациях проявляют криозащитные свойства: способствуют переохлаждению внутриклеточной среды и ее частичному переходу в стеклообразное состояние, исключаящее образование достаточно крупных для повреждения клеток кристаллов льда.

Быстрое проникновение криопротектора в клетку предотвращает ее повреждение в гипертонических криозащитных средах и по мере вымораживания воды на фоне обезвоживания клеток предупреждает возникновение на мембране повреждающих градиентов концентраций вне- и внутриклеточного раствора.

Несмотря на то что проникающие криопротекторы, как правило, обеспечивают более эффективную защиту биологических структур при вымораживании воды, чем непроникающие, их применение зачастую наталкивается на ряд серьезных трудностей, связанных с возвращением клеток в изотоническую среду. Следует также заметить, что высокая проницаемость криопротектора через плазматическую мембрану отнюдь не подразумевает столь же высокую его проницаемость через мембраны органелл, которые могут повреждаться в результате повышения концентрации криопротектора в клетке.

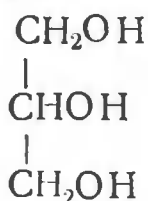
В связи с тем, что проникающая способность криопротектора зависит не только от его молекулярной массы (понижается с



ее увеличением), но и от конкретного вида клеток, нельзя понимать буквально часто применяемый термин «криопротектор эндоцеллюлярного действия». Например, один из таких криопротекторов — *глицерин*. Он довольно быстро проникает в эритроциты человека при 37°C (равновесие устанавливается примерно за 2 мин). Эта величина для спермиев быка оценивается временем 7 мин. Однако скорость проникновения глицерина в другие клетки может быть значительно меньшей; так, в эритроциты быка глицерин практически не проникает.

Прежде чем дать краткую характеристику некоторых свойств наиболее известных криопротекторов, небезынтересно вспомнить открытие криозащитных свойств у глицерина. Еще в 1913 г. русский ученый Н. А. Максимов изучал криозащитное действие растворов различных веществ, в том числе глицерина и сахарозы, на растительных объектах. В его опытах глицерин оказывался менее эффективным криопротектором, чем сахароза. На криозащитные свойства глицерина в последующем обратили внимание советские ученые А. Д. Бернштейн, В. И. Петропавловский (1937), применив его для замораживания (до —21°C) спермы ряда сельскохозяйственных животных и птиц. Однако их результаты не получили развития и были забыты. Позднее Дж. Ростан (1946) продемонстрировал возможность хранения спермы лягушки в течение 1 суток при —(4—6)°C в среде, содержащей 10—20% глицерина. Но эти опыты не привлекли внимания ученых и понадобился случай (английские исследователи К. Полдж и О. Смит (1949), работая над проблемой замораживания клеток в растворах сахаров, обнаружили, что глицерин обладает криозащитными свойствами в отношении спермиев петуха), чтобы внимание ученых было привлечено к глицерину уже надолго.

Глицерин — многоатомный спирт с молекулярной массой 92,10; его структурная формула



Благодаря наличию -ОН-групп глицерин способен образовывать водородные связи с молекулами воды, растворяется в ней в любых соотношениях. Известна способность глицерина растворять соли и щелочи, мочевины, сахарозу, а также газы. Вязкость 50%-ного водного раствора глицерина в 5,41 раза превышает вязкость воды при комнатной температуре. Осмотическое давление растворов глицерина примерно равно для концентрации 1% —  $4,56 \cdot 10^5$  Па; 5% —  $12,6 \cdot 10^5$ ; 10% —  $28,56 \cdot 10^5$ , 15% —  $47,4 \cdot 10^5$  Па. Растворение глицерина в воде сопровождается выделением тепла и уменьшением объема раствора относительно суммы объемов глицерина и воды.

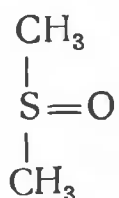


Глицерин не является для биологических объектов чужеродным соединением, он поступает в пищу в составе жиров, образуется в ходе обмена веществ в печени, эфиры глицерина и жирных кислот (глицеролипиды) включаются в состав клеточных мембран. В медицинской практике глицерин находит применение в основном как препарат осмотического действия. Наибольшая переносимая доза глицерина при внутривенном введении собакам составляет 3—5 г/кг массы, кроликам — 2—3 г/кг. Наибольшая допустимая доза при внутривенном введении человеку 1—2 г/кг массы. При пероральном введении доза может быть увеличена примерно в 5 раз. В настоящее время глицерин с успехом применяют для низкотемпературного консервирования клеток крови, спермы сельскохозяйственных животных, некоторых тканей человека (кожи, роговицы и др.) и животных.

Изучение влияния глицерина на биологические объекты выявило и неблагоприятные стороны его действия. Так, глицерин затормаживал развитие клеток костного мозга в культуре ткани, вызывал прекращение размножения некоторых микроорганизмов, способствовал набуханию спермиев быка. Инкубация клеток костного мозга в среде, содержащей 15% глицерина, при +4°C приводила к ультраструктурным изменениям гранулоцитов, хотя и не вызывала таких изменений у эритроидных и лимфоидных клеток.

Механизмы цитотоксического действия глицерина (как, впрочем, и других криопротекторов) изучены пока недостаточно, и поэтому не всегда можно с определенностью сказать, какие свойства глицерина обуславливают то или иное повреждение клеток. При разработке методов низкотемпературного консервирования наряду с глицерином применяют и другие криопротекторы.

*Диметилсульфоксид* относится к классу оксидов. Его молекулярная масса 78, структурная формула

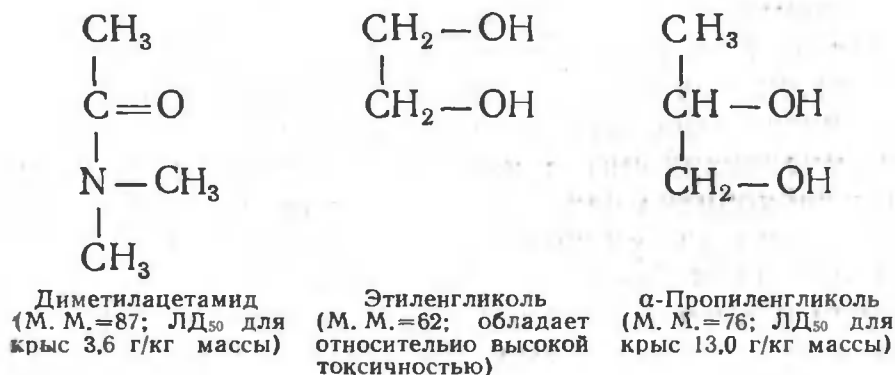


Благодаря наличию кислорода диметилсульфоксид может вступать в реакции с  $\text{HClO}_4$ , солями и оксидами фосфата, серы, может образовывать связи с глицерином, сахарозой, мочевиной, стеариновой кислотой и др. Окисляется под влиянием перманганата калия и пероксида водорода. С водой образует более устойчивые водородные связи, чем водородные связи, образуемые между молекулами воды.

Диметилсульфоксид находит широкое применение в ортопедии и травматологии. Летальная доза димексид — препарата, выпускаемого в нашей стране и разрешенного МЗ СССР для клинического применения, составляет 2,5—3 г/кг массы.

Экспериментами показано, что диметилсульфоксид лучше глицерина проникает в большинство биологических объектов. Этим обусловлено широкое применение его в качестве криопротектора для многих видов клеток и тканей. Его широко применяют для низкотемпературного консервирования тканевых культур, спермы рыб, некоторых микроорганизмов.

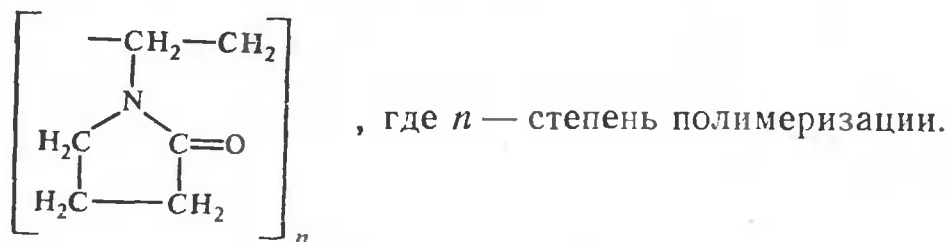
В качестве криопротекторов иногда применяют диметилацетамид, этиленгликоль, пропиленгликоль. Первое вещество относится к классу амидов, два других — к классу спиртов. Структурные формулы, молекулярные массы (М.М) и токсичность этих веществ представлены ниже:



*Диметилацетамид* находит применение при низкотемпературном консервировании лейкоцитов и тромбоцитов и, по данным ряда авторов, в отличие от глицерина обеспечивает сохранность гранулоцитов. *Этиленгликоль*, как было неоднократно показано, быстро проникает в клетки и в высоких концентрациях даже при 0°C не приводит к их повреждению. Эвтектическая точка для этиленгликоля находится около —55°C. Вместе с тем его применение в практике низкотемпературного консервирования ограничивается из-за токсичного действия на организм.

*α-Пропиленгликоль* как фармакопейный препарат применяют в качестве основы гидрофобных мазей, он служит растворителем некоторых лекарственных средств. В практике низкотемпературного консервирования используется как основа криозащитных сред для эритроцитов человека, клеток культуры ткани почки человека, спермы быка и птиц. В эритроциты человека проникает лучше, чем глицерин.

*Поливинилпирролидон (ПВП)* относится к классу искусственных полимеров. Его структурная формула



В медицинской практике в качестве плазмазаменителей используют препараты ПВП со средними молекулярными массами от

12 000 до 40 000. Препараты ПВП с более высокой молекулярной массой обычно загрязнены различными примесями (например, альдегидами), которые могут индуцировать в клетках процессы перекисного окисления и приводить к активации каталаз. Кроме того, крупные молекулы ПВП плохо выводятся из организма. В свою очередь, низкомолекулярные ПВП слабо утилизируются клетками. В водных растворах молекулы ПВП, имеющие в своем составе гидрофильные и гидрофобные участки, принимают спиральную конфигурацию.

Известна способность молекул ПВП увеличивать скорость оседания и вызывать агглютинацию эритроцитов, что связано с их действием на структуру мембран. С помощью ПВП в концентрациях от 7 до 20% (чаще от 10 до 15%) получены вполне удовлетворительные результаты по сохранности различных клеток после низкотемпературного консервирования — эритроцитов человека, миелокариоцитов кроликов, мышей и человека, лимфоцитов и лейкоцитов человека, клеток культуры фибробластов китайского хомячка, различных микроорганизмов, эмбрионов мыши на стадии 8 бластомеров и ранней бластоцисты.

*Декстран* и *оксиэтилкрахмал* так же, как и ПВП, являются полидисперсными полимерами. До применения в качестве криопротекторов они были известны в медицине как плазмазаменители. В медицинской практике используют препараты декстрана со средними молекулярными массами от 40 000 до 80 000 и оксиэтилкрахмала не выше 60 000.

В отечественной криобиологии в качестве криопротекторов широко применяют *полиэтиленоксиды* (ПЭО). Химическая формула ПЭО  $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n\text{CH}_2\text{OH}$ , где  $n$  — степень полимеризации. Полиэтиленоксиды широко используют в различных отраслях промышленности. ПЭО с молекулярными массами от 300 до 6000 являются фармакопейными препаратами и применяются в качестве синтетической вяжущей основы разных лекарственных средств. Ниже приведены значения вязкости 50%-ных водных растворов ПЭО различных молекулярных масс:

Молекулярная масса	Вязкость, отн. ед.
600	12—16
1000	17—25
1500	27—40
2000	38—60
4000	90—200
6000	160—400

Препараты ПЭО отличаются высокой степенью дисперсности.

В практике низкотемпературного консервирования для защиты ядросодержащих клеток крови и костного мозга, кожи, роговицы и других тканей человека используют препараты ПЭО (М. М. 400). ПЭО (М. М. 1500) успешно апробирован в низкотемпературном консервировании эритроцитов человека.

ПЭО с молекулярными массами 1500, 4000, 6000 применяют также для гибридизации соматических клеток, которая, как известно, вызывает изменения в мембранах. Используют способность препаратов ПЭО (М. М. 2000—4000) осаждать белки из раствора, не вызывая их денатурации. Установлено, что ПЭО может приводить к компактизации молекул ДНК. Вопрос о проникновении ПЭО в клетки остается до конца не выясненным.

#### Глава 4. Осмотические эффекты

Осмотические явления, связанные с переносом различных веществ через избирательно проницаемые мембраны, вносят значительный вклад в повреждение и защиту клеточных мембран на различных этапах криоконсервации. Каков ответ замкнутой системы (везикулы или клетки), окруженной избирательно проницаемой мембраной, на перенос из одной среды в другую, которая отличается от первой составом (гипертоническая среда при изотермических условиях)? Упрощенный анализ протекающих при этом процессов позволяет выявить ряд физических причин и закономерностей криоповреждения и криозащиты мембранных структур, особенно на начальном и конечном этапах цикла криоконсервирования.

Перенос клеток из одной среды в другую нарушает термодинамическое равновесие между внеклеточным и внутриклеточным растворами, необходимым условием которого является равенство значений вне и внутри клетки химических потенциалов проникающих через мембрану веществ. Химические потенциалы зависят от температуры, давления и концентрации растворенных в системе клетка — окружающая среда веществ.

Известно, что химический потенциал слабо зависит от давления. Поэтому для слабых растворов при изотермических условиях равенство химических потенциалов соответствует равенству концентраций растворенных вне и внутри клетки веществ, проникающих через клеточную мембрану. Выравнивание концентраций какого-либо из растворенных веществ вне и внутри клетки, отражающее стремление системы возвратиться к состоянию термодинамического равновесия, может происходить различными путями. Если суммарное содержание растворенных внутри клетки веществ ниже, чем снаружи, то концентрации могут стать равными либо за счет осмотического удаления части воды из клеток, либо за счет проникновения определенного количества растворенных веществ снаружи внутрь клеток. Обычно растворитель (вода) проникает через мембраны клеток или липидных везикул значительно быстрее, чем молекулы других веществ. Поэтому при переносе клетки (везикулы) из изотонического в гипертонический раствор объем клетки в начале экспозиции уменьшается до значения  $\sim \sigma \Delta\pi / \pi_0$  (где  $\Delta\pi$  — разность осмотического давления между внутри- и внеклеточным растворами,  $\pi_0$  — осмотическое давление криоконсерванта), так что

суммарные концентрации вне и внутри клетки выравниваются за счет оттока воды из клетки. На последующих этапах наблюдается медленное восстановление клеточного объема (рис. 16).

Стадия  $OA$  называется *стадией обезвоживания клеток*. На стадии  $AB$  концентрации проникающего через мембрану клетки вещества вне и внутри клеток медленно выравниваются за промежуток времени  $(\gamma K_s)^{-1}$ , где  $\gamma$  — *поверхностно-объемное отношение клетки*, а  $K_s$  — коэффициент проницаемости клеточной мембраны для растворенного вещества. Если растворенное вещество не проникает через мембрану клетки, то после стадии обезвоживания  $OA$  клетка остается в обезвоженном состоянии

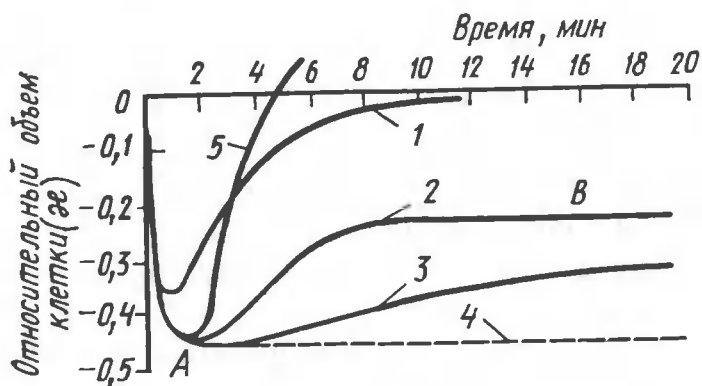


Рис. 16. Зависимость относительного объема клетки от времени ее контакта с гипертоническим раствором проникающего (1—3) и не проникающего (4) через клеточную мембрану вещества (остальные объяснения см. в тексте)

(пунктирная линия). В этом случае  $\sigma$  — *коэффициент избирательности мембраны для растворенного вещества* — обращается в единицу. Чем быстрее проникает через мембрану растворенное в системе вещество, тем менее значительным становится эффект обезвоживания (переход от 4 к 1). В другом предельном случае, когда проницаемости растворителя и растворенного вещества становятся равными (например, если раствор представляет собой смесь изотопов), объем не отклоняется от первоначального, и  $\sigma = 0$ . Следует подчеркнуть, что коэффициент избирательности практически для всех применяемых в настоящее время криопротекторов близок к единице. Поэтому даже такой относительно хорошо проникающий в клетки криопротектор, как диметилсульфоксид, оказывает первоначально почти такое же обезвоживающее действие на клетку, как и непроникающий.

Восстанавливается ли объем клетки на стадии  $AB$  до исходного или другого значения, зависит от наличия вне и внутри нее непроникающих через мембрану веществ. Если концентрация непроникающих через мембрану веществ снаружи клетки больше, чем внутри ее, объем клетки не достигнет первоначального значения даже по истечении длительного (сравнимого с  $(\gamma K_s)^{-1}$ ) промежутка времени (рис. 16). Если же внутри клетки

содержатся непроникающие вещества, а в наружном растворе их нет, то объем клетки в конце концов превысит исходное значение (кривая 5 на рис. 16). При этом мембрана может оказаться растянутой до такой степени, что будет разорвана. Для эритроцитов человека, например, растяжение клеточной мембраны на 5—6% влечет за собой нарушение ее барьерной функции. Поэтому, как правило, в состав криоконсерванта наряду с проникающим в клетки криопротектором вводится вещество, не проникающее внутрь клеток (ионы натрия, сахара и др.), осмотическое давление которого имеет то же или более высокое значение, чем внутриклеточная среда.

В зависимости от того, как долго экспонируются везикулы или клетки в проникающем растворе криопротектора, содержание последнего в них может быть меньше или больше. Начальное насыщение внутриклеточного раствора криопротектором, определяющееся продолжительностью экспозиции клеток в криоконсерванте до начала охлаждения объекта, сильно влияет на кинетику процесса обезвоживания клеток на последующих этапах консервации и вероятность образования кристаллов льда внутри клеток, т. е., как будет показано далее, на сохранность консервируемой суспензии.

При некоторых условиях через мембрану быстрее, чем вода, проникают молекулы других растворенных веществ. Так, через мембраны эритроцитов человека в области температур выше 25°C быстрее проникают анионы хлора, а не молекулы воды. В связи с этим контакт эритроцитов с гипо- или гипертонической средой при температурах выше 25°C, в первую очередь, приводит к перераспределению между клеткой и окружающей ее средой  $\text{Cl}^-$ , что, в свою очередь, влечет изменение мембранного потенциала эритроцитов (М. Брумен, 1979). Сдвиг потенциала на 45 мВ приводит к резкому увеличению проницаемости мембраны эритроцита для катионов — к диэлектрическому пробою и к гибели клетки.

Возвращение клеток в изотонический раствор после контакта с гипертоническим раствором часто приводит к разрушению их мембран. Это явление называется *постгипертоническим лизисом*. Одна из его физических причин заключается в следующем. Если в гипертонической среде внутрь клеток проникает достаточно большое количество растворенных веществ, то при переносе в изотонический раствор внутрь клеток должно проникнуть значительно больше воды, чем ее было удалено на стадии обезвоживания (прежде, чем концентрация растворенных внутри клеток веществ уменьшится до изотонической). При этом мембраны растягиваются до такой степени, что наступает их механическое разрушение.

Отогрев замороженной суспензии также приводит к резкому уменьшению концентрации растворенных во внеклеточной среде веществ за счет таяния льда. Если все растворенные вещества проникают через клеточные мембраны значительно медленнее,

чем молекулы растворителя (воды), выравнивание значений химического потенциала воды вне и внутри клеток будет происходить практически только за счет тока воды в клетки, но не за счет выхода накопленных клетками в период экспозиции с криоконсервантом или замораживания растворенных веществ наружу. При этом возрастает опасность постгипертонического лизиса.

На рис. 17 приведены графики, показывающие изменение

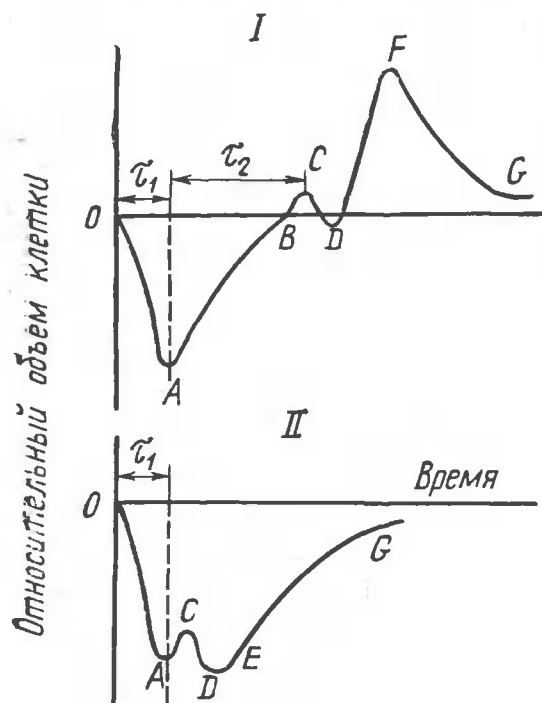


Рис. 17. Изменение относительного объема клетки в течение цикла низкотемпературного консервирования при времени экспозиции клеток в криозащитной среде до начала охлаждения порядка  $\tau_2$  (I) и  $\tau_1$  (II) (пояснение см. в тексте).

характерных участков этих кривых таковы:  $OA$  — быстрый отток воды из клеток при переносе их из физиологического в гипертонический раствор, содержащий криопротектор;  $AB$  — медленное восстановление объема, сопровождающееся перераспределением криопротектора между клеткой и окружающей ее средой;  $BC$  — незначительное при медленном охлаждении до начала кристаллизации оводнение клеток;  $CD$  — обезвоживание клеток в период кристаллизации, незначительное при быстром охлаждении;  $DE$  — оводнение при отогреве;  $EF$  — оводнение остогретых клеток при переносе в изотонический раствор;  $FG$  — медленное восстановление объема. На стадии  $EF$  в растягиваемой клеточной мембране возникают существенные тангенциальные напряжения, в то время как при таком же уменьшении объема (т. е. при обезвоживании) перепад гидростатического давления и напряжение принимают несоизмеримо меньшие значения, так что опасность повреждения мембраны оказывается значительно меньшей, чем при оводнении.

Разрушение клеточной мембраны или нарушение свойства избирательной проницаемости вследствие ее чрезмерной дефор-



мации при оводнении клеток на этапе  $EF$  является одной из причин гибели клеток при их криоконсервации. Для исключения опасной фазы  $EF$  (т. е. постгипертонического лизиса) замораживание образца следует проводить так, чтобы продолжительность экспозиции клеток в растворе криопротектора и продолжительность кристаллизации в каждой точке образца была значительно меньше, чем  $(\gamma K_S)^{-1}$ , и сравнима с временем, соответствующим стадии обезвоживания  $OA$ . Если продолжительного контакта клеток с криопротектором избежать нельзя, то перед их возвращением в условия нормальной жизнедеятельности необходимо удалять криопротектор из суспензии в несколько этапов, постепенно (ступенчато) снижая его концентрацию в отмывающем растворе.

Если клетка содержит растворенное вещество в большей концентрации, то для выравнивания значений концентраций вне- и внутриклеточного раствора при оводнении или обезвоживании клетки, очевидно, требуется ввести внутрь клетки или удалить из нее значительно меньшее количество воды, чем когда в клетке содержится растворенное вещество в меньшей концентрации. Вследствие этого эффекта двухступенчатая отмывка от проникающего в клетки криопротектора, который в отогретой суспензии содержится, например, в концентрации  $3M$ , должна проводиться следующим образом. Вначале клетки необходимо отмыть таким раствором, чтобы перепад осмолярности между размороженной суспензией и отмывающим раствором не превышал  $2M$ , а затем уже изотоническим раствором (на второй ступени процедуры указанный перепад концентрации не должен превышать  $1M$ ). В противном случае (например, при перепадах осмолярности на первой и второй ступенях  $1,5M$ ) эритроциты будут подвергнуты постгипертоническому гемолизу.

Каковы существующие представления о механизме гемолиза эритроцитов или лизиса липидных везикул в процессе растяжения их мембран (например, при оводнении клеток на стадии  $EF$ )? В гипотонических средах или в результате постгипертонического гемолиза, как правило, не происходит разрыва мембран эритроцитов. При определенной степени набухания в их мембранах образуются мелкие поры, через которые гемоглобин может диффундировать из клеток наружу без разрыва клеточной мембраны (В. С. Маркин, 1985). В результате этого явления образуются *тени эритроцитов* — сферические мембраны, заполненные таким же раствором, как и внеклеточная среда.

Свободная энергия ( $F$ ) изотропно растянутой мембраны при наличии в ней поры радиуса  $a$  равна

$$F = \frac{\Gamma}{2} \frac{(S - S_0 - \pi a^2)^2}{S_0} + 4\pi\gamma a, \quad (1)$$

где  $\Gamma$  — поверхностный модуль изотермического сжатия мембраны,  $S$  и  $S_0$  — площадь мембраны в деформированном состоянии



и в отсутствие деформации,  $\gamma$  — линейное натяжение поры. Свободная энергия растянутой мембраны как функция радиуса поры (при заданном натяжении) может иметь вид как на рис. 18.

Если растяжение  $\Delta S = S - S_0$  мало, то энергия монотонно возрастает с ростом радиуса поры  $a$  (1) и появление поры энергетически невыгодно. Когда  $\Delta S$  превышает некоторое критическое значение, энергия как функция радиуса поры имеет минимум при некотором (отличном от нуля) радиусе поры  $a_{кр}$ , что свидетельствует о принципиальной возможности образования макроскопической поры при растяжениях мембраны, превышающих критическое значение. При дальнейшем росте растяжения мембраны минимум на энергетической кривой становится более глубоким (2). Для образования поры в этом случае система должна преодолеть энергетический барьер  $W_0$ , а для «залечивания» поры — энергетический барьер  $W_{кр}$ .

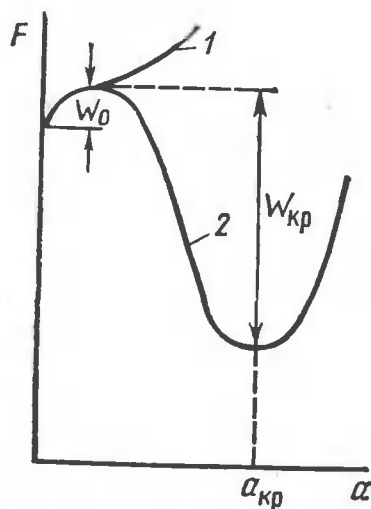


Рис. 18. Свободная энергия изотропно растянутой мембраны ( $F$ ) как функция радиуса поры ( $a$ ) (при заданных натяжениях)

ет над осмотическим всасыванием воды через остальную часть мембраны, то везикула начинает выбрасывать наружу растворенные вещества (в случае эритроцитов — гемоглобин) в пульсирующем режиме. Мембрана периодически растягивается и в ней образуется пора. Затем натяжение мембраны понижается за счет выброса части внутриклеточного раствора наружу через образовавшуюся пору. При этом натяжение мембраны сбрасывается до значения, меньшего чем критическое. Существование поры становится энергетически невыгодным и она «залечивается». Затем этот цикл повторяется снова. Таким образом, один из механизмов осмотического лизиса везикул или клеток заключается в образовании макроскопической поры в растянутой мембране.

Важное значение для криоустойчивости липидных везикул и клеток может иметь и явление латерального перераспределения мембранных компонентов под влиянием деформации мембран. Хотя любое отклонение состава мембраны от однородного, очевидно, приводит к возрастанию ее энтропии, оно может оказаться энергетически выгодным, если влечет за собой уменьшение свободной энергии деформации мембраны. Так, площадь липидных монослоев может увеличиться за счет сепарации мембран-

ных компонентов на участки с повышенным содержанием одного из них. При этом натяжение, а вместе с ним и свободная энергия деформации мембраны понизятся, а энтропия системы возрастет. Если первый эффект превалирует над вторым (что возможно при достаточно большом натяжении мембраны), первоначально однородное распределение компонентов вдоль мембранных монослоев станет термодинамически невыгодным и в мембране появятся участки с повышенным или пониженным содержанием одного из них.

Как известно из теории упругости, энергия изгиба мала по сравнению с энергией растяжения тонкой оболочки (клеточной мембраны). Поэтому, если данная оболочка допускает деформации без растяжения или сжатия нейтральной поверхности, именно деформации изгиба и будут реально осуществляться при воздействии на нее произвольных внешних сил. Например, в процессе обезвоживания первоначально сферической клетки форма ее мембраны не будет оставаться сферической, поскольку тогда мембрана в целом должна была бы сильно сжаться. Ей энергетически выгоднее принимать такие формы, при которых знак средней кривизны в разных частях мембраны становится разным, а площадь нейтральной поверхности мембранного бислоя остается такой же, как в исходном, недеформированном состоянии. Изгиб мембраны при осмотическом обезвоживании липидной везикулы или клетки является физической причиной сепарации мембранных компонентов. Так, в тех точках мембраны, где по абсолютной величине кривизна мембраны больше, преимущественно скапливаются компоненты с меньшим модулем растяжения — сжатия (в предположении, что недеформированному состоянию соответствует плоский бислой), ибо это, очевидно, приводит к уменьшению свободной энергии изгиба мембраны.

Некоторые криобиологи (Дж. Моррис, Дж. МакГраф, 1984) считают, что в процессе сильного обезвоживания клеток или липосом от мембран могут отшнуровываться небольшие липидные везикулы, и, таким образом, свободная энергия деформации мембраны понижается. При этом площадь мембран также уменьшается. При экспонировании первоначально обезвоженных клеток в изотонической среде нарушается барьерно-транспортная функция клеточных мембран, так как восстановление объема в этом случае приводит к значительному растяжению потерявшей часть материала мембраны.

## Глава 5. Температурно-осмотический шок клеток

Если охлаждение происходит медленно, то большинство биологических объектов переносит его до  $0^{\circ}\text{C}$  без потери нативных свойств. Однако при быстром охлаждении до  $0^{\circ}\text{C}$  отдельные виды клеток проявляют высокую чувствительность к охлаждению в области положительных температур. Это клетки некоторых высших растений, половые клетки сельскохозяйственных живот-

ных, бактерии в экспоненциальной стадии роста и др. Явление повреждения клеток при быстром охлаждении в области положительных температур называется *температурным шоком*.

Развитие температурного шока зависит от скорости и температурного диапазона охлаждения и может быть предотвращено медленным понижением температуры или ограничением диапазона температур, в котором проводится охлаждение. С другой стороны, развитие температурного шока значительно зависит от природы клеток и особенно от состава и состояния липидов и мембранного цитоскелета. Важным температуро-зависимым процессом, развивающимся в мембране клеток при быстром их охлаждении, являются *фазовые переходы анулярных липидов*, которые следует рассматривать как начальный этап в механизме температурного шока.

Переход в фазу геля липидов, иммобилизованных белками, приводит к снижению активности ферментов, что выявляется на графиках Аррениуса в виде изломов кривых. Эти фазовые превращения могут привести к различным последствиям: нарушить активный и пассивный транспорт метаболитов и ионов, синтез веществ, производство энергии в клетке. В некоторых типах мембран (например, *E. coli*) кроме фазово-структурных переходов анулярных липидов может происходить латеральное разделение липидов в бислое, что способствует формированию трансмембранных дефектов, через которые содержимое клетки может покидать цитоплазму. В развитии дефектов в мембране важную роль играют холестерин и  $\text{Ca}^{2+}$ . Холестерин следует рассматривать как термальный буфер; его содержимое в мембране непосредственно определяет «ширину» температурного интервала фазовых переходов в липидном матриксе.

По механизмам термального шока клетки и субклеточные структуры можно условно разделить на три группы:

клетки и структуры, в мембранах которых отсутствует холестерин; температурные фазовые переходы липидов в мембранах начинаются значительно выше  $0^{\circ}\text{C}$  (некоторые микроорганизмы, синапсомы мозга, мембраны некоторых прокариот и др.);

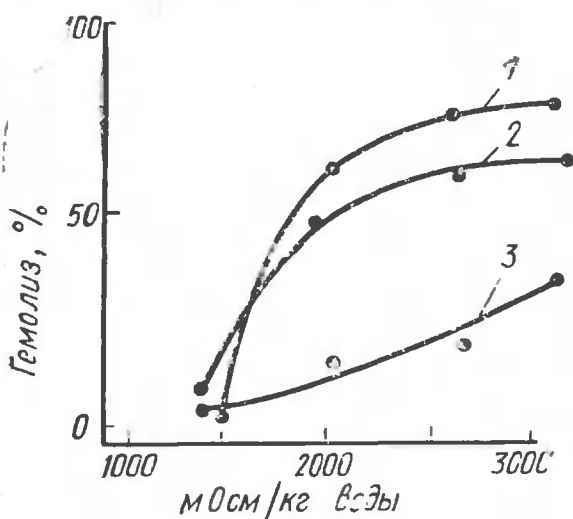
клетки и структуры с низким (5—15%) содержанием холестерина (мембраны микоплазм, митохондрий, лизосом и др.), для которых характерно развитие фазовых переходов липидов в диапазоне температур  $4-0^{\circ}\text{C}$ ;

клетки и структуры с высоким содержанием холестерина (лимфоидные клетки, эритроциты и др.), для которых характерны фазовые переходы липидов в зоне отрицательных температур.

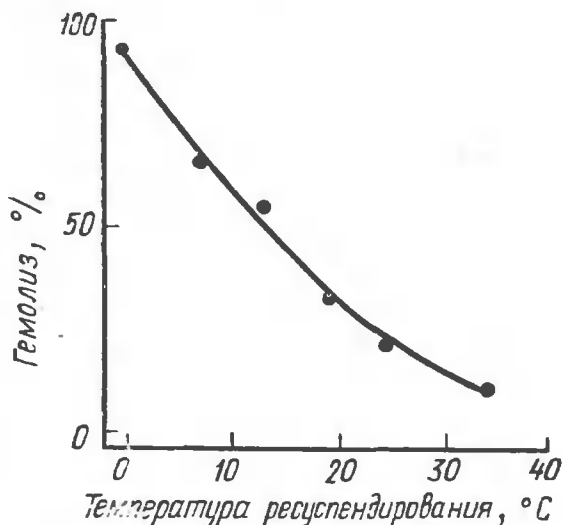
Отсутствие холестерина и наличие фазовых переходов липидов при пониженных температурах обуславливают высокую чувствительность клеток, например некоторых микроорганизмов, к охлаждению до температуры вблизи  $0^{\circ}\text{C}$ . В отличие от них эритроциты, мембраны которых обогащены холестерином, подвергаются температурному шоку исключительно в условиях, когда реализуется быстрое охлаждение и повышена осмотическая ак-

тивность среды. Поэтому применительно к подобным клеткам следует использовать термин *температурно-осмотический шок*. Такая реакция эритроцита на действие пониженной температуры и гиперосмолярности обусловлена тем, что мембрана эритроцита характеризуется выраженной асимметрией: она содержит более жесткий наружный и более жидкий внутренний слой.

Асимметрия мембран эритроцитов не только обусловлена преимущественной локализацией холестерина на наружной стороне бислоя, но и зависит от степени модификации белков на внутренней стороне мембраны (в первую очередь, спектрина) ко-



**Рис. 19.** Постгипертонический гемолиз эритроцитов человека после охлаждения в растворах NaCl и сахарозы (приготовленной на 0,9 % NaCl) и экспозиции в этих растворах (1 и 2 соответственно) при постоянной температуре (0 °C) (остальные объяснения см. в тексте)



**Рис. 20.** Постгипертонический гемолиз после экспозиции эритроцитов в водном растворе 40 %-ной сахарозы + + 2,53 %-ного NaCl при 0 °C в зависимости от температуры ресуспендирования в изотоническом растворе

торые взаимодействуют с интегральными белками бислоя и отдельными фосфолипидами и тем самым стабилизируют легко деформирующийся липидный бислой. В таких мембранах выявляются фазовые переходы липидов не во всей мембране, а в микроскопических доменах, из которых исключен холестерин; они охватывают температурный интервал от +10 до —20°C.

Эритроциты становятся чувствительными к охлаждению после нахождения в растворах NaCl выше 0,8 М, а также в растворах сахарозы. На рис. 19 (1, 2) приведены данные, характеризующие гемолиз эритроцитов после 5 мин экспозиции в гипертонических растворах NaCl и сахарозы и охлажденных от 25 до 0°C со скоростью 1,8 °C/мин, выдержанных при 0°C в течение 30 мин и затем ресуспендированных в изотоническом растворе NaCl с температурой 25°C. Для сравнения представлены данные (кривая 3) о гемолизе эритроцитов, подвергавшихся действию гипертонических растворов в условиях постоянной температуры

(0°C), а затем перенесенных в изотонический раствор с температурой 25°C.

Таким образом, экспозиция эритроцитов в гипертонических растворах NaCl и сахарозы с осмолярностью выше 1400 мОсм (0,75 М) приводит к их гемолизу при последующем охлаждении. С ростом концентрации растворов эффект охлаждения резко возрастает. Повреждающий эффект охлаждения становится более выраженным при увеличении времени экспозиции клеток в гипертонических растворах при 0°C. Вместе с тем повышение температуры ресуспендирования значительно снижает уровень гемолиза клеток, экспонированных при 0°C в гипертонических растворах NaCl и сахарозы (рис. 20).

Увеличение степени повреждения при возрастании времени экспозиции при 0°C связано во многом с наличием в эритроцитарной мембране жесткой белковой решетки, которая включает спектрин, актомиозиноподобные и интегральные белки, стабилизированные  $Mg^{2+}$ . Свойства этой решетки существенно зависят от структурного состояния спектрина, «сокращение» которого под влиянием  $Mg^{2+}$  способствует «замыканию» макроскопических дефектов мембраны. В условиях температур, близких к 0°C, и гиперосмолярности среды структурное состояние олигомеров спектрина изменяется настолько, что он утрачивает способность проявлять свои репаративные свойства, присущие ему при физиологических температурах и нормальной осмотической активности среды. Поэтому дестабилизация белковой сети из молекул спектрина при инкубации эритроцитов в условиях повышенной концентрации NaCl или сахарозы и последующее охлаждение могут привести вначале к утечке  $K^+$  через дефектные области мембраны и затем к осмотическому набуханию эритроцитов, т. е. к изменениям, вызывающим их гемолиз.

Вместе с тем увеличение экспозиции клеток в этих растворах по-разному влияет на чувствительность клеток к шоку. Если в 1,2 М растворе NaCl чувствительность к шоку увеличивается с ростом экспозиции от 0 до 5 мин, а при дальнейшем росте от 5 до 60 мин снижается, то в растворах сахарозы в смеси с NaCl (40% сахарозы и 2,53% NaCl) увеличение экспозиции приводит только к увеличению чувствительности к шоку.

Исследование массы внутриклеточной воды методом ЯМР-спектроскопии до и после охлаждения показало, что в 1,2 М растворе NaCl значение этого показателя после 30 мин экспозиции при +37°C не изменялось, а охлаждение клеток на протяжении 5 мин в этом растворе существенно не влияло на массу внутриклеточной воды при скорости охлаждения 0,33°C/мин. Однако при скорости охлаждения 39°C/мин масса внутриклеточной воды возрастала в 1,5 раза.

Исследование особенностей термального шока клеток показывает, что в основе этого процесса лежит возникновение *трансмембранных дефектов*, которые обеспечивают утечку содержимого клетки наружу. При выяснении природы этого механизма сле-

дует исходить из того, что основа формирования дефектов заложена в двойственном характере реакции плазматической мембраны на изменение осмотических и температурных условий среды. Это, во-первых, развитие молекулярных реакций в мембране как двумерном матриксе, включающем компоненты различной химической природы. При этом снижение температуры способно индуцировать в мембране такие молекулярные изменения, как конформационные перестройки состояния белков и фазово-структурные переходы молекул липидов в фазу геля. Во-вторых, низкая температура и изменение осмолярности среды вызывают макроскопические изменения клеток, связанные со свойствами плазматической мембраны образовывать замкнутый трехмерный контур клетки, способный при изменении осмотических условий изменять объем и форму. Поскольку изменение осмотических условий среды часто предшествует изменению температуры (например, при обработке криопротектором), возникает вопрос, какую роль играют процессы, сопровождающие макроскопическую трансформацию клетки в ее последующей реакции на снижение температуры?

В реальных условиях замораживание одновременно сопровождается изменением осмотических условий среды, и при переходе от охлаждения к отогреву модификация структуры в конечной точке замораживания будет оказывать влияние на последующее поведение клетки в фазе отогрева. Из этого следует, что проблема холодового повреждения связана прежде всего с оценкой исходного состояния плазматических мембран клеток как на предварительном этапе перед охлаждением, когда производят добавление криопротектора, так и на этапе отогрева. При уравнивании клеток с криопротекторами, солевыми растворами либо сложными средами, когда меняется осмотическая активность среды и температурный режим, во всех случаях наблюдается первичное изменение объема клетки.

Известно, что при температурах, близких к физиологическим, обмен воды и анионов в клетке протекает за  $\sim 100\text{--}200$  мс и осуществляется через белок полосы *III*. При повышении осмотической активности среды вслед за выходом воды клетку покидают анионы  $\text{Cl}^-$  в обмен на  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{OH}^-$  внешней среды, что ведет к защелачиванию цитоплазмы и изменению трансмембранного потенциала.

Увеличение трансмембранного потенциала приводит к возрастанию переноса анионов через белок полосы *III*, реализуя феномен *slippage* — временного конформационного дефекта переносчика, при котором возможно движение ионов в одном направлении. Следовательно, уже на этапах уравнивания клеток с криопротекторами создаются условия для формирования указанных дефектов.

Согласно современным данным осмотический механизм образования трансмембранных дефектов в липидных везикулах связан с *неустойчивостью липидного бислоя*, возникающей при из-

менении упруго-эластических свойств мембраны. При этом вода, проходящая сквозь липидный бислой, создает избыточное давление внутри везикул, которое определяется величиной растяжения мембраны. Допускают, что если поток воды наружу превосходит поток внутрь (наиболее часто в реальных условиях), то возникает так называемый *пульсирующий режим функционирования трансмембранного дефекта*, при котором циклы набухания сменяются сжатием везикул.

Однако в случае одновременного воздействия на клетку осмотического фактора и низкой температуры возникают более предпочтительные условия для формирования в ней трансмембранных дефектов. Это происходит потому, что низкая температура потенцирует эффекты, связанные с механическим растяжением мембраны, т. е. в этом случае причиной роста дефектов в структуре является низкотемпературная «усадка» липидов и дефицит площади мембраны, необходимой для поддержания ее непрерывности.

Изменение формы и объема клеток имеет также существенное значение в инициации, развитии и репарации дефектов. При этом температура инкубации оказывает существенное влияние на характер этих процессов при повышении осмотической активности среды. Например, при температуре 37°C и повышении концентрации NaCl выше 0,6 М направленность изменений в эритроцитах носит следующий характер: кренированные клетки (эхиноциты) → деформированные клетки со складчатой поверхностью → сфероциты. Причем для каждого из типов клеток определяется концентрационный интервал растворов NaCl и температура охлаждения — условия, при которых наблюдается указанная выше трансформация.

Важно, что между исходным уровнем освобождения  $K^+$  и лизисом клеток при последующем сдвиге температуры и тоничности среды существует выраженная корреляция. Причем утечка  $K^+$  развивается на этапе трансформации формы клеток от кренированных форм к сферическим, т. е. когда объем существенно изменяется. Это означает, что при температурном шоке в основе утечки ионов лежат внутренние перестройки компонентов мембраны в процессе трансформации клетки. Процесс трансформации в первую очередь отражает изменение состояния мембранного скелета. Следовательно, утечка  $K^+$  и других ионов тесно связана с изменением свойств мембранных белков, когда, очевидно, происходит открепление анкерина и спектрина от липидных компонентов мембраны.

Когда регулирующая роль спектрина устраняется, липидная фаза трансформируется таким образом, что в местах открепления возникают спиккулы, выпячивания и седловидные деформации, являющиеся зонами формирования трансмембранных дефектов, поскольку структурные и барьерные свойства мембраны в них резко нарушены. Температура и скорость охлаждения оказывают существенное влияние на процесс формирования дефек-



тов. Например, определено, что в интервале температур  $+37 \div -15 \div 0^\circ\text{C}$  процесс инициации дефектов в эритроцитах различен: ниже  $+15^\circ\text{C}$  уровень этого процесса резко снижается; при медленном охлаждении уменьшается скорость формирования дефектов; при быстром — процесс их релаксации. Поэтому если вблизи  $0^\circ\text{C}$  в мембранах клеток сформировались трансмембранные дефекты, где скорость их релаксации очень сильно замедлена, то при отогреве «заживление» структуры не происходит, и развивается повреждение, обусловленное потерей содержимого цитоплазмы.

При медленном охлаждении структуры дефекты «успевают залечиваться» на каждом из этапов этого процесса, т. е. низкая постоянная температура замедляет появление и рост дефектов, однако, если они уже появились и достигли критического уровня, низкая температура тормозит их обратное развитие.

## **Глава 6. Роль механического фактора в повреждении клеточных структур при замораживании — оттаивании**

Одна из наиболее ранних гипотез о *повреждении биологических структур при замораживании* была выдвинута в работах Н. А. Максимова (1913) на основе интуитивного представления о механическом повреждении этих структур растущими кристаллами льда. Это повреждение могло быть деформацией и разрывом цитоплазматических мембран, нарушением межклеточных контактов, деструкцией нормальной пространственной организации внутри клетки.

Т. Ней (1970), изучая повреждение эритроцитов при замораживании методом криомикроскопии, установил, что клетки, сгруппированные в жидких каналах между кристаллами льда, повреждаются больше, чем одиночные клетки, свободно взвешенные в канальцевом растворе. Он установил, что гемолиз значительно возрастает с увеличением количества клеток в единице объема замораживаемой суспензии. В результате был сделан вывод о существовании *феномена механического раздавливания клеток растущими кристаллами внеклеточного льда*.

Еще одним косвенным свидетельством в пользу этого является повреждение клеток во время рекристаллизационного укрупнения внутриклеточного льда при отогреве. Так, Луи Рэ (1962) и Ф. Р. Виноград-Финкель и сотрудники (1963) считают, что повреждение биологических объектов в период отогрева происходит преимущественно в области рекристаллизационных изменений, а более благоприятное влияние быстрого отогрева (по сравнению с медленным) на сохранность многих видов предварительно замороженных клеток объясняется уменьшением времени нахождения образца в зоне рекристаллизации. Роль внутриклеточной рекристаллизации в нарушении ультраструктурной организации подчеркивал также Дж. К. Шерман (1963). Механизм



повреждения клеток при образовании, росте и рекристаллизации внутриклеточных кристаллов в настоящее время окончательно не выяснен.

Повреждения могут быть вызваны как проявлением механического феномена, так и *обезвоживающим действием внутриклеточного льда*. По мнению Дж. Левита (1956), рост кристаллов льда в протоплазме вызывает «срезающие» усилия, обуславливающие механическую денатурацию макромолекул. Е. Асахина (1959, 1960), исследуя повреждение яйцеклеток морского ежа, предположил, что внутриклеточная кристаллизация не является причиной гибели этих клеток и что повреждение наступает скорее всего в результате выпадения кристаллов в эвтектической точке. Было обнаружено, что температура, при которой погибают яйцеклетки морского ежа, хорошо коррелирует с эвтектической точкой суспензионной среды. Например, когда яйцеклетки замораживали в растворе  $\text{KNO}_3$ , эвтектическая точка которого составляет  $-2,8^\circ\text{C}$ , 90% клеток выживало при охлаждении до  $-2,5^\circ\text{C}$ , но все клетки погибали при охлаждении до  $-5^\circ\text{C}$ . С другой стороны, в растворе  $\text{NaCl}$ , эвтектическая точка которого составляет  $-21,6^\circ\text{C}$ , 90% клеток выживало при охлаждении до  $-25^\circ\text{C}$  и только 3% — после охлаждения до  $-30^\circ\text{C}$ . Здесь следует отметить, что хотя эвтектическая точка водного раствора  $\text{NaCl}$  составляет  $-21,6^\circ\text{C}$ , полное затвердевание в процессе охлаждения не осуществляется вплоть до температур  $-(27-30)^\circ\text{C}$ . Е. Асахина предположил, что обезвоживание в эвтектической области приводит к повреждению клеточных мембран и таким образом способствует внутриклеточной кристаллизации. Указанная корреляция, однако, отсутствовала, когда яйца морского ежа другого вида охлаждались со скоростью  $5-9^\circ\text{C}/\text{мин}$  до температуры  $-8^\circ\text{C}$ . При этом внутриклеточная кристаллизация наступала, хотя эвтектическая точка морской воды, в которой клетки замораживались, была ниже  $-8^\circ\text{C}$  более чем на  $12^\circ\text{C}$ .

П. Мейзур (1962—1972), в свою очередь, привел доказательства, что *внутриклеточная кристаллизация* является непосредственной причиной криоповреждения, а не следствием воздействия других повреждающих факторов. Во-первых, область летальных температур для дрожжевых клеток *S. cerevisiae* не соответствует эвтектической точке среды. Выживаемость резко падала между  $-10$  и  $-20^\circ\text{C}$  независимо от того, суспендировали ли клетки в дистиллированной воде или в  $0,1\text{ M}$  растворах  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  или  $\text{CaCl}_2$  (с эвтектическими точками  $-2,7$ ,  $-21,6$  и  $-50^\circ\text{C}$  соответственно). Во-вторых, скорости охлаждения, которые приводят к полной гибели клеток, совпадают со скоростями охлаждения, при которых образуется внутриклеточный лед. В-третьих, способность к выживанию быстро замороженных дрожжевых клеток становится зависима от скорости последующего отогрева. Например, когда клетки охлаждаются со скоростью  $400^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-196^\circ\text{C}$ , то выживаемость после отогрева со скоростями 1, 1400

и  $40\,000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  составляла (в процентах от контроля) соответственно  $10^{-6}$ ,  $3 \cdot 10^{-3}$  и  $10\%$ .

Следует также обратить внимание на следующие обстоятельства. Когда замораживают водный раствор солей или цитоплазму, из раствора выпадают кристаллы чистого льда и количество жидкой фазы уменьшается с понижением температуры. Для раствора с исходной концентрацией ( $n$ ) при постоянном давлении доля незамерзшей воды ( $\alpha$ ) однозначно определяется температурой. Для идеального раствора  $\alpha \approx -1,86 \sqrt{n}/t$ , где  $1,86$  — криоскопическая константа для воды,  $\sqrt{n}$  — число ионов, на которое диссоциирует растворенное вещество,  $t$  — температура в  $^{\circ}\text{C}$ . Для большинства клеток животных осмотичесность цитоплазмы, т. е.  $\sqrt{n}$ , составляет около  $0,3 \text{ М/л}$  (так что  $\alpha = 0,56/t$ ). Для дрожжей  $\sqrt{n} = 0,56 \text{ М/л}$ , поэтому  $\alpha \approx 0,93/t$ . Из последнего уравнения следует, что при  $-5$ ,  $-10$  и  $-15^{\circ}\text{C}$  процентное содержание незамерзшей воды в дрожжах приблизительно составляет 18, 9 и 6%. Однако известно, что высушиванием на воздухе из дрожжей может быть удалено 96% клеточной воды без утраты ими жизнеспособности и ферментативной активности, поэтому маловероятно, чтобы обезвоживание внутриклеточными кристаллами было причиной гибели дрожжей при замораживании.

Кристаллы льда, которые образуются в клетке, имеют тенденцию расти вдоль жидких цитоплазматических каналов, образованных структурными белками клетки. Это видно из наблюдений по замораживанию миофибрилл: кристаллы льда растут вдоль длинных осей фибрилл. Такое поведение объясняется тем, что кристалл льда растет благодаря превращению жидкой воды в твердое состояние. Если растущий кристалл достигает неводного компонента, он прекращает рост в этом направлении из-за отсутствия питающей жидкости. Существует лишь два источника энергии, за счет которых кристалл с некоторой силой может действовать на неводный компонент.

Одним из источников может быть *давление*, создаваемое за счет того, что объем воды при превращении ее в лед увеличивается на 10%. Вторым — может явиться *разность свободных энергий* между кристаллом льда и окружающей его переохлажденной жидкостью. Вероятно, кристалл льда будет расти в том направлении, при котором указанные силы минимальны. Иными словами, он будет иметь тенденцию расти через водные части протоплазмы скорее, чем оказывать разрывающее усилие на мембраны и другие структурные компоненты. Кристалл льда является наиболее стабильным (обладает минимальной свободной поверхностной энергией), когда его поверхность является плоской, а следовательно, имеет бесконечный радиус кривизны. Области положительной кривизны соответствует более высокое давление паров воды, чем области отрицательной кривизны. Взаимосвязь между давлениями паров определяется уравнением Кельвина:

$$\ln(p_c/p_{\infty}) = 2V_L \sigma / rRT,$$

где  $p_c$  и  $p_\infty$  — давление паров воды над искривленной и плоской поверхностями льда соответственно,  $V_L$  — молярный объем льда,  $\sigma$  — коэффициент поверхностного натяжения между льдом и водой,  $r$  — радиус кривизны кристалла,  $R$  — универсальная газовая постоянная,  $T$  — температура в градусах К.

Молекулы воды будут стремиться двигаться от выпуклой поверхности к вогнутой. Однако их переходу к участку поверхности с большим радиусом кривизны могут препятствовать структурные ограничения, создаваемые мембранными компонентами клетки. Возможно, это явление лежит в основе повреждения клеток внутриклеточными кристаллами льда при медленном охлаждении.

Некоторые исследователи наблюдали понижение точек замерзания в сильно связанных гелях (подобных тем, что образуются при смешении полиакриловой кислоты и поливинилового спирта) по сравнению с гелями, имеющими небольшое количество поперечных связей. Несмотря на это, точка плавления сильно сшитых гелей была нормальной. Этот факт указывает на то, что на более поздних стадиях замораживания и, вероятнее всего, при последующем отогреве микрокристаллы льда разрушали поперечные связи и преобразовывались в макрокристаллы с нормальной точкой плавления.

А. Кингери (1959) наблюдал за двумя сферами льда, приведенными в соприкосновение. Диаметр контакта между ними рос со скоростью, зависящей от температуры. Для сфер с диаметром 2 мм ширина контакта росла от 0 до 0,2 мм за 1 мин при  $-2^\circ\text{C}$  и за 100 мин при  $-25^\circ\text{C}$ . Для более мелких сфер скорость роста была значительно выше. Выводы, вытекающие из описанных экспериментов, могут служить основой для объяснения наблюдаемого в эксперименте влияния скорости отогрева на сохранность биологических объектов, если предположить, что причиной повреждения является *изменение размеров и формы кристаллов льда*, ведущее к разрушению структурных компонентов клетки.

Значительное влияние на характер протекающих в клеточных суспензиях кристаллизационных процессов оказывают *скорость охлаждения и степень переохлаждения* суспензии до начала кристаллизации. При изучении влияния скоростей охлаждения на неоплодотворенные яйцеклетки мыши показано, что процент клеток, содержащих внутриклеточные кристаллы льда, увеличивается от 13 до 72 и 100%, когда яйцеклетки охлаждают со скоростью 1,3; 2,9 и  $4,8^\circ\text{C}/\text{мин}$  соответственно. Скорости охлаждения, при которых происходит внутриклеточное кристаллообразование, зависят от вида клеток. Внутриклеточный лед образуется в яйцеклетках морского ежа, клетках дрожжей и сперматозоидах быка при скоростях охлаждения выше  $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ , в клетках костного мозга человека — при скоростях охлаждения выше  $1,6$ , в эритроцитах человека — при скоростях охлаждения от 5000 до  $6^\circ\text{C}/\text{мин}$  (в зависимости от степени переохлаждения замораживаемых образцов).

Одним из проявлений «кристаллизационного» давления является способность растущих кристаллов льда отодвигать взвешенные в расплаве твердые макроскопические частицы и капельки нерастворимых жидкостей. Установлено (В. Л. Бронштейн и др., 1980), что растущие кристаллы льда способны перемещать взвешенные в растворе клетки на расстояния, значительно превыша-

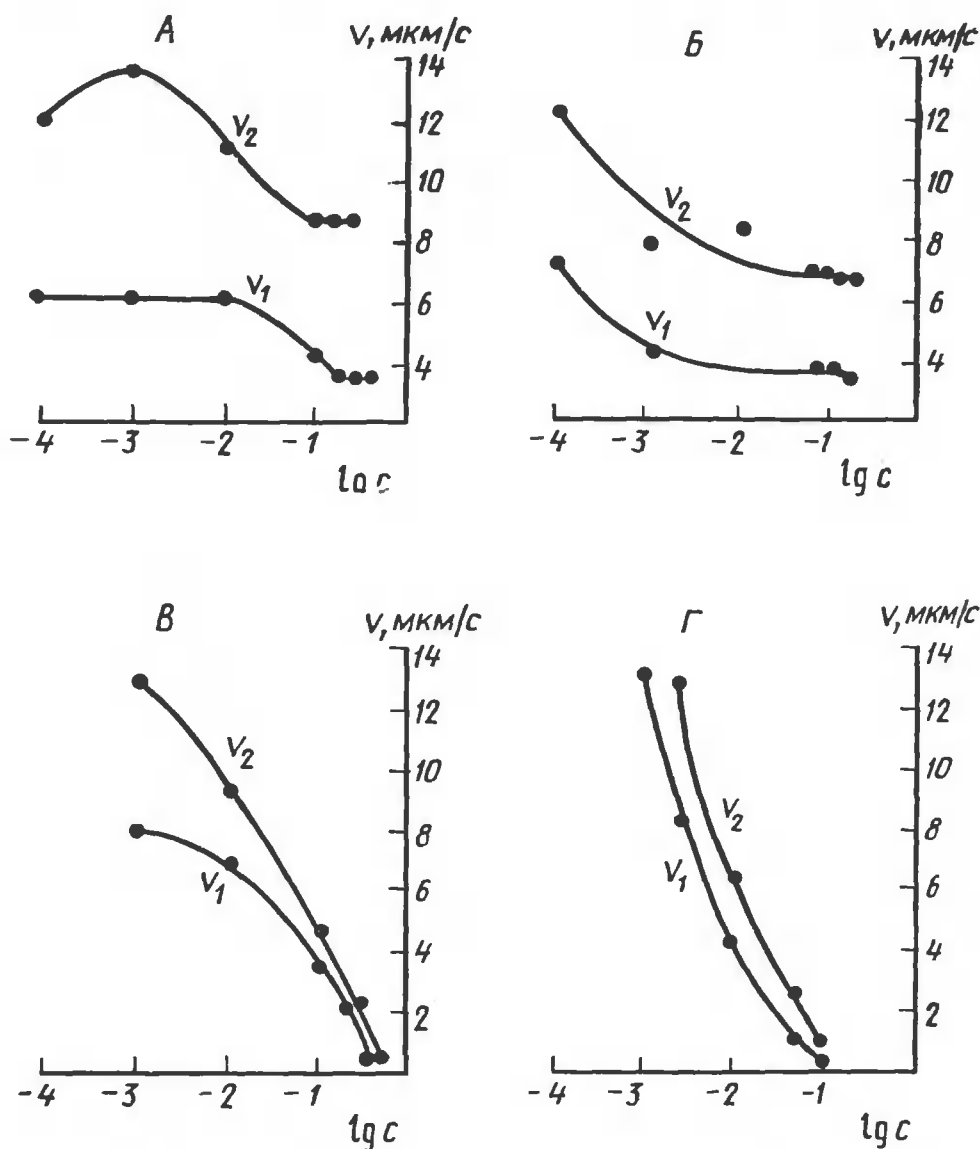


Рис. 21. Зависимость критических скоростей отодвигания — захвата эритроцитов человека от концентрации водного раствора NaCl (А), NH<sub>4</sub>Cl (Б), глицерина (В) и ПЭО-400 (Г)

ющие их размеры. При этом существует такой критический диапазон скоростей роста кристаллов  $v_{1\text{кр}} < v < v_{2\text{кр}}$ , что при движении фронта кристаллизации со скоростью  $v < v_{1\text{кр}}$  им отодвигаются практически все клетки, а при скорости  $v > v_{2\text{кр}}$  не отодвигается ни одна клетка и все они захватываются растущим кристаллом льда.

Зависимость критических скоростей ( $v_{1\text{кр}}$  и  $v_{2\text{кр}}$ ) от концентрации растворов солей (NaCl и NH<sub>4</sub>Cl) и криопротекторов (гли-

цери́на и полиэтиленглико́ля с молекулярной массой 400) во внеклеточной среде при замораживании дрожжевых клеток показана на рис. 21. В среде, не содержащей криопротекторы, растущие кристаллы льда отодвигают эритроциты человека. Максимально возможная скорость ( $v_{1\text{кр}}$ ) для этого случая изменялась от 0 до 4 мкм/с в зависимости от состава, pH и осмотического давления внеклеточного раствора. В случае не защищенной криопротектором суспензии захват эритроцитов в лед приводит к частичному или полному разрушению клеток. Визуально это выражалось в превращении эритроцитов в обесцвеченные после выхода гемоглобина из клеток тени. Если же клетки отодвигались растущим кристаллом льда, то их повреждение визуально не наблюдалось.

При изучении особенностей взаимного влияния скоростей охлаждения и отогрева на сохранность различного биологического материала установлено, что увеличение скорости отогрева после быстрого замораживания, сопровождающегося внутриклеточной кристаллизацией, оказывает выраженный *защитный эффект*. После медленного замораживания влияние скорости отогрева на сохранность реконсервированного материала мало. Указанная закономерность обычно объясняется тем, что разрушение клеток обусловлено механическим повреждением в процессе рекристаллизации внутриклеточных кристаллов при небольших скоростях отогрева.

Механическое взаимодействие растущих кристаллов льда с клетками в растворах уменьшается с увеличением концентрации криопротекторов в них. В частности, в области концентраций выше 0,1 М в растворах криопротекторов клетки практически не отодвигались льдом, в то время как в солевых растворах этот процесс происходил со скоростью нескольких микрометров в одну секунду. В частности, добавление криопротектора в концентрации 5% или более к изотоническому раствору NaCl приводило к практически полному исчезновению механического взаимодействия между клетками и льдом. Таким образом, одной из сторон защитного действия этих веществ на клетку при замораживании является их способность ослаблять величину механического взаимодействия кристаллов льда с биологическими структурами.

## Глава 7. Гипотеза минимального объема

Одним из наиболее важных факторов криоповреждения при кристаллизации клеточной суспензии является повышение концентрации растворенных веществ в окружающей клетки жидкой фазе. Основной составной частью физиологической среды, в которой находятся клетки в норме, является водный раствор NaCl (концентрация около 0,15 М), поэтому представление об изменении концентрации NaCl в окружающем клетки растворе с понижением температуры при замораживании клеточной суспензии в отсутствие криопротектора может дать диаграмма плавления (рис. 22). На основании экспериментов, в которых гемолиз эри-

троцитов при замораживании наблюдался, когда концентрация внеклеточного NaCl достигала 0,8 М, Дж. Лавлок (1953) сделал вывод, что причиной повреждения клеток является увеличение концентрации электролитов до этого значения. С точки зрения этой гипотезы, добавление глицерина к суспензии клеток приводит к уменьшению количества льда, а следовательно, и к уменьшению концентрации электролитов в жидкой фазе, окружающей клетки, по сравнению с концентрацией электролитов при той же температуре в отсутствие криопротектора. Приведенная ниже эмпирическая формула связывает температуру повреждения мембраны электролитом с исходной концентрацией в клеточной суспензии глицерина:

$$c_{0k} = c_{0s} \left( 2 - \frac{T_{кр} - T^*}{Kc_s^*} \right). \quad (2)$$

Здесь  $c_{0k}$  и  $c_{0s}$  — исходные концентрации глицерина и соли в межклеточной жидкости соответственно;  $T_{кр}$  — температура кристаллизации межклеточного раствора;  $T^*$  — температура, при которой наступает повреждение клеток;  $K$  — криоскопическая константа;  $c_s^*$  — критическая концентрация соли, равная 0,8 М.

Из формулы видно, что при увеличении исходной концентрации криопротектора сильно понижается температура, при которой концентрация электролита в окружающем клетки растворе в процессе замораживания достигает предельно допустимого значения. В соответствии с гипотезой Дж. Лавлока защитное действие должен оказывать любой хорошо проникающий в клетки криопротектор, в частности диметилсульфоксид в концентрации 3 М. Действительно, концентрация NaCl в 5%-ном водном растворе диметилсульфоксида при  $-10^\circ\text{C}$  увеличивается в пять раз по сравнению с начальной и с понижением температуры растет. В то же время подобная концентрация NaCl в 10%-ном (3 М) растворе достигается только при температуре  $-80^\circ\text{C}$ . Проникая в клетку, криопротектор предотвращает чрезмерное увеличение концентрации солей и в протоплазме.

Лавлок объяснил повреждающее действие электролитов их лиотропным эффектом на липидные компоненты мембран: в течение экспозиции клеток в средах с повышенной концентрацией соли в надосадочной жидкости появлялись холестерин и мембранные фосфолипиды. На ограниченную сферу действия этого механизма повреждения указал П. Мейзур (1965), выяснив, что для проявления лиотропного эффекта необходимо слишком долго экспонировать клетки в солевом растворе.

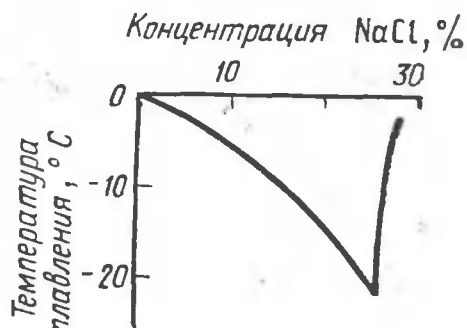


Рис. 22. Диаграмма плавления водного раствора NaCl

Согласно гипотезе физического контакта (Дж. Левит, 1967) необратимые изменения, вызывающие повреждения клеток в процессе низкотемпературного воздействия, связаны с образованием дисульфидных мостиков между соседними белками или отдельными участками одной молекулы путем окисления SH-групп. Это происходит в процессе обезвоживания клеток и возникающей деформации их мембран: увеличивается концентрация белков, например ферментов, или происходит соприкосновение мембранных структур, которые в нормальном состоянии отдалены друг от друга. Возникающие при этом прочные (энергия связи порядка 200 кДж/моль) S—S-связи являются более сильными, чем водородные, и обуславливают необратимость процесса.

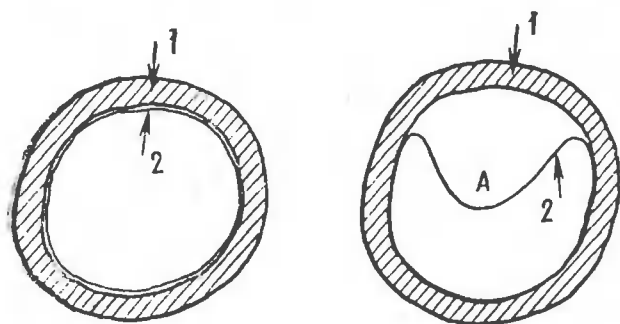


Рис. 23. Натяжение плазматической мембраны растительной клетки в процессе ее обезвоживания гипертоническим раствором (пояснение см. в тексте)

Левит объяснил гибель растительных клеток в процессе замораживания следующим образом.

Избирательно проницаемая плазматическая мембрана (2) растительной клетки (рис. 23) располагается под жесткой, хорошо проницаемой для разных веществ клеточной оболочкой (1) и частично связана с ней. Поэтому в гипертоническом растворе, когда клетка обезвоживается, область А плазматической мембраны, не связанная с клеточной стенкой, подвергается растяжению. Растяжение мембраны, по мнению Левита, влечет за собой появление разрывов в липидном слое, вследствие чего оказывается возможным контакт белков, расположенных по обе стороны этого слоя, и образование прочных дисульфидных связей между ними. Если таковые возникают, то после оттаивания аномальные связи между белками, которые находятся во внешнем и внутреннем монослоях мембраны, сохраняются, а целостность липидного слоя не восстанавливается. Этим объясняется утрата плазматической мембраной свойства избирательной проницаемости после замораживания. Кроме того, в соответствии с указанными представлениями в процессе замораживания образуются прочные дисульфидные связи между белками мембран и прилегающими к ним белками плазмы, что ведет к необратимому повышению жесткости поверхности мембраны. Из-за этого при реаккумуляции воды клетками мембрана растягивается хуже, чем в процессе обезвоживания, что может привести к ее разрыву на этапе отогрева. В пользу выдвинутой Левитом гипотезы свидетельствует понижение содержания SH-групп в растениях, подвергнутых холодной «закалке», по сравнению с «незакаленными».



Г. Т. Меримен (1969—1974) обнаружил, что клетки повреждаются не только гипертоническими солевыми растворами, но и несолевыми растворами, осмотическое давление которых эквивалентно водному раствору NaCl с концентрацией 0,8 М. Так, гемолиз эритроцитов человека всегда начинался при одной и той же осмолярности (около 1800 мОсм) в разных растворах, хотя содержание электролитов в них в момент повреждения было небольшим. Для изучения повреждаемости мембран эритроцитов вследствие увеличения внутриклеточной концентрации электролитов сопоставлялись результаты однотипных опытов с нормальными эритроцитами и с эритроцитами, которые имеют пониженное содержание внутриклеточных электролитов. В нормальных клетках гемолиз начинался при осмолярности внеклеточного раствора около 1800 мОсм. В начале гемолиза объем эритроцитов составлял 55% от исходного, при этом терялось около 65% клеточной воды. Эритроциты, лишенные  $K^+$  и уступающие нормальным в размере, начинали гемолизироваться при 700 мОсм, но почти при том же объеме, при котором начинался гемолиз нормальных клеток. Поскольку при гемолитическом объеме в этих двух группах сильно различались концентрации внутриклеточных солей, Меримен пришел к заключению, что концентрирование внутриклеточной соли не может иметь решающего значения в повреждении клеток в процессе их обезвоживания.

Тот факт, что эритроциты, в которых клеточная вода на 50% замещена глицерином, повреждаются при таком же относительном объеме, как и незащищенные, свидетельствует о том, что к повреждению клеточных мембран приводит не удаление воды как таковое, а уменьшение клеточного объема. Результаты всех экспериментов указывают на то, что причиной повреждения является скорее всего *уменьшение объема клетки до критического значения*. Гипотеза минимального объема позволила указать некоторые из возможных механизмов устойчивости клеток к замораживанию. Так, хорошо проникающие в клетку криопротекторы, в соответствии с этой гипотезой увеличивая неводный объем клетки, тем самым защищают ее от повреждения, поскольку в результате больше воды должно быть удалено из клетки, прежде чем общий объем ее уменьшится до критического значения. Еще одним способом самозащиты клеток является их способность допускать «втекание» внеклеточного раствора внутрь клетки, когда клеточный объем приближается к критическому. Так, гранулы хлоропласта листьев зимостойкого шпината при замораживании, когда осмолярность внеклеточного раствора превышала некоторое определенное значение (около 800 мОсм), становились проницаемыми для растворенных веществ, предупреждая дальнейшее уменьшение объема клеток и их необратимое повреждение (Г. Т. Меримен, 1971).

Объем эритроцитов, суспендированных в концентрированных растворах NaCl, уменьшался с увеличением осмолярности внеклеточной среды до 1100 мОсм, затем оставался примерно посто-



янным при дальнейшем увеличении осмолярности до 1300 мОсм, после чего возрастал, что сопровождалось «втеканием» внеклеточной среды в клетку. Возвращение в этом случае клеток в изотонические условия приводило к немедленному их разрушению. Поведение тромбоцитов в гипертонических средах было похожим на поведение эритроцитов (Г. Т. Меримен, 1974). Объем тромбоцитов уменьшался по мере увеличения осмотичности среды, пока она не достигала значения, в 5 раз превышающего осмотичность физиологического раствора (около 300 мОсм). При дальнейшем увеличении концентрации растворенных во внеклеточной среде веществ клеточные мембраны становились проницаемыми для внеклеточного раствора, теряли калий и серотонин.

Как видно из изложенного, существующие в настоящее время представления о криповреждении мембранных структур гипертоническими растворами следует рассматривать как набор рабочих гипотез, подлежащих уточнению и развитию в будущем. Видимо, при низкотемпературном консервировании биологических суспензий к повреждению мембран приводят все описанные выше факторы в совокупности.

## Глава 8. Двухфакторная гипотеза криповреждения

Экспериментальные данные, накопленные к началу 60-х годов, свидетельствовали о том, что для каждого типа заморажи-

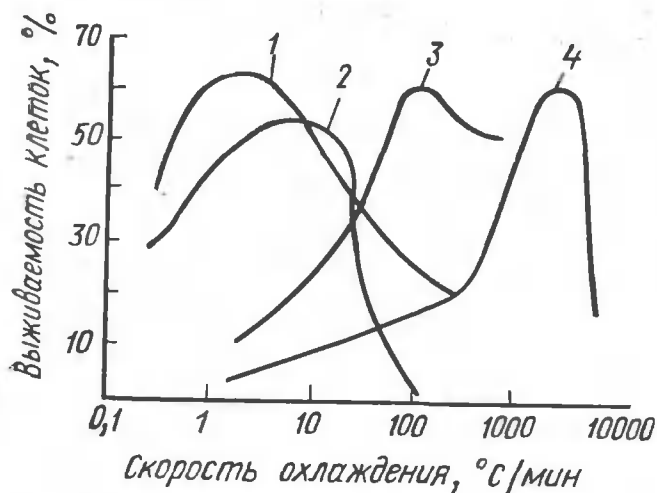


Рис. 24. Сохранность четырех различных типов клеток как функция скорости охлаждения до  $-196^{\circ}\text{C}$ :

1 — костный мозг, 2 — дрожжи, 3 — клетки культуры ткани почки китайского хомячка, 4 — эритроциты

ваемых клеток можно подобрать некоторое оптимальное значение скорости охлаждения, которое обеспечивает лучшую сохранность клеток. Зависимость показателя сохранности деконсервированных клеток от скорости охлаждения в большинстве случаев имела куполообразную форму (как показано на рис. 24). В отсутствие крипротектора максимальное значение показателя сохранности для клеточных суспензий, как правило, мало. Оптимальное значение скорости охлаждения неодина-

ково и изменяется на три-четыре порядка для разных клеток. Так, для незащищенных эритроцитов человека оптимальная скорость охлаждения составляет около  $3000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , для дрожжей — 10, для яйцеклеток мыши — 0,1, для клеток культуры ткани почки китайского хомячка —  $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

Указанные закономерности и другие экспериментальные факты в общих чертах объяснила так называемая *двухфакторная гипотеза криоповреждения*, сформулированная и экспериментально обоснованная П. Мейзуром (1963—1972). Согласно этой гипотезе на выживаемость клеток в процессе кристаллизации клеточной суспензии оказывают влияние два типа явлений и связанных с ними повреждающих факторов.

К первому типу относятся такие явления, как: 1) чрезмерное осмотическое обезвоживание клеток, в результате которого увеличивается концентрация внутриклеточных веществ, приводящая к высаливанию и необратимой денатурации растворимых белков или к повреждению мембранных структур из-за потери обеспечивающей их нормальное состояние доли воды; 2) разрушение клетки за счет контакта с омывающей кристаллы льда средой, концентрация растворенных веществ в которой из-за превращения части растворителя в лед непрерывно увеличивается вплоть до эвтектической области; 3) резкое изменение кислотности и ионной силы растворов вне и внутри клеток в процессе замораживания; 4) повреждение клеточной мембраны вследствие достижения клеткой минимального объема.

Второй тип явлений повреждения связан с образованием внутриклеточных кристаллов льда, которое приводит к таким же явлениям, что и обезвоживание, а кроме того, вызывает механическое разрушение мембранных структур, особенно в процессе рекристаллизации внутриклеточных кристаллов при медленном отогреве суспензии.

За последнюю четверть века под влиянием новых экспериментальных данных взгляды на повреждающее действие внутриклеточного льда в процессе криоконсервирования существенно изменились. Если ранее считали, что образование кристаллов льда внутри клетки неизбежно ведет к ее гибели, а затем, что гибель клеток наступает при увеличении радиуса внутриклеточного кристалла до определенного, критического значения, то, по современным представлениям, повреждение клеток сильнее всего коррелирует с полным количеством льда внутри клетки.

Степень повреждения, вызываемого каждым из указанных факторов первого типа, повышается по мере увеличения продолжительности их воздействия и может быть снижена за счет увеличения скорости охлаждения замораживаемой суспензии. Напротив, для предотвращения летального воздействия факторов второго типа, связанных с внутриклеточной кристаллизацией, скорость охлаждения должна быть уменьшена. Обезвоживание клеток и внутриклеточное кристаллообразование вызываются одной и той же термодинамической силой — недонасыщением протоплазмы по отношению ко внеклеточному раствору, что является причиной значительной отрицательной корреляции обоих процессов.

С повышением интенсивности обезвоживания клетки величина недонасыщения ее протоплазмы по отношению ко внеклеточ-

ному раствору ( $\delta c$  на рис. 2) уменьшается и образование кристаллов льда внутри клетки становится менее вероятным. Наоборот, с понижением интенсивности обезвоживания клетки вероятность образования в ней кристаллов льда возрастает. Как чрезмерное обезвоживание клеток, так и внутриклеточное кристаллообразование приводят к повреждению консервируемого материала. Учитывая все это, Мейзур пришел к заключению, что для каждого типа клеток существует оптимальная (обеспечивающая максимальную сохранность) скорость охлаждения. Эта скорость настолько мала, что внутриклеточное кристаллообразование не успевает осуществляться, но в то же время она достаточно велика, чтобы свести к минимуму период экспозиции клеток в каналах с гипертонической жидкостью в период замораживания. В связи с этим количественное описание процессов обезвоживания клеток и вероятности внутриклеточного кристаллообразования, а также определение условий, при которых понижается их интенсивность, имеют как теоретическое, так и практическое значение.

При описании процессов обезвоживания клеток в качестве начального состояния системы принимают состояние, при котором суспензия имеет температуру, соответствующую точке начала кристаллизации цитоплазмы, клетки окружены льдом, а внутри клеток находится недонасыщенный раствор. Из-за непрерывного превращения воды в лед концентрация веществ в жидкой фазе, окружающей клетки, по мере охлаждения кристаллизующейся суспензии повышается (коэффициент захвата растворенных веществ льдом равен нулю). Под влиянием перепада осмотического давления между протоплазмой и внеклеточным раствором клетки обезвоживаются. Феноменологически этот процесс описывается уравнением линейной неравновесной термодинамики

$$j_w = S \frac{K_w}{V_w} [\mu_w^i(n^i) - \mu_L^e]_{pT}, \quad (3)$$

где  $j_w$  — число молей воды, покидающих клетку через единичную площадку ее мембраны в единицу времени;  $K_w$  — коэффициент проницаемости клеточной мембраны для молекул воды;  $T$  — температура;  $p$  — давление;  $n^i$  — суммарная концентрация растворенных в клетке веществ;  $\mu_w^i$  — химический потенциал воды в клетке;  $\mu_L^e$  — химический потенциал внеклеточного льда;  $V_w$  — молярный объем воды;  $S$  — площадь поверхности клеточной мембраны. С помощью известных соотношений

$$j_w = -dV/dt \text{ и } \mu_w^i(n^i) - \mu_L^e = -RT(n^i - n^e)/V_w, \quad (4)$$

где  $t$  — время,  $V$  — объем клетки,  $R$  — универсальная газовая постоянная,  $n^i$  и  $n^e$  — суммарная концентрация растворенных веществ внутри и вне клетки соответственно, уравнение (1) приводится к виду

$$dV/dt = SK_w RT(n^i - n^e)/V_w. \quad (5)$$

В предположении, что через плазматическую мембрану проникают только молекулы воды, но не растворенных веществ, имеем

$$n^i = n_0^i V_0 / V, \quad (6)$$

где индекс 0 относится к начальным значениям помеченных им величин. При малых концентрациях раствора

$$n^e = - \frac{q (\tilde{T}(n) - T_{\text{кр}})}{RT_{\text{кр}}^2}, \quad (7)$$

где  $q$  — скрытая теплота плавления;  $T_{\text{кр}}$  — температура кристаллизации чистого растворителя (273 К);  $\tilde{T}(n)$  — функция, описывающая зависимость температуры кристаллизации раствора от его концентрации, т. е. фазовую диаграмму, аналогичную представленной на рис. 2. Наконец, учитывая закон Аррениуса, можно представить коэффициент проницаемости плазматической мембраны для воды в виде

$$K_w = K_w(T_0) e^{b(T-T_0)/RT_0^2}. \quad (8)$$

Здесь  $K_w(T_0)$  — значение коэффициента проницаемости при температуре  $T_0$ ;  $b$  — энергия активации процесса переноса молекул воды через мембрану. Из (2) с учетом соотношений (3) — (8) получается уравнение

$$\frac{dy}{dt} = \frac{\gamma_0 K_w(T_0) RT}{\beta} e^{b(T-T_0)/RT_0^2} \left[ \frac{n_0^i}{y} + \frac{q(T-T_0)}{V_w RT_0^2} \right], \quad (9)$$

которое связывает относительный объем внутриклеточной воды  $y = V/V_0$  с температурой, скоростью охлаждения  $\beta$  (которая считается постоянной) и клеточными параметрами  $\gamma_0$  (исходное значение поверхностно-объемного отношения клетки),  $b$ ,  $n_0^i$  и  $K_w(T_0)$ .

На рис. 25 и 26 приведены рассчитанные по этому уравнению зависимости относительного объема внутриклеточной воды от температуры при разных скоростях охлаждения для эритроцитов человека и неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа (П. Мейзур, 1963). Решение уравнения (9) сильно зависит от параметров  $b$  и  $S$ . Первый из указанных параметров может значительно изменяться за счет фазовых переходов в мембране, протекающих в процессе ее охлаждения. В общем случае аппроксимация температурной зависимости коэффициента проницаемости плазматической мембраны клетки для молекул воды из области положительных в область отрицательных температур с помощью соотношения (5) является неправомочной. Что касается параметра  $S$ , то его в большинстве случаев можно считать постоянным, поскольку мембране энергетически «выгоднее» осуществлять деформацию путем чистого изгиба (без изменения площади), чем сжиматься или растягиваться.

Расчеты показали, что обезвоживание клеток возрастает с уменьшением скорости охлаждения кристаллизующейся суспензии, а переохлаждение протоплазмы снижается. Поскольку вероятность внутриклеточного кристаллообразования экспоненциально повышается по мере переохлаждения цитоплазмы, при достаточно большой скорости охлаждения оно становится практически неизбежным. Как только внутри клетки образуется лед, ее обезвоживание прекратится или будет протекать с ничтожно малой скоростью.

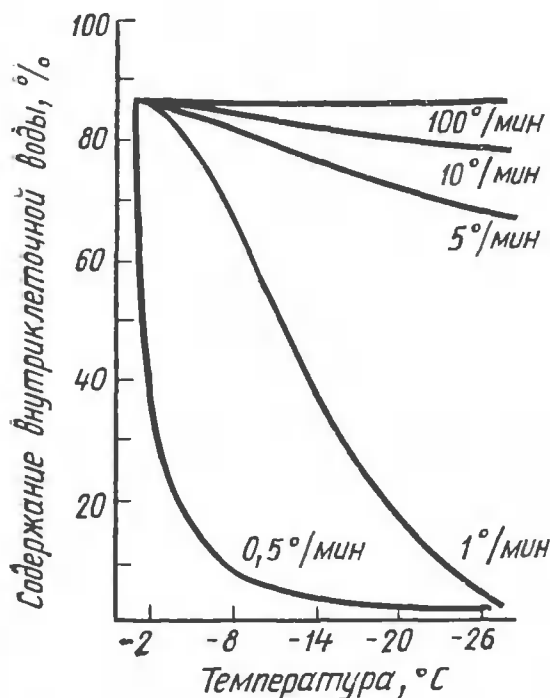


Рис. 25. Содержание внутриклеточной воды [рассчитанное по уравнению (9)] в неоплодотворенных яйцеклетках морского ежа при различных скоростях охлаждения

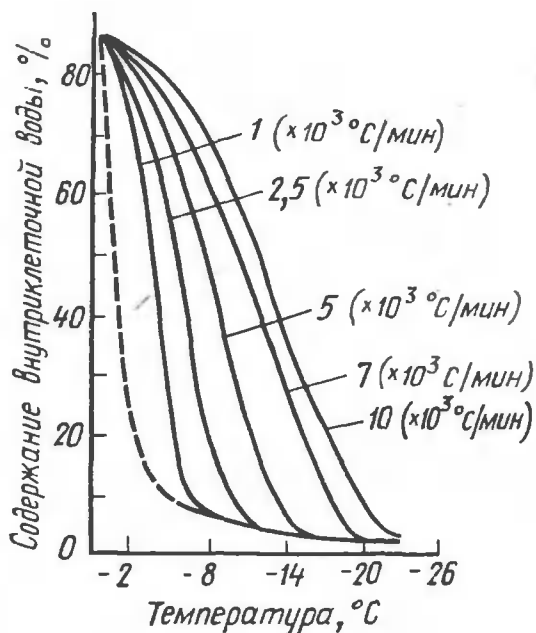


Рис. 26. Содержание внутриклеточной воды [рассчитанное по уравнению (9)] в эритроцитах человека при различных скоростях охлаждения

Для предотвращения внутриклеточной кристаллизации, а следовательно, и разрушения клеток можно уменьшить скорость охлаждения. При этом значительное переохлаждение внутри клеток либо вовсе не будет достигаться, либо оно будет наступать только тогда, когда клетки уже в значительной мере обезвожены, а суспензия в целом сильно переохлаждена. В последнем случае большая концентрация растворенных в протоплазме веществ, высокая вязкость и низкая температура суспензии способствуют полному или частичному стеклованию внутриклеточного раствора. Возможно, что очень мелкие кристаллы, возникающие в клетке в период отогрева, не вызывают необратимого нарушения ее морфофункциональной целостности.

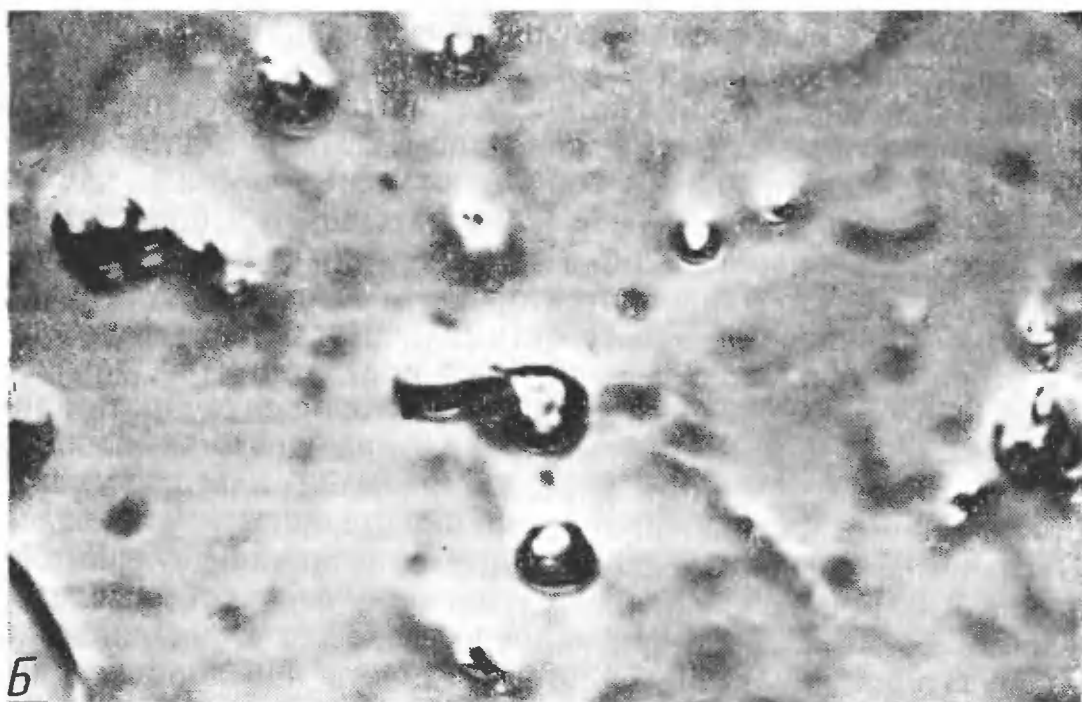
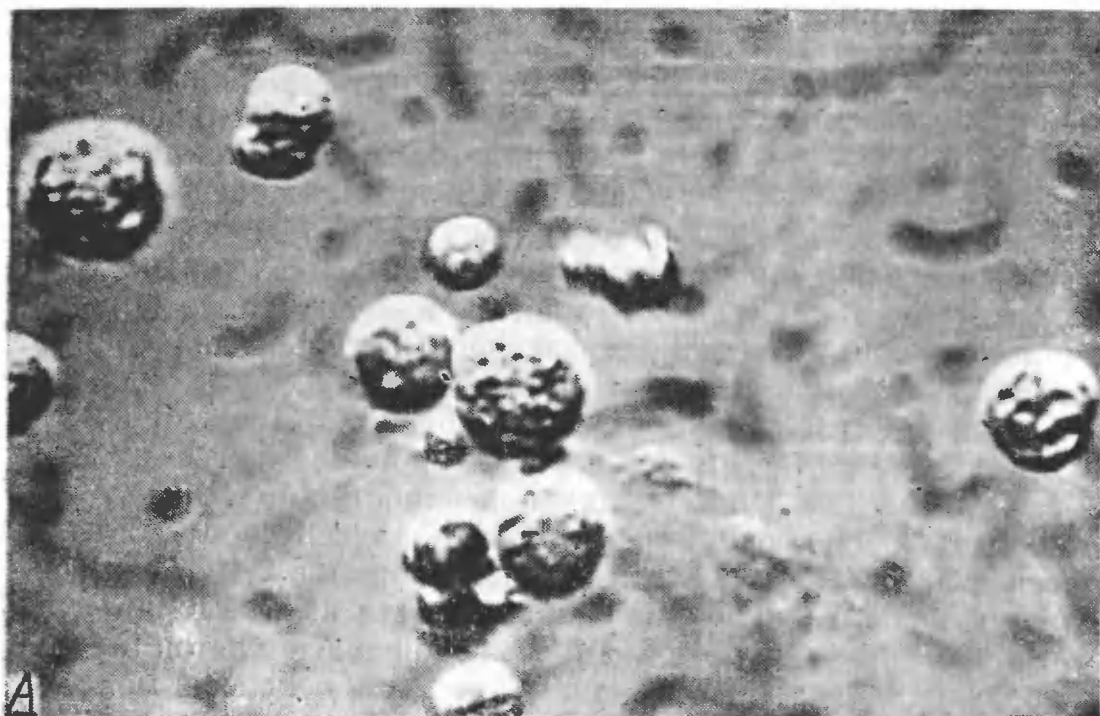
Уменьшение скорости охлаждения кристаллизующейся суспензии влечет за собой более интенсивное обезвоживание клеток. При достаточно малой скорости охлаждения внутриклеточ-

ный раствор практически не переохлаждается и клетки успевают значительно обезводиться. Непосредственное наблюдение за процессом замораживания клеточных суспензий под микроскопом, а также результаты электронно-микроскопических исследований согласуются с выводами двухфакторной теории криповреждения. В результате медленного охлаждения клетки сильно обезвоживаются и не содержат внутриклеточных кристаллов льда (рис. 27); при быстром охлаждении внутри слабо обезвоженных клеток образуются кристаллы льда (рис. 28).

.. Расчетные значения оптимальных скоростей охлаждения на этапе кристаллизации для эритроцитов и дрожжей по порядку величины совпали с найденными экспериментальными значениями. Чрезвычайно высокое значение оптимальной скорости охлаждения для эритроцитов человека с точки зрения двухфакторной гипотезы объясняется аномально высокой проницаемостью их мембран для молекул воды и большим поверхностно-объемным отношением клетки. Напротив, очень низкое значение оптимальной скорости охлаждения яйцеклеток мыши (порядка  $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) определяется низким значением проницаемости их мембран для воды, малым поверхностно-объемным отношением клеток и большим значением энергии активации процесса переноса молекул воды через мембраны яйцеклеток.

Часто в эксперименте, чтобы исключить образование внутриклеточных кристаллов льда, снижают скорость охлаждения настолько, что под влиянием длительной экспозиции в гипертонической среде происходит гибель клеток. Видимо, именно так обстоит дело с большинством клеток млекопитающих, если не принимаются особые меры для их криозащиты. Например, при скорости охлаждения от  $0,3$  до  $600^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  менее чем 2% клеток костного мозга мышей остаются живыми. Однако в присутствии криопротектора большая часть клеток переносит такое замораживание. Добавление криопротектора к клеточной суспензии, как правило, приводит к сдвигу оптимальной скорости охлаждения в сторону меньших значений. Это обстоятельство, скорее всего, связано со способностью криопротекторов затруднять кристаллообразование, рост кристаллов и достижение минимального объема, а также с эффектом разбавления электролитов (в соответствии с гипотезой солевой денатурации Лавлока).

Экспериментальной предпосылкой для создания двухфакторной гипотезы криповреждения служили, в основном, исследования по замораживанию эритроцитов и дрожжей. Однако в итоге исследования автору гипотезы удалось найти общую зависимость между интенсивностью процесса обезвоживания клеток на этапе кристаллизации и параметрами, характеризующими условия замораживания и свойства консервируемых клеток, для произвольных клеточных суспензий.



**Рис. 27.** Обезвоживание клеток перитонеального экссудата мыши в процессе медленного замораживания (А, Б)



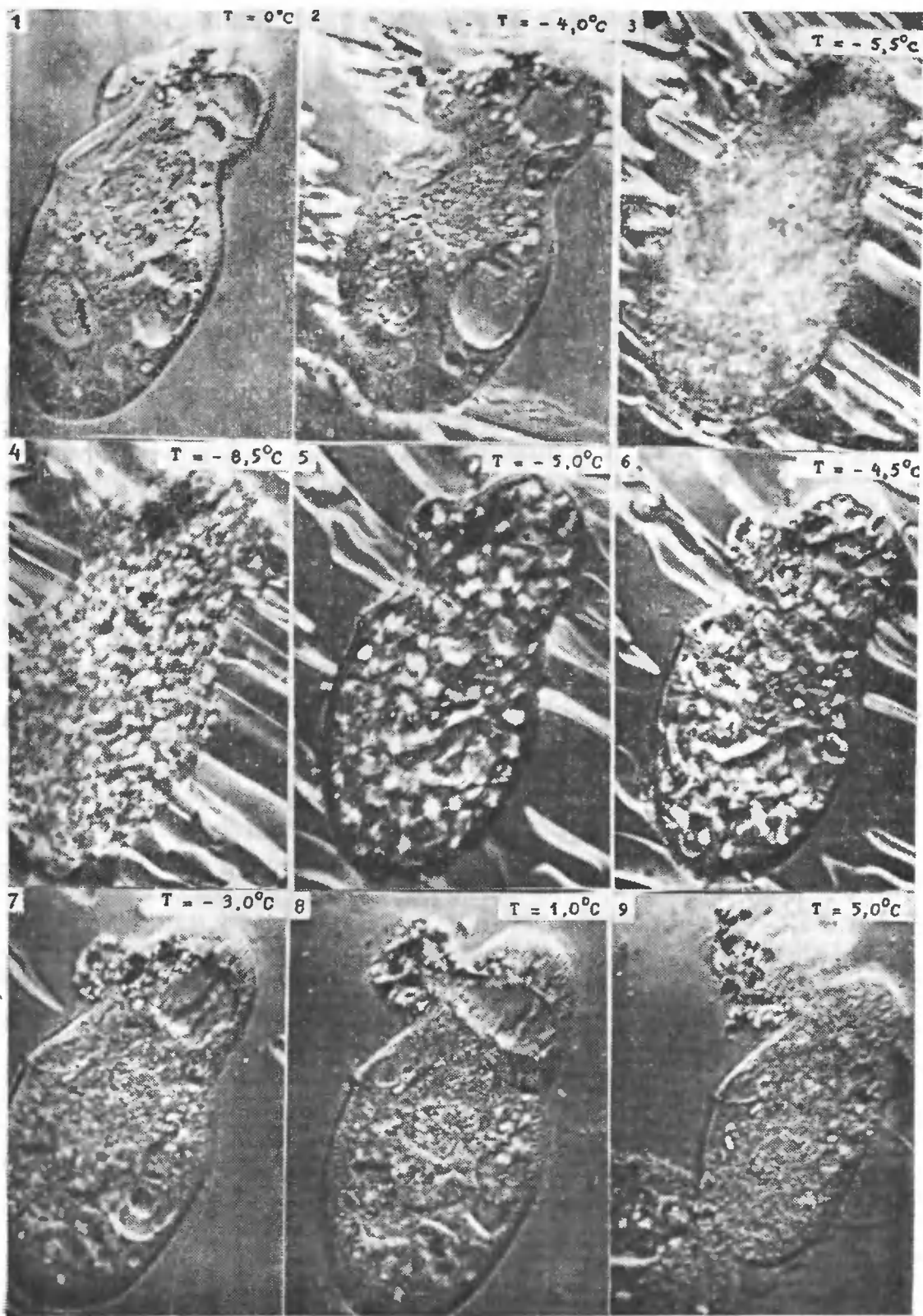


Рис. 28. Образование внутриклеточных кристаллов льда в процессе быстрого охлаждения (1—4) и разрушение инфузорий при отогреве (5—9)



В последнее время для низкотемпературного консервирования биологических суспензий успешно применяют так называемые *быстрые двухступенчатые программы замораживания*. Они заключаются в следующем: первоначально консервируемые образцы замораживают до умеренно низкой температуры — (25—35)°С, затем их выдерживают при этой температуре определенное время, а после этого быстро охлаждают погружением в жидкий азот. В работе Дж. Фарранта и сотрудников (1974), например, показано, что если замораживание суспензии тканевых лимфоцитов под защитой 10%-ного диметилсульфоксида до температуры жидкого азота проводить быстро, но ступенчато, выдерживая клетки при температуре —26°С в течение 10—15 мин, то после отогрева они практически полностью сохраняют функциональную активность. При этом морфологически деконсервированные клетки почти не отличаются от нормальных. Быстрое охлаждение до температуры жидкого азота

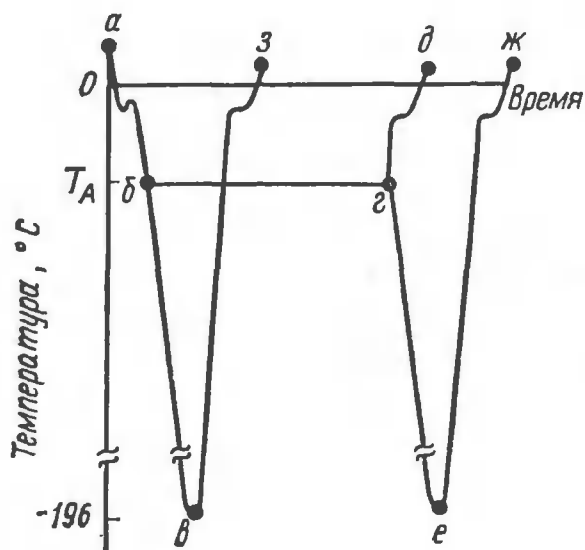


Рис. 29. Термограммы быстрого двухступенчатого охлаждения и последующего отогрева клеток культуры ткани почки китайского хомячка:

*a—z* — характерные точки на термограммах

суспензии клеток культуры ткани китайского хомячка в присутствии 5%-ного диметилсульфоксида (режим *a—б—в—z*, рис. 29) приводило к полной гибели клеток. Быстрое замораживание с десятиминутной остановкой при —25°С и последующим быстрым отогревом (режима *a—б—г—д*) позволяло сохранить 89% клеток. При быстром охлаждении до —196°С после десятиминутной остановки при —25°С с последующим быстрым отогревом (режим *a—б—г—е—ж*) выживаемость составляла 81%. Способ повышения устойчивости клеток путем выдерживания их при —25°С к последующему глубокому охлаждению до —196°С получил название *холодовой адаптации*.

Дж. Фаррант и сотрудники (1976, 1977) с помощью двухступенчатой методики замораживания попытались установить взаимосвязь между выживаемостью клеток культуры ткани китайского хомячка и содержанием льда внутри клеток. О наличии льда судили косвенно: по чувствительности клеток к медленному отогреву — и более прямым методом: с помощью электронной микроскопии. Оказалось, что быстро замороженные до —196°С (режим *a—б—в—z*) клетки лишь незначительно изменяли раз-

мер и форму по сравнению с контрольными, а в их цитоплазме и ядре образовывались мелкие кристаллы льда. В отдельных клетках содержались большие кристаллы льда, расположенные главным образом в ядрах.

После выдерживания при  $-25^{\circ}\text{C}$  большинство клеток было обезвожено, кристаллов льда ни в ядре, ни в цитоплазме не наблюдалось. Чтобы убедиться в том, что в обезвоженных клетках не содержится лед в виде чрезвычайно мелких кристаллов, не доступных наблюдению, образцы отогревали до сравнительно высоких субнулевых температур (не превышающих температуру адаптации) и выдерживали при этой температуре в течение 5 мин для того, чтобы дать возможность кристаллам укрупниться вследствие рекристаллизации. Поскольку при оптимальной двухступенчатой программе кристаллы внутри клеток образуются, они, вероятно, имеют такую форму и размеры, что их наличие не является летальным для клетки. При этом выраженность повреждений в клетках в большей степени коррелирует с общим количеством льда в клетке, чем с размерами отдельных кристаллов.

Результаты, полученные при двухступенчатом замораживании клеток, послужили основанием для пересмотра ряда криобиологических концепций в области представлений о механизмах криповреждения и криозащиты. Поскольку в некоторых случаях двухступенчатое охлаждение обеспечивает более высокую сохранность клеток в данной криозащитной среде в сравнении с охлаждением при оптимальной скорости (выбранной по двухфакторной теории), Фаррант и сотрудники пришли к выводу о том, что скорость охлаждения лишь косвенно влияет на выживаемость консервируемых суспензий.

Согласно двухфакторной гипотезе криповреждений быстрое охлаждение в отличие от медленного приводит к значительному переохлаждению клеток, в результате чего внутриклеточная кристаллизация становится неминуемой. Из этого, на первый взгляд, следует вывод о необходимости снизить скорость охлаждения до такого значения, при котором переохлаждение вплоть до полного затвердевания препарата не приводит к образованию внутриклеточных кристаллов. Однако возможен и альтернативный подход — быстрое двухступенчатое замораживание с остановкой при промежуточной температуре. Хотя при таком режиме замораживания внутриклеточные кристаллы могут зарождаться уже на протяжении первого этапа, при определенном образом подобранной температуре остановки ( $T_A$ , см. рис. 29) их размеры еще не достигают критического (летального для клетки) значения. Образовавшиеся внутриклеточные кристаллы на первом этапе охлаждения не повреждают клетку, но являются потенциально опасными для нее. Более глубокое охлаждение на первом этапе при отсутствии температурной остановки привело бы к дальнейшему увеличению размеров внутриклеточных кристаллов и, следовательно, к гибели клеток.

Температурная остановка ( $\delta$ — $z$ , см. рис. 29) влечет за собой качественное изменение процесса диффузионного обмена водой между клетками и окружающей их жидкой фазой. Во-первых, вследствие образования внутриклеточных кристаллов исчезает концентрационное пересыщение внеклеточной среды по сравнению с внутриклеточной, поэтому на первом этапе охлаждения ( $a$ — $b$ , см. рис. 29) клетки слабо обезвоживаются и деформируются. Внутриклеточные кристаллы, как и внеклеточные, в период адаптации находятся в термодинамическом равновесии с окружающей их средой. Разность химических потенциалов воды вне и внутри клетки, являющаяся движущей силой ее обезвоживания, в рассматриваемом случае определяется только разностью средних кривизн внеклеточных и внутриклеточных ( $1/a$ ) кристаллов. При этом предполагают, что возникшие при замораживании на первом этапе охлаждения внутриклеточные кристаллы рекристаллизуются в один кристалл значительно медленнее, чем перераспределяется растворитель между клеткой и окружающей ее средой.

Под влиянием указанной выше термодинамической силы, пропорциональной разности кривизны вне- и внутриклеточных кристаллов, происходит перенос внутриклеточной воды через клеточную мембрану наружу, сопровождающийся растворением кристаллов в клетке, ибо кристаллы вне клеток, как правило, велики по сравнению с внутриклеточными. Характерное время растворения внутриклеточных кристаллов в период температурной остановки совпадает с временем релаксации клеточного объема к квазиравновесному значению в гипертонической среде и определяется выражением

$$\tau_1 = [\gamma L_p(T_0) \pi_0^i e^{b \cdot (T_A - T_0)}]^{-1} \frac{a^4 \pi_0^i}{2aV}.$$

Поскольку температура адаптации  $T_A$  достаточно низка,  $\tau_1$  может оказаться довольно большим ввиду экспоненциального уменьшения коэффициента фильтрации  $L_p$  с температурой ( $\pi_0^i$  — осмотическое давление суспензии). Если продолжительность периода адаптации составляет примерно  $\tau_1$ , то внутриклеточный кристалл, образовавшийся к началу периода адаптации, растворится, так и не достигнув критических размеров. На последующем этапе охлаждения ( $z$ — $e$ , см. рис. 29), хотя оно также проводится быстро, внутриклеточные кристаллы вновь не зарождаются вплоть до эвтектической точки, когда внутриклеточный раствор частично стеклуется. Частичное стеклование возможно в той части раствора, которая выделяется в каналы между кристаллами льда вблизи эвтектической точки.

Важным фактором, свидетельствующим в пользу быстрого двухэтапного замораживания по сравнению с замораживанием по оптимальной программе в соответствии с двухфакторной гипотезой, является значительно более высокая устойчивость ото-

гретых клеток к постгипертоническому лизису в первом случае по сравнению со вторым. Это обусловлено тем, что при быстром двухступенчатом замораживании с остановкой для адаптации процесс массопереноса через клеточные мембраны происходит в течение промежутка времени, сравнимого с  $\tau_1$ . Обмен между клетками и окружающей их жидкой фазой в этом случае осуществляется только за счет движения растворителя — воды, но не растворенных веществ, в связи с чем клетки, замороженные по быстрой двухступенчатой программе, оказываются устойчивыми к постгипертоническому лизису при отогреве и в процессе удаления криопротектора.

Таким образом, явление холодовой адаптации клеток к низким температурам не является специфическим для каких-либо определенных клеток и может быть использовано при криоконсервировании разных клеток. Поскольку лимитирующей стадией массопереноса на этапе температурой остановки является процесс переноса воды через плазматическую мембрану, оптимальная продолжительность времени экспозиции клеток при температуре адаптации равна  $\tau_1$ . В начале адаптационного периода клетки не обезвожены и содержат внутриклеточные кристаллы. По истечении этого периода клетки обезвоживаются настолько, что уменьшение их объема равно суммарному объему первоначально находившегося в них льда и не содержат внутриклеточных кристаллов.

В заключение следует отметить, что двухступенчатое замораживание требует для своего осуществления значительно меньшего времени и более простой аппаратуры, чем замораживание с постоянной скоростью.

# Способы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий

# 2

## Глава 1. Криоконсервирование клеток

**Криоконсервирование эритроцитов человека.** Проблема долгосрочного хранения крови эффективно решается путем разработки и совершенствования методов криоконсервирования ее форменных элементов. Наиболее детальному изучению в связи с разработкой методов криоконсервирования подвергались эритроциты человека. На них апробировано большое количество криозащитных соединений, и многие из этих соединений оказались достаточно эффективными. Вместе с тем глицерин остается пока единственным широко применяемым для криоконсервирования эритроцитов криопротектором. Это объясняется прежде всего более детальной технологической проработкой методов криоконсервирования эритроцитов под защитой глицерина.

В настоящее время поиск новых криопротекторов продолжается в двух основных направлениях: *применение низкомолекулярных, хорошо проникающих в эритроциты соединений* (в качестве таких соединений успешно апробированы димексид, диметилацетамид, 1,2-пропандиол и др.) и *применение высокомолекулярных соединений, обеспечивающих криозащиту эритроцитов без проникновения в них*. Преимущества второго направления очевидны, однако существует много нерешенных проблем. В определенной мере обнадеживающие результаты получены при использовании в качестве криопротекторов поливинилпирролидона (М. М. 12 000—25 000), полиэтиленоксида (1500 и 4000) и оксиэтилкрахмала.

Исторически сложилось так, что первое направление значительно опередило в своем развитии второе. Более того, проникновение криопротектора в клетки ранее считали необходимым условием их эффективной защиты. Действительно, присутствие криопротекторов внутри эритроцитов снижает интенсивность процессов вымораживания воды из растворов, концентрирование внутриклеточных солей и величину возникающих на мембране градиентов концентраций. Тем не менее после процедуры криоконсервирования внутриклеточный криопротектор может выступать в роли повреждающего фактора, если не приняты необхо-

димые меры по его удалению из клеток до этапа их ресуспендирования в изотонической среде. Процедура удаления криопротектора из эритроцитов (отмывание) требует соблюдения следующего (основного) условия: осмотическое давление отмывающих растворов должно эффективно предотвращать набухание клеток до критических пределов, при которых возможны нарушение ионного баланса и потеря клетками гемоглобина.

Несмотря на трудоемкость процедуры отмывания в настоящее время накоплен уже достаточно большой опыт длительного хранения замороженной крови с последующим ее клиническим применением. Наиболее эффективными с точки зрения практического применения оказались два основных способа криоконсервирования эритроцитов: быстрое замораживание до  $-196^{\circ}\text{C}$  под защитой 15—20%-ного глицерина и медленное замораживание до  $-(70-80)^{\circ}\text{C}$  под защитой 40%-ного глицерина.

Преимуществом первого способа является возможность длительного хранения клеток. Существуют сообщения о клиническом применении эритроцитов, хранившихся при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  в течение 10 лет и более. Второй способ ограничивает сроки хранения 2—3 годами, тем не менее хранение крови в холодильниках обеспечивает его большую доступность для лечебных учреждений.

Последовательность операций в процессе криоконсервирования крови такова. В день взятия крови у донора эритроциты отделяют от плазмы методом центрифугирования (1200 об/мин — 20 мин или 2000 об/мин — 5—10 мин). Затем при медленном перемешивании в течение 5 мин к ним добавляют защитный раствор (ЦНИИГПК-11<sub>4</sub>) в соотношении 1:1 при температуре  $20^{\circ}\text{C}$ . ЦНИИГПК-11<sub>4</sub> состоит из следующих ингредиентов: маннит — 40 г, NaCl — 7 г (в случае, когда предполагают отмывание методом обратимой агломерации, вместо NaCl вносят 3 г ЭДТА), глицерин высшего сорта (относительная плотность 1,248) — 300 мл, вода бидистиллированная — до 1000 мл. Глицеринизированную взвесь эритроцитов помещают в алюминиевый контейнер и выдерживают в нем 15 мин до начала замораживания. Замораживание осуществляют путем погружения контейнера в емкость с жидким азотом. Отогрев после хранения производят в водяной бане с температурой  $45^{\circ}\text{C}$ . Время нахождения контейнера в бане при автоматическом покачивании контейнера 25 с, при ручном 50—60 с. Потеря эритроцитов в результате процедуры криоконсервирования по этой методике составляла в среднем 7,5—10,5%. Модифицированный метод, позволяющий при том же объеме контейнера (290 мл) заморозить удвоенное количество эритроцитов, использует защитный раствор ЦНИИГПК-11<sub>5</sub>, отличающийся от раствора ЦНИИГПК-11<sub>4</sub> только более высокой (40%) концентрацией глицерина. Увеличить объем эритроцитов в контейнере удастся благодаря удалению из суспензии (путем центрифугирования) избытка защитного раствора до начала охлаждения.

Отмывание эритроцитов от глицерина проводят в настоящее время тремя методами: многократного центрифугирования, обратимой агломерации и автоматического непрерывного центрифугирования. Все методы отмывания основаны на принципе постепенного разведения содержащих глицерин эритроцитов гипертоническими растворами не проникающих в клетки 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.

*Метод серийного центрифугирования* оказывается наиболее приемлемым для отмывания небольших (до 20%) концентраций глицерина. Он заключается в последовательном разведении суспензии клеток растворами понижающейся осмотичности и центрифугировании препаратов после каждой процедуры разведения с удалением надосадочной жидкости. После отмывания эритроциты разводят в соотношении 1:1 одним из взвешивающих растворов, разработанных в Центральном научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови (ЦНИИГПК).

Одна из модификаций метода отмывания предусматривает двухкратное центрифугирование. Состав первого отмывающего раствора: 30%-ный раствор сахарозы (или 16%-ный раствор сорбита), приготовленный на 0,9%-ном растворе NaCl. Разбавление с эритроцитами в соотношении 1:1. Состав второго отмывающего раствора: 10%-ный раствор сахарозы (или 5%-ный раствор D-сорбита), приготовленный на 0,9%-ном растворе NaCl. Его добавляют к суспензии в соотношении 1:1. Через 5 мин после перемешивания эритроцитомассы со вторым отмывающим раствором к полученной взвеси добавляют 0,9%-ный раствор NaCl в соотношении 1:1 и только после этой процедуры осуществляют второе центрифугирование. Отмытая клеточная взвесь содержит 5,9 г/л глицерина и 8,14 г/л свободного гемоглобина, что допускает ее переливание в однократной дозе не более 100 мл.

*Метод цитоагломерации* исключает процедуру центрифугирования в процессе отмывания эритроцитов от глицерина. В этом случае используют явление агломерации эритроцитов в растворах неэлектролитов со слабокислым рН (5,2—6,1) с последующим оседанием агломератов. К недостаткам метода относятся: высокий уровень свободного гемоглобина, значительные потери (около 25—30% клеток) и необходимость применения больших объемов отмывающих растворов.

*Метод непрерывного центрифугирования* позволяет существенно упростить процесс отмывания за счет автоматизированной подачи в ротор сепаратора доз крови, предназначенных для отмывания, и отмывающих растворов. При скорости подачи эритроцитов 100—180 мл/мин общее время отмывания на сепараторе составляет 40 мин.



**Криоконсервирование эмбрионов мышц.** Мышечные эмбрионы представляют собой интересную модель для изучения фундаментальных аспектов низкотемпературной биологии. Разработано несколько модификаций способа криоконсервирования этих клеток. Оптимальной стадией для замораживания мышечных эмбрионов является стадия морулы (восьмиклеточный эмбрион). В качестве криопротектора при замораживании мышечных эмбрионов и эмбрионов других млекопитающих чаще всего используют диметилсульфоксид (реже — глицерин) в концентрации 1,5 М для медленных режимов охлаждения и 2 М — для более быстрых. В качестве разбавителя, как правило, используют ту же среду, в которой проводят культивирование эмбрионов *in vitro* (чаще всего среда Дюльбекко). Оптимальная продолжительность экспозиции клеток в криозащитной среде до начала охлаждения составляет 30 мин (по некоторым данным — 15 мин). Экспозицию в растворе диметилсульфоксида проводят при температуре 0°C. Экспериментально установлено, что пятиминутная экспозиция мышечных эмбрионов в 1,5 М растворе диметилсульфоксида при 0°C не приводит к повреждению клеток, в то время как при такой же экспозиции при комнатной температуре наблюдаются различия с контрольными образцами. После замораживания — отогрева диметилсульфоксид удаляют путем двух- или трехкратного отмывания с пятиминутным интервалом между отогревом и стадиями отмывания.

Эмбрионы замораживают в объемах 0,2—0,3 мл, используя пластиковые трубки, полиэтиленовые или стеклянные ампулы. Сравнительно низкий коэффициент проницаемости мембраны мышечных эмбрионов для молекул воды (и высокая энергия активации, соответствующая переносу этих молекул через избирательно проницаемую мембрану), а также большое поверхностно-объемное отношение клеток приводит к тому, что оптимальная по двухфакторной теории скорость охлаждения на этапе кристаллизации имеет порядок десятых долей градуса в минуту.

Энергия активации и коэффициенты проницаемости для молекул воды в мембранах оплодотворенных и неоплодотворенных яйцеклеток практически одинаковы. Жесткая оболочка, окружающая избирательно проницаемую мембрану мышечного эмбриона, хорошо проницаема не только для молекул воды, но и для компонентов с молекулярной массой до 1200, но непроницаема для молекул с молекулярной массой 10 000. Поэтому эта оболочка испытывает лишь незначительные деформационные нагрузки в гипо- и гипертонических средах. Эксперимент показывает, что выживаемость эмбрионов мышц существенно падает при увеличении скорости охлаждения от 0,25 до 2,5°C/мин и снижается до нуля при скорости охлаждения около 5°C/мин. Повреждение наступает при тех же скоростях охлаждения, при которых в клетках появляется внутриклеточный лед, т. е. наблюдается прямая зависимость между наличием в клетках кристаллов льда и их гибелью, что согласуется с двухфакторной теори-



ей. Показано, что высокую выживаемость эмбрионов мыши нельзя получить, комбинируя медленное охлаждение с быстрым отогревом. Более эффективным оказывается медленный отогрев в сочетании с медленным охлаждением. Таким образом, описанная процедура замораживания — отогрева весьма продолжительна и занимает 5—6 ч.

С. М. Виладсен (1977) показал, что эмбрионы коровы выживают, если их охладить до  $-30^{\circ}\text{C}$ , выдержать при этой температуре 30 мин (или очень медленно охладить до  $-33^{\circ}\text{C}$ ), а затем перенести в жидкий азот. В 1980 г. М. Г. Вуд и соавторы установили, что эмбрионы мыши выживают после быстрого охлаждения до  $-(20-25)^{\circ}\text{C}$ , 15-минутной выдержки при этой температуре и последующего погружения образцов в жидкий азот. При двухступенчатых программах замораживания эффективен уже не медленный, а быстрый отогрев (со скоростью  $300-500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ), т. е. отогрев на водяной бане при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ . Как было указано ранее, при таком режиме замораживания по крайней мере в части клеток образуются внутриклеточные кристаллы льда. Однако температурная остановка предотвращает их летальное воздействие при последующем охлаждении.

Д. Г. Виттингам (1982) получил высокую (около 80%) выживаемость эмбрионов мыши, используя режим охлаждения — отогрева, который можно считать промежуточным между первым и вторым указанными выше режимами. Он заключается в следующем: образец охлаждается со скоростью  $0,5-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до температуры  $-40^{\circ}\text{C}$ , а затем сразу погружается в жидкий азот. В отличие от первого, самого длительного режима замораживания этот способ для достижения высокой выживаемости требует, как и в случае быстрого двухступенчатого замораживания, быстрого отогрева. Все три описанные выше модификации способа низкотемпературного консервирования эмбрионов мыши практически отличаются друг от друга только режимом охлаждения.

Замораживание — отогрев биологических материалов по заданной программе обычно производят с помощью специальных устройств. Программное устройство охлаждения производства Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР позволяет осуществлять автоматическое двухэтапное программное охлаждение металлических контейнеров в диапазоне температур от  $+20$  до  $-140^{\circ}\text{C}$  со скоростью от  $0,5$  до  $30^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , а также программный отогрев со скоростью от  $1$  до  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  (в качестве хладагента используют жидкий азот).

**Криоконсервирование спермы быка.** Метод искусственного осеменения животных на основе криоконсервирования спермы крупного рогатого скота в настоящее время широко применяют в животноводстве, он представляет собой удобное средство для реализации широкомасштабной генетической селекции. Для глубокого замораживания и длительного хранения используют свежеполученную сперму племенных производителей. Криоконсервирование производят в средах, содержащих 5% глицерина и

лактозо-желточно-цитратный разбавитель. Для замораживания порций спермы применяют тонкие полимерные трубки, запаянные с торцов. Сперму охлаждают сразу же после ее разбавления криозащитным раствором (1:1) со скоростью 0,25—0,5°C/мин до (2—5)°C, а затем выдерживают ее при этой температуре 3—5 ч. Охлаждение от +5°C до эвтектической области проводят со средней скоростью 5—6°C/мин. Замороженную сперму хранят в сосудах с жидким азотом или сухим льдом. Образцы отогревают в водяной бане при + (38—40)°C.

**Криоконсервирование микроорганизмов.** Криоконсервирование обеспечивает максимально возможную длительность хранения микроорганизмов без утраты ими важнейших генетических признаков. Различные физиологические группы, виды и штаммы микроорганизмов обнаруживают разную устойчивость к процессам криоконсервирования. Так, если спорообразующие микроорганизмы можно замораживать непосредственным погружением заполненных ими контейнеров в жидкий азот, то не образующие спор микроорганизмы требуют для обеспечения высокой сохранности подбора криозащитных сред и режимов замораживания — отогрева.

На устойчивость микроорганизмов к процессам криоконсервирования влияют самые различные факторы: возраст клеток, условия их культивирования, плотность клеток в суспензии. Установлено, в частности, что клетки *E. coli* проявляют наибольшую криорезистентность в конце логарифмической или в начале стационарной фазы роста. Культивирование дрожжей и молочнокислых бактерий в средах, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, повышает их устойчивость к замораживанию. Эти изменения криорезистентности клеток обычно связывают с модификацией мембранных структур. Что касается плотности клеток, то установленный факт повышения титра жизнеспособных микроорганизмов с увеличением исходной концентрации клеток в суспензии пока не имеет объяснения.

Для криозащиты плохо переносящих замораживание микроорганизмов применяют различные криопротекторы: низкомолекулярные вещества (глицерин, димексид, сахарозу и др.), высокомолекулярные соединения (декстран, крахмал, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон и др.), компоненты растительного и животного происхождения (сыворотку крови, желатин, обезжиренное молоко и др.). Сохранность замораживаемых микроорганизмов зависит от скорости охлаждения и имеет оптимумы для данного вида клеток при характерных скоростях. Так, для многих видов грибов оптимальная скорость охлаждения составляет около 1°C/мин, для дрожжевых клеток — (7—10)°C/мин, для различных видов бактерий и актиномицетов оптимальные скорости лежат в области скоростей охладений от 2 до 45°C/мин.

**Криоконсервирование изолированных гепатоцитов.** Выделенные из печени изолированные клетки суспендируют в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 5 мМ KCl, 0,4 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 мМ

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 мМ дитиотритола, 2 мМ ЭДТА, 0,8 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1%-ный раствор альбумина (рН 7,4). Клетки печени инкубируют с 10—15%-ным раствором диметилсульфоксида, приготовленным на среде суспендирования при  $+(2-4)^\circ\text{C}$  в течение 10—15 мин, разливают в полиэтиленовые ампулы объемом 1—2 мл и замораживают по следующей программе. На первом этапе — охлаждение клеток от  $+(20-22)$  до  $+(2-4)^\circ\text{C}$  со скоростью  $1-2^\circ\text{C}/\text{мин}$ , на втором — охлаждение от  $+(2-4)$  до  $-(6-8)^\circ\text{C}$  со скоростью  $20-27^\circ\text{C}/\text{мин}$ , на третьем этапе — от  $-(6-8)$  до  $-(30-35)^\circ\text{C}$  со скоростью  $2-4^\circ\text{C}/\text{мин}$  в течение 6—12 мин, на четвертом этапе — со скоростью  $300-400^\circ\text{C}/\text{мин}$  до температуры жидкого азота ( $-196^\circ\text{C}$ ). Отогревать пробы необходимо на водяной бане при  $+41^\circ\text{C}$ .

После режима замораживания и быстрого отогрева митохондрии печени крысы сохраняют высокий уровень функциональной активности. Консервированные гепатоциты можно хранить в жидком азоте на протяжении 3—6 лет без потери их функциональной активности.

## **Глава 2. Замораживание и хранение мембранных структур и субклеточных органелл**

Для научных и практических целей очень часто приходится хранить в замороженном состоянии различные мембранные препараты (микросомальную фракцию, реконструированные мембраны клеток, например замкнутые и разомкнутые тени эритроцитов, мембраны саркоплазматического ретикулума и т. д.), субклеточные органеллы с выраженными мембранными функциями (митохондрии, лизосомы), широко используемые в качестве модельных систем.

**Метод замораживания и хранения изолированных митохондрий.** Митохондрии — четко выраженная мембранная структура с весьма тонкой архитектоникой, содержащая системы дыхания и окислительного фосфорилирования. Митохондрии нельзя хранить в изолированном состоянии при комнатной температуре, так как они быстро разрушаются. При температурах порядка  $0-4^\circ\text{C}$  митохондрии в средах выделения можно сохранять не более 1—2 ч, так как они подвергаются ишемии и гибнут в результате быстрого развития процессов перекисного окисления липидов и денатурации ферментативных комплексов, регулирующих окислительное фосфорилирование. Замораживать митохондрии можно под защитой криопротекторов — диметилсульфоксида (ДМСО) или полиэтиленоксида (ПЭО). Для этого свежую печень крыс измельчают ножницами в холодной стандартной среде выделения и навеску заливают 9-кратным объемом этой среды. После измельчения в гомогенизаторе типа стекло — тефлон в течение 30—40 с гомогенат центрифугируют при 600 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость — при 6000 об/мин в течение 15 мин. Митохондрии, находящиеся в осадке, суспендируют в 2 мл сре-

ды выделения (из расчета на 4—5 г печени). Затем в суспензию добавляют по каплям 2 мл 2%-ного раствора полиэтиленоксида, приготовленного на среде выделения, и оставляют стоять на льду до 1 ч. По истечении этого срока 1 мл суспензии, налитой в стеклянную ампулу, замораживают медленно в парах азота с температурой  $-25^{\circ}\text{C}$  со средней скоростью  $1-1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Температуру суспензии регистрируют с помощью термопары и самопишущего потенциометра. В момент завершения кристаллизации основной массы свободной воды суспензии образец погружают в жидкий азот. Отогревают митохондрии в водяной бане при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $200-300^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Митохондрии можно также успешно заморозить, если скорость охлаждения повысить до  $1-2$  тыс  $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  и очень быстро отогреть при  $+37^{\circ}\text{C}$ . Для этого замораживают очень тонкий слой органелл в специальном контейнере.

Для восстановления функциональной активности митохондрий после быстрого замораживания — отогрева в среде без криопротектора необходимо в среду криоконсервирования добавить субстраты (сукцинат, глутамат), ионы магния, адениновые нуклеотиды или ингибиторы перекисного окисления и гидролиза липидов фосфолипазами (комплексоны  $\text{Ca}^{2+}$ , местные анестетики, антиоксиданты). При использовании этих соединений значения биоэнергетических показателей восстанавливаются при инкубации суспензии митохондрий в физиологических условиях и достигают 70% от уровня контроля. Иногда возникает необходимость сохранять функцию митохондрий в составе срезов тканей (почки, печени, сердца и т. д.). С целью увеличения срока хранения срезов ткани почки и улучшения структурно-функционального состояния митохондрий тканевой препарат замораживают следующим способом: охлаждают на первом этапе от  $37$  до  $4^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $5-7^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , на втором — со скоростью  $1-1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-(6-8)^{\circ}\text{C}$  и на третьем этапе — со скоростью  $300-400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-196^{\circ}\text{C}$ , т. е. быстрым погружением ткани в жидкий азот. Перед замораживанием сред ткани инкубируют в растворе, содержащем сукцинат и глутамат натрия, аденозинтрифосфат, цитохром *c*, ЭДТА, сахарозу и фосфат в следующих соотношениях (М):

Сукцинат натрия  $0,03-0,04$   
Глутамат натрия  $0,03-0,04$   
Аденозинтрифосфат  $0,01-0,02$

Цитохром *c*  $30 \cdot 10^{-6}-40 \cdot 10^{-6}$   
ЭДТА  $0,1 \cdot 10^{-3}-0,2 \cdot 10^{-3}$   
Сахароза  $0,25-0,30$   
Фосфат  $0,001-0,002$

Образец инкубируют при  $25^{\circ}\text{C}$  15 мин, а затем при  $+4^{\circ}\text{C}$  в течение  $1-2$  ч медленно по  $0,25$  мл добавляют охлажденный до  $4^{\circ}\text{C}$  10%-ный раствор ДМСО (или димексида) и замораживают по указанной выше программе.

Предложенный способ позволяет сохранять на протяжении  $1-2$  лет биоэнергетические параметры митохондрий (дыхание, окислительное фосфорилирование, дыхательный контроль и кон-

центрацию цитохромов) на уровне, практически не отличающемся от контрольных величин.

**Замораживание лизосом.** Лизосомы весьма неустойчивы к действию замораживания, поэтому при их криоконсервировании необходимо использовать различные мембранные стабилизаторы и криопротекторные среды.

Обогащенную фракцию изолированных лизосом, выделенных по методу де Дюва из печени крыс, инкубируют в среде выделения при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ , в которую по каплям, слегка помешивая, добавляют раствор ПЭО-400 или ДМСО (50%) до получения 10%-ной конечной концентрации. В среду желателно дополнительно ввести один из стабилизаторов (гидрокортизон, дексаметазон, ацетилсалициловую кислоту) в концентрации  $10^{-3}$ — $10^{-6}$  М. Замораживают органеллы в объеме 1—2 мл в полиэтиленовых ампулах по двухэтапной программе: на первом этапе до  $-21^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1$ — $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , на втором — до  $-196^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $300$ — $400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  (можно на первом этапе до  $-10^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1$ — $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , а затем быстро до  $-196^{\circ}\text{C}$ ). Отогревают быстро на водяной бане при  $37^{\circ}\text{C}$ .

Необходимо обратить внимание на то, что защитный эффект указанных выше криопротекторов при замораживании лизосом по любым программам обладает неполным действием, поскольку уровень неседиментируемой активности в среде замораживания во всех случаях остается относительно высоким. Кроме того, криопротекторы неэффективны для предупреждения повреждений, развивающихся в деконсервационном периоде. Так, уровень неседиментируемой активности гидролаз через 3 ч после оттаивания суспензии органелл значительно выше по сравнению с тем, который регистрируется непосредственно после оттаивания проб.

При замораживании суспензии лизосом в присутствии ДМСО или ПЭО-400 и мембранотропных веществ гидрокортизон и дексаметазон ( $10^{-3}$ — $10^{-4}$  М) снижают неседиментируемую активность кислой РНКазы, ДНКазы и катепсина D без изменения уровня активности кислой фосфатазы. Ацетилсалициловая кислота не оказывает влияния на уровень солюбилизации первых трех ферментов, однако в ее присутствии снижается активность кислой фосфатазы. Очевидно, отдельные мембраностабилизирующие вещества оказывают селективное действие на активность лизосомальных ферментов.

**Замораживание микросом.** Изолированные микросомы, выделенные из гепатоцитов, весьма устойчивы к замораживанию — отогреву. Их можно с успехом быстро замораживать до  $-196^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $300$ — $400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  путем погружения в жидкий азот в среде выделения (солевой или сахарной) с последующим быстрым отогревом на водяной бане при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . При таком способе замораживания структурно-функциональные изменения не происходят.

Однако если изолированные из печени крыс микросомы хранить при  $4^{\circ}\text{C}$  либо замораживать медленно, то уже в течение су-

ток они подвергаются структурно-функциональным перестройкам, что выражается в уменьшении потребления  $O_2$  на 31% и индуцированного АДФ потребления  $O_2$  на 49%. Хотя медленное замораживание микросом со скоростью 1—2°C/мин до —25°C не сопровождается изменением перекисного окисления липидов, тем не менее после отогрева скорость гидроксилирования флуоресцентного зонда диметиламинохалкона уменьшается на 47% по сравнению с контролем. При этом изменяются реакция цитохрома *c*, цитохрома *b<sub>5</sub>* и восстановительные процессы с участием цитохрома *P*-450. Например, в указанном интервале температур (до —25°C) резко изменяется кинетика восстановления цитохрома *b<sub>5</sub>* под действием НАДН-цитохрома *c*-редуктазы. В меньшей мере повреждается система гидроксилирования, регулируемая цитохромом *P*-450, особенно если в среду ввести криопротектор (например, этиленгликоль). Так, у микросом, хранившихся при —15°C в смеси буферный раствор — криопротектор, не изменяется потребление кислорода, а при хранении в той же среде при 4°C оно резко снижается. В образцах, содержащихся при —15°C, сохраняется до 92% первоначальной концентрации цитохрома *P*-450, а при 4°C — лишь 57—62% цитохромов.

После хранения микросом при 4°C в течение 7 дней в образцах повышается концентрация перекисей липидов в 3 раза, и при —15°C — только в полтора раза. При этом необходимо учесть, что микросомный осадок, суспендированный в буферном растворе с криопротектором (этиленгликоль, глицерин в 10%-ной концентрации), лучше всего сохраняется в охлажденном и особенно замороженном состояниях. Микросомальная фракция может сохраняться в лиофилизированном состоянии в течение одной недели. При этом содержание цитохромов *P*-450 и *b<sub>5</sub>* практически не изменяется.

Изолированные мембраны микросомальной фракции суспендируют в среде, содержащей 0,125 М KCl и 20 мМ трис-HCl-буфера при концентрации белка 20—30 мг/мл. Раствор разливают в ампулы по 1—2 мл и погружают в жидкий азот. Размораживают препарат на водяной бане при 37°C. При этом размороженные препараты мембраны не желательно долго хранить при 4°C, так как в замороженных — отогретых препаратах быстро развиваются процессы перекисного окисления липидов.

---

## Заключение

---

Криобиология является сравнительно молодой областью науки и в настоящее время бурно развивается. Накапливаются новые экспериментальные данные о влиянии низких температур на структурно-функциональное состояние клеточных структур, которые не имеют однозначной трактовки и не полностью укладываются в существующие концепции. Остается неудовлетворительной терминология, теоретические представления о причинах и механизмах криоповреждения и криозащиты представляют собой совокупность разрозненных концепций с ограниченной областью применения. Несмотря на многие указанные сложности, подобранный в этом пособии материал отражает современное состояние проблемы замораживания и криопротекции биологических структур. Авторы выражают надежду, что знакомство с этой книгой будет способствовать привлечению свежих научных сил к решению задач, стоящих перед криобиологией. Хочется верить, что криобиологические подходы к изучению устойчивости биологических структур могут внести серьезный вклад в решение теоретических и прикладных задач биохимии и биологии.



---

# Рекомендуемая литература

---

Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. Киев, 1982.

Биохимия мембран/Под ред. А. А. Болдырева. А. А. Болдырев. Введение в биохимию мембран. М., 1986.

Дузу П. Криобиохимия. М., 1980.

Криоконсервирование клеточных суспензий/Под ред. А. А. Цуцаевой. Киев, 1983.

Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии. Л., 1972.

Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах/Н. С. Пущкарь, А. М. Белоус, В. И. Вишневский, Ю. А. Иткин, Л. Ф. Розанов. Киев, 1977.

Рэ Л. Консервация жизни холодом. М., 1962.

Самигин Г. А. Причины вымерзания растений. М., 1974.

Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения. М., 1963.

*The frozen cell*/Eds. G. T. W. Wolstenholme. M. O'Connor, London, 1970.

# Предметный указатель<sup>1</sup>

Адаптация холодовая 20, 64, 67  
Аденилатциклаза 29  
Активационный множитель 6  
Анкерин 46  
Ca<sup>2+</sup>-АТФаза 25\*

Белки, агрегация 23  
— «выдавливание» из мембран 21  
— «вымораживание» 23  
— железосодержащие 28  
— сегрегация 23

Витрифицированные структуры 23  
Вода вицинальная 22, 29  
— мембраносвязанная 22  
— типы 23\*

Гемолиз 39  
— постгипертонический эритроцитов 43\*  
Гидратация мембран 22  
Гипотеза криповреждения двухфакторная 56  
— минимального объема 52, 55  
— солевой денатурации 61  
— физического контакта 54  
Глицерин 8, 9\*, 15\*, 29, 31, 68, 71  
Глицеролипиды 32

Давление 49  
Декстран 34  
Диаграмма плавления 8\*, 21\*, 53\*  
Димексид 32, 68, 75  
Диметилацетамид 29, 33, 68  
Диметилсульфоксид 8, 9\*, 29, 32, 33, 36, 53, 64, 71, 74  
Диффузия латеральная 20, 22  
Замораживание 6, 12\*, 14\*, 24\*, 25\*, 26\*, 50, 52, 62, 71  
— быстрое двухступенчатое 64  
— лизосом 76  
— микросом 76

Кардиолипид 28  
Кластеры липидов 21  
Консервирование низкотемпературное 6, 8  
Коэффициент избирательности мембраны 36  
Криенированные клетки 46  
Криобиология 5  
Криозащитные среды 8, 29, 68  
Криоконсервант 37  
Криоконсервирование 57, 68  
— изолированных гепатоцитов 73  
— микроорганизмов 73  
— спермы быка 73  
— эмбрионов мыши 71  
— эритроцитов человека 68  
Криповреждение 48, 52  
Криопротекторы 8, 9, 29, 38, 53, 61, 68  
— эндоцеллюлярного действия 31  
Криовстойчивость 40  
«Кристаллизационное» давление 51  
«Кристаллические зародыши» 13  
— структуры, типы 14\*  
Кристаллообразование внеклеточное 10\*, 11\*, 12, 13, 48, 52, 57, 58, 60\*, 63\*  
Кристаллы льда 8, 9, 10\*, 50, 60

Лизис осмотический 40  
— постгипертонический 37, 39, 67  
Лиотропный эффект 53  
Липид-белковые взаимодействия 21

Мембрана(ы), «доменная модель» 16  
— платформы стабильные (ригидные, упорядоченные) 16  
— — разупорядоченные 16  
— структура 18\*  
— температурная модификация 26  
Метастабильные системы 16  
Митохондрии, замораживание и хранение 74

Низкотемпературные эффекты 19

Обезвоживание 36, 48, 58, 60, 62\*  
Оксиэтилкрахмал 29, 34, 68  
Осмолярность 39  
Осмотические эффекты 35  
Отогрев 6, 20, 24\*, 25\*, 50, 52, 63\*, 71  
Охлаждение 8, 50, 58, 63\*

Переокисление липидов 77  
Переохлаждение 50  
Плавучая плотность мембран 28  
Плазмазаменитель 33  
Поверхностно-объемное отношение клетки 36  
Поливинилпирролидон 29, 33, 73  
Полиэтиленгликоль 29, 73  
Полиэтиленоксид 34, 51, 68, 74  
Пора макроскопическая 40  
Потенциал мембранный 37  
— химический 35  
— энергетический 67\*  
1, 2-Пропандиол 68  
α-Пропиленгликоль 29, 33

Рекристаллизация 16, 17\*, 65

Скорость критическая 51  
Спектрин 43, 44, 46  
Стабильность бислоя 22  
Стеклование 8, 13

Температуро-зависимые изменения структуры воды 22  
Термограмма замораживания 12\*  
Трансмембранные дефекты 44—47

Уравнение Кельвина 49

Фазово-структурные переходы 19, 20, 42  
Фазовые превращения 16  
Феномен механического раздавливания клеток при замораживании 47  
Ферменты лизосомальные лейкоцитов 28\*  
Фосфатидилинозит 28  
Фосфатидилхолин 28  
Фосфатидилэтаноламин 28  
Фосфолипиды 53

Холестерин 28, 53

Центрифугирование непрерывное, метод 70  
Цитоагломерация, метод 70

Шок температурно-осмотический 41, 43  
— температурный 42  
— холодовой 22

Эвтектическая точка 9, 12, 13, 48  
Электролиты, повреждающее действие 53  
Энергия свободная мембраны 39, 40\*  
— — разность 49  
Эритроциты, асимметрия мембран 43  
— жесткая белковая решетка мембраны 44  
— тени 39  
— фосфолипидный состав 27\*  
Энергетический барьер 6, 40  
Этиленгликоль 29, 33  
Эхиоциты 46

<sup>1</sup> Звездочкой отмечены страницы, на которых помещены рисунки или таблицы.

---

# Оглавление

---

Предисловие . . . . .	5
<b>Часть 1. Криповреждение и криозащита клеточных структур . . . . .</b>	<b>6</b>
<i>Глава 1. Физические процессы, протекающие при замораживании — отогре-</i> <i>ве растворов и биологических суспензий . . . . .</i>	<i>6</i>
<i>Глава 2. Фазовые превращения в мембранах . . . . .</i>	<i>16</i>
<i>Глава 3. Крипротекторы . . . . .</i>	<i>29</i>
<i>Глава 4. Осмотические эффекты . . . . .</i>	<i>35</i>
<i>Глава 5. Температурно-осмотический шок клеток . . . . .</i>	<i>41</i>
<i>Глава 6. Роль механического фактора в повреждении клеточных структур</i> <i>при замораживании — оттаивании . . . . .</i>	<i>47</i>
<i>Глава 7. Гипотеза минимального объема . . . . .</i>	<i>52</i>
<i>Глава 8. Двухфакторная гипотеза криповреждения . . . . .</i>	<i>56</i>
<i>Глава 9. Быстрое двухступенчатое замораживание . . . . .</i>	<i>64</i>
<b>Часть 2. Способы низкотемпературного консервирования клеточных сус-</b> <b>пензий . . . . .</b>	<b>68</b>
<i>Глава 1. Криоконсервирование клеток . . . . .</i>	<i>68</i>
<i>Глава 2. Замораживание и хранение мембранных структур и субклеточ-</i> <i>ных органелл . . . . .</i>	<i>74</i>
Заключение . . . . .	78
Рекомендуемая литература . . . . .	79
Предметный указатель . . . . .	80

15 коп.

# БИОХИМИЯ МЕМБРАН

Книга продолжает серию учебных пособий по современным проблемам биохимии мембран и дает основные сведения о замораживании, отогреве и хранении мембранных структур.

