



**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет ветеринарної медицини
Кафедра фізіології та біохімії тварин**

Г.Ф. Жегунов, О.М. Денисова, Н.І. Гладка

КРІОПОШКОДЖЕННЯ КЛІТИН

Навчально-методичний посібник

**Харків
2024**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет ветеринарної медицини
Кафедра фізіології та біохімії тварин

Г.Ф. Жегунов, О.М. Денисова, Н.І. Гладка

КРІОПОШКОДЖЕННЯ КЛІТИН

Навчально-методичний посібник

для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти
денної форми навчання зі спеціальності 211 Ветеринарна медицина

Затверджено
Рішенням Науково-
методичної комісії факультету
ветеринарної медицини ДБТУ
Протокол № 3 від 27.02.2024 р.

Харків
2024

УДК 57.086.13(07)
Є Ж46

Схвалено на засіданні
кафедри фізіології та біохімії тварин ДБТУ
Протокол № 13 від 19.02.2024 р.

Рецензенти:

Шпакова Н.М. - д.б.н., в.о.зав.відділом кріоцитології ІПКіК НАН України, старший науковий співробітник.

Куц М.М. - д.вет.н., професор кафедри нормальної і патологічної морфології Державного біотехнологічного університету.

Жегунов Г.Ф.

Є- Ж46. Кріопошкодження клітин [Текст]: навч.-метод. посіб. для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальностей 211 Ветеринарна медицина та 162 Біотехнології та біоінженерія / Г.Ф. Жегунов, О.М. Денисова, Н.І. Гладка ; Держ. біотенх. ун-т. – Харків, 2024.– 26 с.

Навчально-методичний посібник призначений для самостійної роботи студентів зі спеціальностей «Ветеринарна медицина» і «Біотехнології та біоінженерія» з дисциплін «Кріоветеринарія», «Основи низькотемпературної ветеринарної медицини», «Кріобіологія і кріомедицина». У посібнику детально пояснюються причини, механізми та наслідки пошкодження клітин холодом.

УДК 57.086.13(07)

Відповідальний за випуск О. М. Денисова, канд. біол. наук.

© Жегунов Г.Ф., Денисова О. М., Гладка Н. І. 2024
© ДБТУ, 2024

ЗМІСТ

1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ КЛІТИН ТА ДІЯ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР	5
1.1. Організація клітин	5
1.2. Ефекти заморожування	6
1.3. Роль швидкості заморожування	6
2. ОСНОВНІ МІСЦЯ КРІОПОШКОДЖЕНЬ	7
2.1. Біологічні мембрани	7
2.1.1. Кріопошкодження біологічних мембран	9
2.2. Цитоплазма	10
2.2.1. Кріопошкодження цитоплазми	11
3. ЯДРО	11
3.1. Кріопошкодження ядра	12
4. МІТОХОНДРІЇ	13
4.1. Кріопошкодження мітохондрій	14
5. ЛІЗОСОМИ	15
5.1. Кріопошкодження лізосом	16
6. РИБОСОМИ	16
6.1. Кріопошкодження рибосом та синтезу білків	17
7. АПАРАТ ГОЛЬДЖІ	17
7.1. Кріопошкодження апарату Гольджі	18
8. ЕНДОПЛАЗМАТИЧНИЙ РЕТИКУЛУМ	19
8.1. Кріопошкодження ендоплазматичного ретикулуму	20
КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ	22
ЛІТЕРАТУРА	26

1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ КЛІТИН ТА ДІЯ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

Відомо, що після глибокого заморожування без кріопротекторів та подальшого відігріву переважна більшість біологічних об'єктів не виживає. Насамперед ушкоджуються елементи, з яких складаються всі живі тіла, – клітини. Клітини мають дуже складну будову: біомембрани, органели, хромосоми, макромолекули, ферменти тощо, тому цитологічні порушення мають багатокомпонентний комплексний характер.

1.1. Організація клітин

Клітини всіх тварин та їх органели мають принципово однакову будову (рис. 1) і виконують подібні функції в різних видів організмів, попри рівень розвитку.

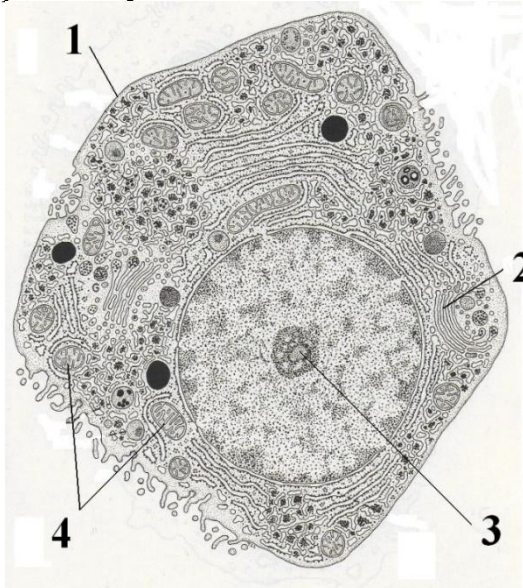


Рис. 1. Схема принципової будови та організації клітин тварин на прикладі гепатоциту. Клітина є автономним складним гетерогенним рідким живим тілом. Зовнішня мембрана відокремлює вміст від зовнішнього середовища. Система внутрішніх мембран розчленовує внутрішній вміст на безліч напіваавтономних частин.

- 1 - цитоплазматична мембрана,
- 2 - цитоплазма,
- 3 - ядро,
- 4 - клітинні органели.

Клітина – це живе фізичне автономне тіло. Це вкрите мембраною рідке мікроскопічне утворення. Його внутрішній вміст є в'язким колоїдним розчином, що складається головним чином з 70% води і 20% глобулярних і фібрилярних білків. Інші 10% внутрішнього складу клітин представлені молекулами вуглеводів, ліпідів, трохи нуклеїновими кислотами, а також дисоційованими неорганічними та органічними солями. Цей цитоплазматичний колоїд розділений мембранами на ізольовані, але взаємодіючі відсіки, де протікають специфічні біохімічні реакції. Розташування відсіків, органел та макромолекул упорядковане, хоча вони зберігають відносну динамічність. Практично вся вода в клітині знаходиться у зв'язаному з безліччю молекул, або впорядкованому навколо різних

структур стані. Але це не заважає постійному тепловому руху молекул води та метаболітів, а також дифузії, осмосу та каталізу. Організаційні властивості клітинного колоїду настільки сильні, що не дозволяють якийсь час розтікатися клітинному вмісту навіть при пошкодженнях цитоплазматичної мембрани.

1.2. Ефекти заморожування

При заморожуванні біооб'єктів без кріопротекторів відбувається затвердіння усієї води як зовні, так і всередині клітин. Це є основною причиною подальших кріопошкоджень будь-яких біологічних об'єктів та їх внутрішніх структур. Вода кристалізується, клітини піддаються механічному впливу кристалами льоду, їх вміст зневоднюється, порушується структура та розташування макромолекул, припиняється броунівський рух та дифузія молекул, зупиняються біохімічні процеси та метаболізм. Колоїдний вміст клітин твердне і втрачає всі свої властивості та функції. Припиняються будь-які прояви життя.

Але порушення структури та функцій клітин у замороженому стані не виявляються, оскільки вони переходять у стан анабіозу. У такому стані клітини та їх вміст без змін можуть бути досить тривалий час, тому що в їх твердому тілі практично припиняються спонтанні процеси руйнування, характерні для фізіологічних температур. Наслідки дії факторів заморожування виявляються лише на етапі відігріву та після повернення біооб'єктів у температурну зону рідкої води. Наслідки заморожування можуть бути настільки серйозними, що далеко не всі об'єкти, що відігріваються, повертаються до життя.

Особливості виживання та кріопошкоджень клітин і тканин тварин пов'язані з кількома умовами: а) різновидом клітин, б) складністю їх будови, в) розмірами, г) знаходженням клітин у складі тканини або в суспензії, д) швидкістю заморожування, розморожування та ін.

1.3. Роль швидкості заморожування

Швидкості заморожування без кріопротекторів мають велике значення у ступені та у глибині пошкоджень різних біооб'єктів. Зокрема, при повільному заморожуванні до мінус 196°C вода кристалізується спочатку у зовнішньому середовищі, потім усередині клітин, далі всередині органел, а при швидкому заморожуванні до тих самих температур відбувається практично одночасне затвердіння води у всіх компартментах клітин. При повільному заморожуванні відбувається дегідратація клітин за рахунок випереджального зростання кристалів зовні та витягування ними води з клітин, а при швидкому заморожуванні дегідратації клітин не відбувається. При повільному заморожуванні та поступовому зростанні позаклітинного

льоду утворюються «канальці» малих об'ємів рідкої фази, куди витісняються солі, метаболіти та клітини із суспензії, а при швидкому заморожуванні канальці не формуються, клітини просто вмерзають у лід. Повільне заморожування без кріопротекторів є більш шкідливим, ніж швидке.

Однак незважаючи на різницю ушкоджуючих механізмів під час заморожування при різних швидкостях, картина кріопошкоджень після розморожування створюється приблизно однакова. Це пов'язано з тим, що основні процеси, що ушкоджують клітини, розвиваються і проявляються саме на етапі відігріву біологічних об'єктів: рекристалізація, механічні пошкодження, зміни рН, електростатичні ефекти, денатурація макромолекул, пошкодження мембран, набухання клітин та ін.

2. ОСНОВНІ МІСЦЯ КРІОПОШКОДЖЕНЬ

Під час заморожування-відігріву біологічних об'єктів без кріопротекторів або при медичній кріодеструкції пошкоджуються, більшою чи меншою мірою, практично всі компартменти та структури клітин. Але найбільш уразливими є такі структури та органели: мембрани, цитоплазма, ядро, мітохондрії, лізосоми, апарат Гольджі та ендоплазматичний ретикулум. Розглянемо деякі основні місця ушкоджень клітин тварин **після процесів заморожування-відігріву**.

2.1. Біологічні мембрани

Біомембрани є одним із основних елементів клітинної організації, основою структури та функцій усіх органів та тканин. Більшість клітинних органел мають в основі будови та функцій мембранні структури. Вони характерні для ендоплазматичної сітки, пластинчастого комплексу Гольджі, оболонки та крист мітохондрій, лізосом, вакуолей, пластид, ядерної оболонки та зовнішньої клітинної мембрани. Мембрани – складні молекулярні системи, високоупорядковані, відповідальні за структурну організацію та процеси життєдіяльності клітин. Наприклад, це поділ вмісту клітини на спеціалізовані замкнуті відсіки – *компартменти*, завдяки чому в клітині одночасно можуть протікати різні, навіть різноспрямовані процеси. Мембранами здійснюється регуляція метаболічних шляхів клітини, підтримання необхідної концентрації речовин (іонів, метаболітів) шляхом їх вибіркового переміщення, створення різниці електричних потенціалів, участь у ферментативних процесах та ін. Мембрани є основою для точного розміщення ферментів, що зумовлює сувору послідовність біохімічних реакцій. Наприклад, у шорсткій ендоплазматичній сітці відбувається синтез та модифікація білків, у гладкій – жирних кислот; у матриксі мітохондрій

здійснюється окислення органічних речовин, а на внутрішніх мембранах – синтез АТФ.

У різних організмів мембрани можуть мати різний білковий та ліпідний склад, відрізнятись деталями будови. Аналогічно, біомембрани різних органел мають свої особливості будови. Але принцип організації всіх різновидів мембран у різних тварин, рослин, грибів, найпростіших і бактерій той самий. Відповідно до рідинно-мозаїчної моделі будови, клітинні мембрани – це вибірково проникний ліпідний бішар із вбудованими в нього білками (рис. 2.)

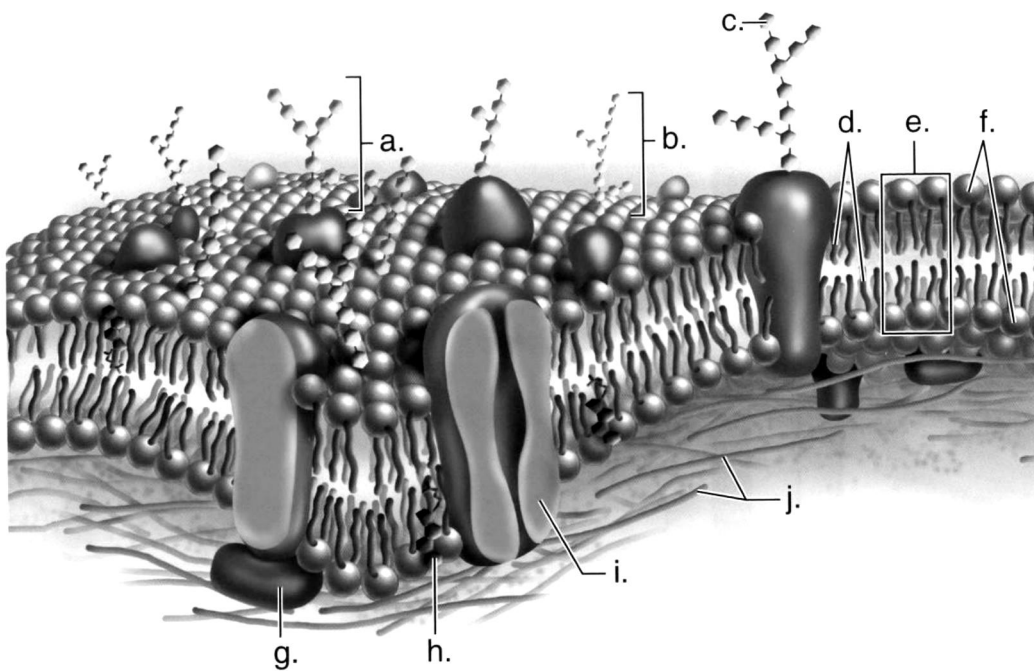


Рис. 2. Рідинно-мозаїчна модель біологічної мембрани. (Е. Рис, М. Стернберг, 2002). *a, b – олігосахариди, що утворюють глікокалікс; c – моносахарид; d – гідрофобні хвости фосфоліпідів; e – фосфоліпідний бішар; f – гідрофільні головки фосфоліпідів; g – субмембранний білок; h – стероїд; i – трансмембранний білок-канал; j – субмембранні білкові фібрили (спектринова сітка)-*

Неоднаковий ліпідний та білковий склад мембран різних органел забезпечує їх різноманітні функції. Кожен різновид мембран містить близько 50% білків. Мембрани мають певний відсоток вуглеводів. Наприклад, мембрана еритроцитів містить ~40% ліпідів, 52% білків та 8% вуглеводів. Білки не утворюють шари, а розташовані у вигляді мозаїки із глобул; при цьому одні з них знаходяться лише на поверхні, інші занурені в ліпідну фазу

частково або повністю, іноді пронизуючи її наскрізь. Ліпідний бішар представляє собою рідину, в якій окремі молекули ліпідів здатні дифундувати в межах свого моношару, а також можуть іноді переміщатися з одного моношару в інший. В'язкість та рухливість ліпідного бішару залежать від його складу та температури.

Цитоплазматична мембрана. Усі без винятку клітини, а також деякі віруси оточені мембраною. Цитоплазматична мембрана (плазмалема) зовні покриває клітини і є найважливішою у системі біомембран, необхідною умовою існування будь-якої клітини. Цитоплазматична мембрана має той самий принцип будови, як і інші біомембрани. Однак її будова складніша, тому що вона є поліфункціональною системою і виконує більше загальних, важливих для всієї клітини, функцій. До складу цитоплазматичних мембран, крім ліпідів та білків, входять також молекули гліколіпідів та глікопротеїдів з розгалуженими вуглеводними ланцюгами. Ці розгалужені ланцюги на поверхні клітини переплітаються один з одним, утворюючи начебто каркас із вплетеними в нього молекулами білків (глікокалікс), що складається з олігосахаридів, ковалентно зв'язаних з глікопротеїнами та гліколіпідами плазмалеми. Функціями глікокаліксу є: а) міжклітинне розпізнавання; б) міжклітинна взаємодія; в) об'єднання та цементування клітин між собою в тканинах; г) пристінне травлення.

З внутрішньої сторони клітини білки та глікопротеїни пов'язані з мікротрубочками та білковими нитками, що становлять елементи цитоскелету. Часто плазматична мембрана утворює безліч мікроворсинок. Це значно збільшує поверхню клітин, полегшуючи перенесення речовин через зовнішню мембрану та їх прикріплення до поверхні субстрату.

Цитоплазматична мембрана виконує ряд важливих функцій: відокремлює клітину від зовнішнього середовища, зберігає та підтримує її внутрішній вміст, вибірково переносить різні речовини, забезпечує зв'язок із зовнішнім середовищем, бере участь у ферментативних процесах.

2.1.1. Кріошкодження біологічних мембран

- Внаслідок виморожування води послаблюються або навіть зникають гідрофобні та полярні взаємодії між ліпідними та білковими молекулами мембран, що призводить до їх розпушування та розшарування. Розшарування відбувається вздовж усієї внутрішньої гідрофобної зони мембран.
- Внаслідок механічного впливу кристалів льоду ушкоджується структура та організація мембран, утворюються розриви та наскрізні дірки.

- Через зневоднення клітин, зменшення їх об'єму та зморщування, порушується топографія розподілу молекул білків та ліпідів, а також спеціальний функціональний розподіл молекул у біологічних мембранах.
- Мембрана втрачає певну кількість молекул білків та ліпідів у результаті виморожування.

Перелічені структурні патології призводять до функціональних порушень мембран та клітини вцілому.

- Порушується цілісність клітини. Вона перестає контролювати надходження та вихід води, іонів та інших речовин. Клітина набухає.
- Набуває змін як пасивний, так і активний транспорт. Порушується внутрішній структурно-функціональний гомеостаз клітин.
- Змінюються процеси метаболізму та їх координація через порушення компартменталізації клітин.
- Скорочується вироблення енергії на мембранах мітохондрій.
- Порушується синтез білків рибосомами на мембранах ендоплазматичної сітки.
- Втрачається або змінюється активність багатьох мембранно-зв'язаних ферментів.

Усі зазначені структурно-функціональні порушення біомембран проявляються лише після розморожування біологічних об'єктів, у зоні позитивних температур та відновлення клітинної активності.

Клітина має здатність відновлювати деякі порушення, що забезпечує її часткову або навіть повну реабілітацію через певний проміжок часу.

2.2. Цитоплазма

Цитоплазма є найважливішим компонентом усіх клітин. Вона виконує безліч клітинних функцій, з яких можна виділити: а) контроль та забезпечення перетворень матерії та енергії (метаболізм); б) забезпечення різноманітних функцій; в) взаємодія та підтримання функцій геному та поверхневого апарату.

Цитоплазма еукаріотів становить основну масу клітини – це її внутрішній вміст, крім ядра. Містить 75-85% води, 10-20% білків та багато інших речовин у відносно невеликих кількостях. При вивченні клітин за допомогою світлового мікроскопа цитоплазма є гомогенною, безбарвною, прозорою, в'язкою рідиною. Однак електронний мікроскоп дозволив побачити складну багатокомпонентну, поліфункціональну, високовпорядковану структуру цитоплазми.

Цитоплазма складається з цитозолу (цитоплазматичного колоїдного

матриксу), клітинних органел та включень.

Цитозоль є частиною цитоплазми (~55% загального об'єму клітин), не містить органел. Це структурований колоїд, що складається із складної суміші розчинених у воді органічних макромолекул – білків, жирів, вуглеводів, малих органічних молекул (амінокислоти, глюкоза, нуклеотиди, жирні кислоти тощо), а також неорганічних речовин. Містить тисячі різних видів білків, переважно ферментів.

Клітинні органели – це диференційовані ділянки цитоплазми еукаріотичних клітин, що мають специфічну будову та молекулярний склад. Це складні, високоупорядковані біологічні системи макромолекул, що утворюють певну просторову структуру, здатну до виконання спеціальних клітинних функцій. Клітини тварин містять багато внутрішньоклітинних мембран, тому майже половина всього колоїдного об'єму клітин міститься в окремих внутрішньоклітинних відсіках, які ми називаємо «органелами». Решта внутрішньоклітинного простору зайнята цитозолем, який є найважливішим компартментом клітини.

Клітинні органели умовно поділяють на мембранні, які оточені типовою біомембраною, та немембранні, що не мають такої оболонки.

2.2.1. Кріопошкодження цитоплазми

У зв'язку з виморожуванням внутрішньої води та кристалізації порушуються багато властивостей і функцій цитоплазми. Насамперед – її колоїдно-осмотичні характеристики. Цитоплазма втрачає свою здатність забезпечення цілеспрямованої взаємодії молекул.

- Порушується компартменталізація клітин та зв'язок між органелами.
- Змінюються структура та функції практично всіх органел.
- Пошкоджується система цитоскелету, що підтримує форму та об'єм клітин.

- Багато структурних білків і ферментів змінюють свою третинну і четвертинну структуру.

Ушкодження цитозолю та органел призводять до багатьох функціональних порушень.

- Насамперед страждає взаємозв'язок, координація та монолітність процесів метаболізму, оскільки гірше контролюються потоки речовин та енергії в цитоплазмі.
- Обмежується кількість можливих ферментативних реакцій та зв'язок між частинами клітин.
- Мембранні органели гірше виконують свої спеціальні функції.
- Змінюється форма клітин та їх об'єм.
- Зменшується утворення енергії.

- Знижується швидкість та якість синтезованих білків та інших речовин.

3. ЯДРО

Ядро (рис. 3) – сферичне тіло, оточене оболонкою. Основні функції ядра: зберігання генетичної інформації, реплікація ДНК та подальше розмноження клітин, транскрипція ДНК, утворення РНК, рибосом та контроль синтезу білків та інших метаболітів, управління метаболізмом та функціями. Діаметр ядра клітин тварин становить у середньому 2-6 мкм і залежить від типу клітин та їх активності. Об'єм ядра займає зазвичай близько 10-50% об'єму клітини. Ядерна оболонка є похідним ендоплазматичної сітки, проте її конфігурація така, що ядро виявляється вкрите двома шарами мембран. Нуклеолема (оболонка ядра) пронизана ядерними порами. Це складні макромолекулярні комплекси, що пронизують обидві мембрани, основна функція яких – забезпечувати транспорт з ядра рибосом і молекул РНК, що формуються в ньому, а також надходження в ядро білків, АТФ та інших субстратів для синтезу нуклеїнових кислот та ферментів.

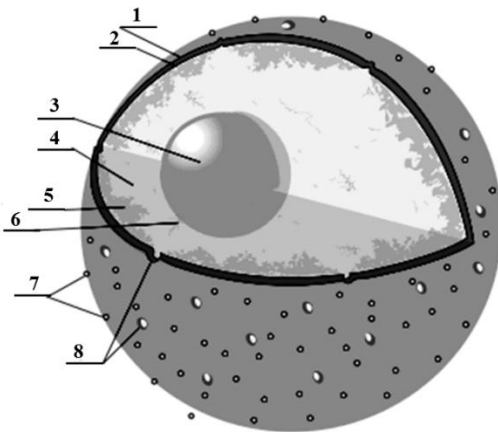


Рис. 3. Схема структурної організації ядра. 1 – зовнішня мембрана; 2 – внутрішня мембрана; 3 – ядерець; 4 – каріоплазма; 5 – гетерохроматин; 6 – еухроматин; 7 – рибосоми; 8 – ядерні пори.

Під ядерною оболонкою розташовується тонкий шар фібрилярних білків відповідальних за підтримку форми ядра. Цей шар називається **ядерною пластинкою**.

У порожнині ядра знаходиться рідке внутрішнє середовище, яке називається **нуклеоплазмою (каріоплазмою)**. За своїми фізичними властивостями вона рідка і близька за структурою до колоїдної цитоплазми. У її складі також є білкові нитки, що утворюють **ядерний скелет** – внутрішньоядерний аналог цитоскелету. У ядрі розташований **хроматин** – сукупність молекул ДНК і білків, що їх супроводжують. Похідним хроматину також є **ядерець**.

Найважливішими молекулярно-генетичними процесами, що протікають у ядрі, є: реплікація ДНК, транскрипція та утворення всіх видів РНК, процесинг РНК, утворення рибосом.

3.1. Кріпошкодження ядра

Заморожування-відігрів еукаріотичних клітин призводить до пошкодження ядер та їх вмісту. Основним фактором пошкодження є виморожування води, утворення кристалів і дегідратація. У замороженому стані клітини впадають в анабіоз і жодних порушень не виявляється. Тільки на етапі відігріву та після повного розморожування клітин проявляється весь комплекс структурно-функціональних порушень.

- Пошкоджується подвійна мембранна оболонка ядра та її пори, що з'єднують із цитоплазмою, внаслідок чого порушується внутрішній склад каріоплазми ядра. Може змінюватися транспорт білків у ядро, РНК та субодиниць рибосом у цитоплазму.
- Пошкодження хроматину можуть бути пов'язані з механічними розривами молекул ДНК та виморожуванням гістонових білків. Тіломірні та центромірні ділянки хромосом можуть відриватися від внутрішньої оболонки ядра.
- Під час поділу клітин кристалами льоду можуть пошкоджуватися хромосоми та веретено поділу, особливо на стадії метафази та анафази. Доволі вразливими є центріолі та мікротрубочки. Кінетохорні та полюсні мікротрубочки можуть «розсипатися» під дією дегідратації та механічного впливу.
- Затвердіння каріоплазми може призвести до пошкоджень третинної та четвертинної структури багатьох ферментів транскрипції, процесингу та реплікації.
- Молекули ДНК також можуть отримувати грубі розриви внаслідок затвердіння, механічного впливу та зміщення кристалів льоду.

Внаслідок ушкодження структур ядра можуть порушуватися найважливіші процеси: реплікація, транскрипція, процесинг та інші. Це, в свою чергу, призводить до порушення відтворення та розвитку. Ушкодження нуклеїнових кислот (ДНК та РНК) та порушення ферментів репарації можуть призводити також до стійких мутацій та порушень розвитку.

4. МІТОХОНДРІЇ

Мітохондрії – двомембранні органели, основна функція яких – аеробне дихання. У присутності кисню вони перетворюють продукти розщеплення органічних речовин у CO_2 та H_2O , при цьому виділяється енергія, що накопичується у формі АТФ. Тобто мітохондрії перетворюють

енергію хімічних зв'язків органічних речовин на енергію фосфатних зв'язків молекули АТФ, яку клітині зручно використовувати для всіх видів діяльності. Мітохондрії – досить великі овальні органели (0,2-2,0 мкм). Вони зустрічаються майже у всіх еукаріотичних клітинах, за винятком анаеробних найпростіших та еритроцитів. Мітохондрії хаотично розподілені по цитоплазмі, хоча найчастіше виявляються біля ядра або в місцях із високими потребами енергії. Органели можуть змінювати свою структуру та форму, здатні переміщатися усередині клітини. Кількість мітохондрій може змінюватись, залежно від активності клітини, від кількох десятків до кількох тисяч. Структура мітохондрій може дещо відрізнятись у різних типах клітин та різних тканинах. Однак усі мітохондрії мають принципово однакову будову (Рис.4).

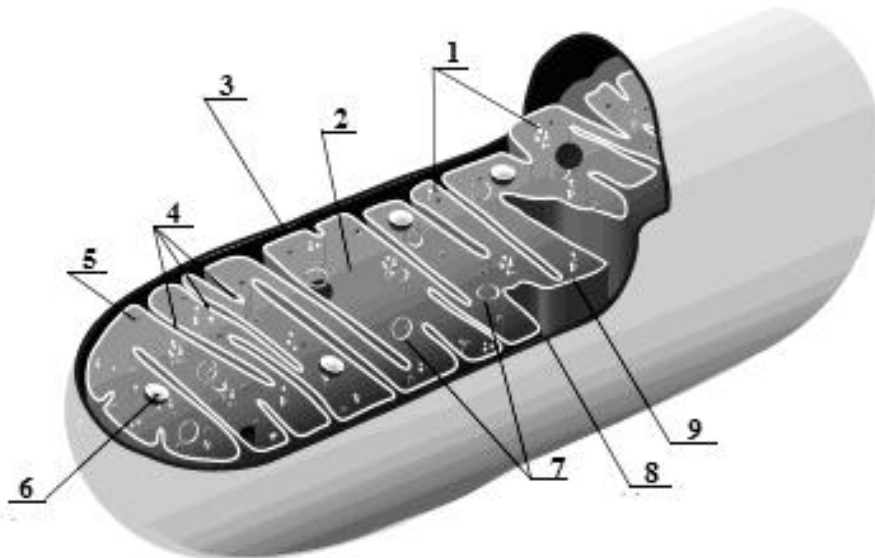


Рис. 4. Схема будови мітохондрії. Органела містить зовнішню та внутрішню мембрани з вузьким міжмембранним простором. Усередині мембрана утворює численні вирости - кристи, занурені в матрикс. У матриксі є численні ферменти, рибосоми, молекули ДНК. 1 – молекули АТФ-синтетази; 2 – матрикс; 3 – міжмембранний простір; 4 – кристи; 5 – рибосоми; 6 – гранули; 7 – ДНК; 8 – зовнішня мембрана; 9 – внутрішня мембрана.

4.1. Кріопшкодження мітохондрій

- Найбільш уразливими є мембрани мітохондрій. Вони можуть досить легко пошкоджуватися кристалами льоду, а виморожування рідкої води призводить до зменшення об'єму, пошкодження структури та зміни форми.

- Внаслідок пошкодження мембран відбувається порушення вибіркового транспорту речовин, компартменталізації та внутрішнього гомеостазу мітохондрій.
- Зокрема, всередину мітохондрій безконтрольно надходить вода, іони та метаболіти. Вони набухають, кристи фрагментуються, а матрикс розріджується.
- З органел у довкілля вільно виходять АДФ, Ф, H^+ , ферменти та інші речовини, необхідні для утворення АТФ.
- Порушується керований транспорт іонів водню (H^+) через внутрішню мембрану та електронів з дихального ланцюга мітохондрій.
- Знижується електрохімічний потенціал H^+ на внутрішній мембрані. Після цього зменшується ефективність роботи АТФ-синтетази, для якої іони водню є джерелом енергії для синтезу АТФ.
- Порушується основна функція мітохондрій – утворення макроергічних зв'язків АТФ.

5. ЛІЗОСОМИ

Лізосоми – це невеликі (0,2-0,8 мкм), покриті мембраною округлі тільця, основною функцією яких є внутрішньоклітинне травлення. Зустрічаються у всіх клітинах тварин та рослин. Можуть перебувати у будь-якому місці клітини. Вміст лізосом складають різні класи гідролітичних ферментів. Усього налічується до 40 різних груп ферментів. Наприклад, різні протеази, нуклеази, ліпази, фосфоліпази та ін. (табл. 1).

Таблиця 1.

Основні групи ферментів лізосом

Група ферментів	Субстрат (на що діють)	Продукт (що утворюється)
1. Протеази	Білки	Амінокислоти
2. Ліпази	Ліпіди	Фрагменти ліпідів
3. Нуклеази	Полінуклеотид (РНК, ДНК)	Азотисті основи + фосфат + пентоза
4. Глікозидази	Полісахариди	Моносахариди
5. Фосфатази	Фосфоєфірний зв'язок	Монофосфати

Ці ферменти руйнують великі молекули складних органічних сполук, що надходять у клітину (білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди). Ферменти лізосом піддають руйнуванню захоплені мікроорганізми та віруси. Лізосоми

знищують структури клітини, що відслужили, а також загиблі клітини. Ці процеси називаються аутофагією.

Кожна лізосома покрита щільною мембраною, яка ізолює ферменти, що містяться в ній, від решти цитоплазми. Ушкодження мембран лізосом і вихід із них у цитоплазму ферментів призводить до швидкого розчинення (лізису) усієї клітини.

5.1. Кріпошкодження лізосом

- Мембрана лізосом є основним місцем кріпошкоджень. Кристали льоду, механічні деформації та зневоднення порушують її бар'єрну функцію.
- Це призводить до викиду агресивних ферментів лізосом у цитоплазму.
- Гідролітичні ферменти руйнують практично всі органели та внутрішній вміст клітини, що призводить до її загибелі.

6. РИБОСОМИ

Рибосоми – невеликі гранулоподібні сферичні тільця, що мають розміри від 15 до 35 нм, основною функцією яких є синтез різноманітних білків. У період функціонування складаються з двох субодиниць. Рибосоми розташовані у цитозолі або пов'язані з мембранами ендоплазматичного ретикулуму.

Субодиниці рибосом утворюються в ядерці, а потім через ядерні пори окремо надходять до цитоплазми. Їхня кількість у цитоплазмі залежить від синтетичної активності клітини і може становити від сотні до декількох тисяч на одну клітину. Найбільша кількість рибосом виявлено в клітинах, що інтенсивно синтезують протеїни. Зустрічаються також у мітохондріальному матриксі та хлоропластах.

Рибосоми будь-яких організмів – від бактерій до ссавців – характеризуються подібністю структури та складу, хоча клітини прокариотів мають рибосоми менших розмірів і в меншій кількості (рис.5). Кожна складається з кількох різновидів молекул рРНК та десятків різновидів білків приблизно в однаковій пропорції. Маленька і велика субодиниці перебувають у цитоплазмі окремо, доки не залучені до білкового синтезу. Вони поєднуються одна з одною молекулою мРНК за необхідності синтезу і знову роз'єднуються з припиненням процесу.

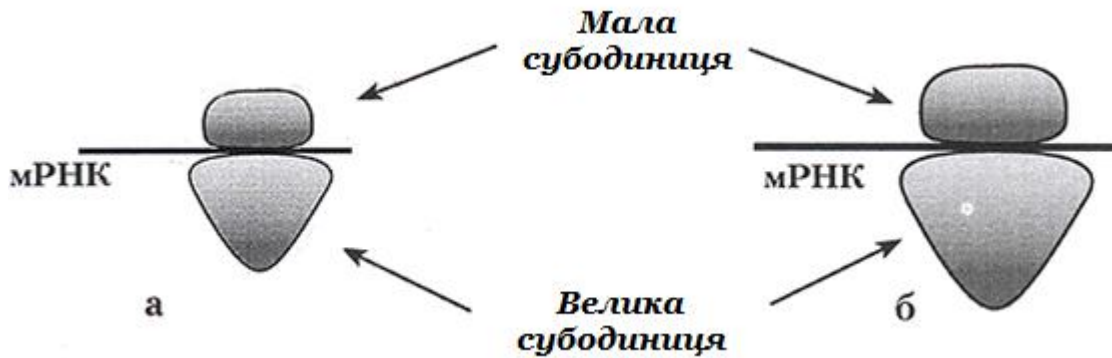


Рис. 5. Субодинаці прокаріотичних (а) та еукаріотичних (б) рибосом

Молекули мРНК, синтезовані в ядрі, надходять у цитоплазму до рибосом. З цитозолу молекулами тРНК до рибосом доставляються амінокислоти, де за допомогою ферментів та АТФ синтезуються білки. Якщо з однією молекулою мРНК з'єднуються кілька рибосом, то утворюються полісоми, які містять від 5 до 70 рибосом.

6.1. Кріопшкодження рибосом та синтезу білків

- Після виморожування води послаблюються водневі зв'язки, гідрофобні та гідрофільні взаємодії. Це зумовлює ослаблення зв'язків між субодинацями рибосом, інформаційною та транспортними РНК, що призводить до руйнування білоксинтезуючого комплексу або порушення його функціонування.
- Руйнуються полісоми.
- Порушується синтез необхідних клітині структурних і функціональних білків.
- Дефіцит білків призводить до різнобічних ушкоджень метаболізму та структури клітин.

7. АПАРАТ ГОЛЬДЖІ

Апарат Гольджі (АГ) утворений комплексом з десятків сплюснених дископодібних мембранних цистерн, мішечків, трубочок та везикул (рис.6). У значній кількості зустрічається в секреторних клітинах. Внутрішній міжмембранний простір заповнений матриксом, що містить спеціальні ферменти.

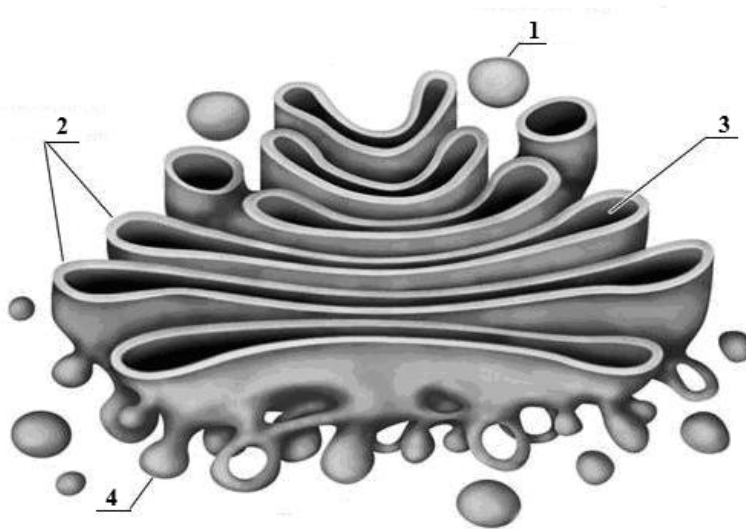


Рис. 6. Схеми організації апарату Гольджі. Це система зі складених у стопку мембранних сплюснених цистерн, що беруть участь у модифікації, сортуванні та упаковці макромолекул у везикули для секреції або використання їх в інших компартментах. 1 – везикула; 2 – цистерни; 3 – люмен; 4 – утворення везикул.

Апарат Гольджі має дві зони: **зону формування**, куди надходить синтезований матеріал з ендоплазматичної сітки (ЕПС) за допомогою транспортних везикул, і **зону дозрівання**, де формується секрет і зрілі секреторні мішечки.

У зону формування поступають синтезовані в ЕПС речовини, укладені в мембранні везикули. Вони зливаються з мембраною апарату Гольджі, і вміст везикул надходить усередину комплексу. Речовини обробляються ферментами, після цього знову упаковуються в везикули і переносяться в зону дозрівання, де знову модифікуються і поєднуються з іншими речовинами, утворюючи складний секрет. Він накопичується на термінальних ділянках АГ, звідки відділяються секреторні везикули. Зазвичай такі везикули транспортують секрети за межі клітини.

Функції апарату Гольджі:

1. Накопичення та модифікація синтезованих в ЕПС макромолекул.
2. Утворення складних секретів та секреторних везикул.
3. Синтез та модифікація вуглеводів, утворення глікопротеїнів.
4. АГ відіграє важливу роль в оновленні цитоплазматичної мембрани шляхом утворення мембранних везикул та їх подальшого злиття з клітинною мембраною.
5. Утворення лізосом.

6. Утворення пероксисом.

Таким чином, АГ є головним «регулювальником» руху макромолекул у клітині. Збирає синтезовані білки, жири, вуглеводи, диференціює їх у транспортні везикули та розподіляє по клітині та за її межі.

7.1. Кріопошкодження АГ

- Кристалізація та дегідратація є основними факторами кріопошкодження АГ.
- Насамперед ушкоджуються біомембрани. Порушується їх структура та цілісність.
- Внаслідок цього цистерни АГ втрачають здатність синтезувати та накопичувати необхідні речовини.
- Порушуються процеси утворення складних секретів, упаковка їх у мембранні везикули та транспортування до місця використання.
- Порушується процес утворення лізосом та пероксисом.
- Порушується клітинна система сортування та адресного транспортування речовин.

8. ЕНДОПЛАЗМАТИЧНА СІТКА

Ендоплазматична сітка (ЕПС), або ендоплазматичний ретикулум (ЕР), утворені комплексом мембранних трубочок, цистерн, овальних везикул і структурно пов'язані з оболонкою ядра (рис. 7). Розрізняють *два типи ЕПС: гладка та шорстка*, хоча вони структурно пов'язані між собою. Шорстка ЕПС несе на своїй поверхні рибосоми, яких немає на гладкій поверхні. ЕПС утворює мережу мембранних каналів, що пронизують цитоплазму. Вона має велике значення в процесах метаболізму, тому що збільшує площу «внутрішніх поверхонь» клітини, ділить її на відсіки, що відрізняються фізичним станом і хімічним складом, забезпечує ізоляцію ферментних систем, що, у свою чергу, необхідно для їх послідовного вступу в узгоджені реакції. Утворення мембранної системи дуже лабільні і можуть змінювати свою форму і розміри в залежності від фізіологічного стану клітини, характеру обміну, а також в процесі росту та диференціювання.

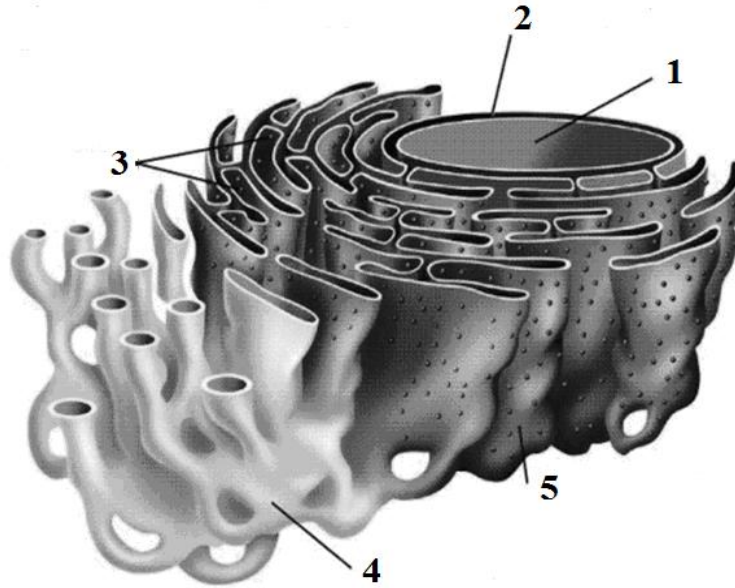


Рис. 7. Схема будови ендоплазматичної сітки (Д. Тейлор та ін., 2004). Цитоплазма еукаріотичних клітин пронизана мембранними шарами, бульбашками, трубочками, що обмежують у сукупності значний внутрішньоклітинний простір. Мембрани ЕР утворюють безперервні структури із зовнішньою ядерною мембраною. Шорстка ЕПС виглядає як система плоских цистерн, зовнішня сторона яких покрита рибосомами, що синтезують білки. Гладка ЕПС має більш виражену трубчасту будову і позбавлена рибосом. 1 – ядро, 2 – ядерна оболонка, 3 – рибосоми на шорсткій ЕПС, 4 – гладка ЕПС, 5 – шорстка ЕПС.

Функції шорсткої ЕПС:

1. Участь у процесі синтезу білків завдяки наявності на поверхні ЕПС рибосом.
2. Накопичення та модифікація синтезованих білків. Модифікація (зміна структури) відбувається завдяки ферментам матриксу ЕПС. При цьому багато білків набувають функціональної активності.
3. Упаковка синтезованих білків у везикули та транспортування до місць використання. Модифікований матеріал накопичується на термінальних ділянках ЕПС, від яких пізніше відділяються везикули, що містять секрет.

Функції гладкої ЕПС:

1. Синтез фосfolіпідів та стероїдів.
2. Синтез деяких вуглеводів, зокрема глікогену.
3. Накопичення та модифікація синтезованих речовин.
4. Упаковка у везикули та транспортування до місць використання.

5. Участь у процесах детоксикації шляхом ферментативного перетворення отрут на нетоксичні речовини, зручні для екскреції.

8.1. Кріопошкодження ЕПС

- Зміна структури та функції мембранної мережі ЕПС.
- Модифікація структури та функцій асоційованих з мембранами ферментів.
- Порушення синтезу, активації та накопичення білків.
- Порушення утворення, упаковки та транспорту білків та секретів.
- Трансформація синтезу ліпідів та вуглеводів.

Ще раз слід підкреслити, що всі описані кріопошкодження клітин виникають при заморожуванні, але виявляються і посилюються лише при розморожуванні та після повного відігрівання біологічних об'єктів.

Таким чином, заморожування-обігрів біооб'єктів (за відсутності кріопротекторів) сприяє суттєвим структурним і функціональним порушенням клітин. Пошкоджуються мембрани, органели, цитозоль, ферменти та інші компоненти клітин. Це призводить до того, що утворюються грубі механічні та осмотичні дефекти, відбуваються множинні порушення та дискоординація метаболізму. В результаті суттєво погіршуються процеси утворення енергії та синтезу необхідних макромолекул. У результаті відразу після розморожування починають виявлятися всі кріодефекти, які з часом посилюються, що призводить до загибелі та некрозу значної частини клітин біологічного об'єкта.

Наслідком описаних процесів є холодові травми та обмороження у людини в умовах морозу у зимовий період року. З іншого боку, руйнівний ефект заморожування-обігріву використовується в практиці медичної кріохірургії.

Клітини мають здатність до регенерації деяких незначних ушкоджень, тому якась кількість клітин все-таки може вижити. Але цього недостатньо, якщо стоїть завдання збереження та довгострокового зберігання біоматеріалу. Тому для кріоконсервування та тривалого зберігання біологічних об'єктів, з метою їх подальшого використання в медичній практиці, обов'язково застосовують спеціальні захисні речовини та середовища – кріопротектори та кріоконсерванти. Це сприяє збереженню більшості клітин та тканин життєздатними навіть після заморожування до мінус 196°C, довгострокового зберігання та подальшого відігріву. Застосування кріопротекторів, що помірно дегідратують клітини, що знижують точку замерзання клітинної та навколишньої води та перешкоджають утворенню великих кристалів, сприяє запобіганню появи та розвитку багатьох кріодефектів. Тому правильно

підібрані кріопротектори можуть повністю або частково захистити та відновити як структуру, так і функції клітин та біоб'єктів загалом.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Які основні компартменти (відсіки, органели) мають клітини тварин?
2. Якою структурою компартменти відокремлені один від одного?
3. У якому агрегатному стані знаходяться клітини, їх органели та біологічні мембрани?
4. Що собою представляє колоїдний розчин у клітинах?
5. У якому агрегатному стані знаходиться вода у клітинах?
6. Які основні складові колоїдного розчину цитоплазми?
7. Які основні анаболічні та катаболічні процеси протікають в органелах та цитоплазмі?
8. У чому проявляється організованість та впорядкованість структур та функцій у клітинах?
9. Що таке тепловий рух молекул та Броунівський рух у клітинах?
10. Що таке дифузія і чим вона забезпечується та підтримується у клітинах?
11. Яке значення для клітин має осмос і який його механізм?
12. Що таке явище каталізу?
13. Які молекули забезпечують каталіз біохімічних реакцій у клітинах?
14. Що є основною причиною кріопшкоджень клітин та їх структур при заморожуванні?
15. У яких агрегатних станах може бути вода і водні колоїдні розчини білків?
16. Що таке процес кристалізації водних розчинів?
17. У чому проявляється механічна дія кристалів льоду на клітини?
18. Чим обумовлений процес зневоднення (дегідратації) клітин при повільному заморожуванні без кріопротекторів?
19. Чому припиняються процеси Броунівського руху та дифузії у замороженому стані клітин?
20. Які причини зупинки метаболізму у замороженому стані?
21. Що таке стан клітинного анабіозу?
22. Чому припиняються процеси катаболізму та руйнування структури у заморожених клітинах?
23. Як довго біологічні об'єкти можуть перебувати у стані анабіозу?

24. На якому етапі заморожування-відігріву проявляються негативні наслідки дії факторів заморожування?
25. Яка ймовірність збереження після відігріву життєздатності клітин та біологічних об'єктів після заморожування без кріопротекторів?
26. Від яких умов залежить виживання клітин після заморожування-відігріву?
27. Що таке швидкість заморожування біооб'єктів?
28. Яка існує класифікація швидкостей заморожування біооб'єктів?
29. Які особливості швидкого та повільного заморожування?
30. Яка причина утворення каналців рідкої фази при повільному заморожуванні?
31. Яка швидкість заморожування без кріопротекторів є найбільш сприятливою?
32. Які негативні процеси розвиваються у біооб'єктах після розморожування?
33. Які структури клітин є найбільш вразливими при заморожуванні-відігріванні?
34. Яка роль біологічних мембран у забезпеченні життєдіяльності клітин при фізіологічних температурах?
35. Яку будову мають біологічні мембрани в нормі?
36. Як змінюється в'язкість та щільність мембран після заморожування-відігріву?
37. Які кріопошкодження виникають у біомембранах у процесі заморожування та відігріву?
38. Які причини призводять до порушень структури та організації мембран?
39. До яких метаболічних та функціональних порушень призводить процес заморожування-відігріву клітин?
40. Чи здатна клітина відновлювати деякі кріопошкодження?
41. Які функції виконує цитоплазма клітин?
42. Скільки відсотків рідкої води міститься в колоїді цитозолу в інтактних клітинах?
43. Які структури та процеси порушуються в цитозолі після заморожування-відігріву клітин?
44. Яка основна причина кріопошкоджень цитозолу?
45. Яку структуру мають ядра інтактних клітин тварин?
46. Які основні біохімічні процеси протікають у ядрах клітин?

47. Які основні фактори пошкодження ядер при заморожуванні та відігріванні?
48. Які структури ядра ушкоджуються холодом?
49. Чи можуть ушкоджуватися хромосоми, хроматин та нуклеїнові кислоти при заморожуванні-відігріванні?
50. Чи ушкоджуються макромолекули ферментів у процесі заморожування-відігріву?
51. Чому можуть порушуватися процеси реплікації та транскрипції після заморожування-відігріву?
52. Яку структуру мають нативні мітохондрії та які основні функції вони виконують у клітинах?
53. Яка структура мітохондрій є найбільш вразливою при заморожуванні-відігріванні?
54. Який механізм порушення дихального ланцюга мітохондрій після дії низьких температур?
55. Яку будову та яку метаболічну роль відіграють лізосоми в інтактних клітинах?
56. Який механізм руйнування лізосом при заморожуванні та відігріванні?
57. До яких наслідків для розморожених клітин призводить руйнування лізосом?
58. Яка будова та які функції забезпечують рибосоми в інтактних клітинах?
59. Які фактори кріопшкоджень призводять до порушення функцій рибосом?
60. Який механізм порушення синтезу білків у клітинах після заморожування-відігріву?
61. Яка структура та функції апарату Гольджі в інтактних клітинах?
62. Які фізико-хімічні фактори призводять до пошкоджень після заморожування-відігріву?
63. Яка структура та функції ендоплазматичної сітки в інтактних клітинах?
64. Які структури ендоплазматичного ретикулуму пошкоджуються холодом і до яких наслідків це призводить?
65. Яка роль процесу відігріву у прояві прихованих ушкоджень при заморожуванні?

66. До яких наслідків призводять кріопошкодження клітин під час обмороження?

67. Як процеси кріопошкоджень можуть використовуватися у практиці кріохірургії?

ЛІТЕРАТУРА

1. Молекулярна біологія: підручник / А.В. Сиволоб. - К. : Видавничо-поліграфічний центр “Київський університет”, 2008. - 384 с.
2. Molecular biology of the cell. 6th ed. / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. — N.-Y.: Garland Science, 2014. — 1464 p.
3. Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1066:119–35. [[Google Scholar](#)]
4. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 2000;41:187–96. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Willem F. Wolkers and Harriëtte Oldenhof (eds.), (2015) Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, [Methods in Molecular Biology], vol. 1257, DOI 10.1007/978-1-4939-2193-5_1, © Springer Science+Business Media New York.
6. Peg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med.* 2002 Feb;20(1):5-13. doi: 10.1055/s-2002-23515.
7. Crook, Jeremy M.; Ludwig, Tenneille E. (2017). [Methods in Molecular Biology] Stem Cell Banking Volume 1590 || Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling. , 10.1007/978-1-4939-6921-0(Chapter 5), 41–77. doi:10.1007/978-1-4939-6921-0_5
8. Інформаційна база наукових статей – www.ncbi.nlm.nih.gov.

Навчально-методичне видання

ЖЕГУНОВ Геннадій Федорович
ДЕНИСОВА Ольга Миколаївна
ГЛАДКА Наталія Іванівна

КРІОПОШКОДЖЕННЯ КЛІТИН

Навчально-методичний посібник

Формат 60x84/16. Гарнітура Times New Roman
Папір для цифрового друку. Друк ризографічний.

Ум. друк. арк. 1,7.

Наклад __ пр.

Державний біотехнологічний університет
61002, м. Харків, вул. Алчевських, 44