

Физико-химические процессы в зародышевой растительной ткани при переходе в состояние холодого анабиоза и хранении при температуре жидкого азота

А.Т. Ходько, Ю.С. Лысак

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, Украина

E-mail: a.khodko4@mail.ru

Статья поступила в редакцию 5 декабря 2016 г., после переработки 15 февраля 2017 г.
опубликована онлайн 27 августа 2017 г.

Обнаружено явление критической опалесценции в цитоплазме зародышевой ткани чеснока — меристеме при охлаждении в парах жидкого азота, что указывает на наличие в системе фазового перехода жидкость–жидкость. Установлен факт выживания клеток ткани меристемы в цикле охлаждения–отогрев. Высказано предположение, что главной причиной перехода меристемы в состояние анабиоза является резкое замедление диффузии в цитоплазме, обусловленное прохождением раствора через критическую точку, с последующим формированием в результате фазового перехода типа жидкость–жидкость дисперсной системы — высококонцентрированной эмульсии. Такое макрофазное разделение характерно для систем полимер–растворитель. Определен режим охлаждения в цикле криоконсервирования изучаемого биообъекта до температуры жидкого азота и его последующего отогрева, обеспечивающий сохранение жизнеспособности ткани.

Виявлено явище критичної опалесценції в цитоплазмі зародкової тканини часнику — меристемі при охолодженні в парах рідкого азоту, що вказує на наявність в системі фазового переходу типу рідина–рідина. Встановлено факт збереження життєздатності клітин тканини меристемі в циклі охолодження–нагрівання. Висловлено припущення, що головною причиною переходу в стан анабіозу є різке уповільнення дифузії в цитоплазмі, яке обумовлене переходом розчину через критичну точку, з наступним формуванням, як результат фазового переходу типу рідина–рідина дисперсної системи — висококонцентрованої емульсії. Такий тип макрофазного розділення є типовим для систем полімер–розчинник. Визначено режим охолодження в циклі криоконсервування біологічного об'єкту, що вивчається, до температури рідкого азоту та його наступного нагрівання, що забезпечує життєздатність тканини.

PACS: 64.70.P– Переходы в стеклообразное состояние в специфических системах;
64.70.Ja Переходы жидкость–жидкость;
64.70.pj Полимеры.

Ключевые слова: анабиоз, криоконсервирование, критическая опалесценция, фазовые переходы (превращения) жидкость–жидкость, жидкостное фазовое разделение, стеклование.

Введение

Явление обратимой остановки жизни — анабиоз было открыто в 1701 г. Антоном ван Левенгуком при наблюдении за тихоходками и коловратками в циклических процессах их высушивания и последующего увлажнения. Это состояние организмов часто встречается в природе. По мнению Голдовского, анабиоз является всеобщим, первичным, но не всегда реализуемым свойством живой материи [1].

Широкое внедрение этого явления в практику связано с развитием физики низких температур и повторным открытием в 1949 г. Полджем криопротекторных свойств глицерина [2]. В 1912 г. русский ученый Максимов описал [3] феномен повышения холодоустойчивости растений после предварительного выдерживания их в водных растворах различных веществ, в том числе и глицерина, однако впоследствии эти исследования были забыты. На этой базе сформировался один из

разделов физико-химической биологии — криобиологии. Появились технологии криоконсервирования и сублимационной сушки, сочетающие охлаждение и высушивание в вакууме, позволяющие искусственно переводить биосистемы в состояние анабиоза. Надо заметить, что это явление необходимо учитывать и при проведении других процессов, например при стерилизации, при перелетах межпланетных аппаратов с целью исключения заноса земных форм жизни и др. Изучение и решение проблем анабиоза важно для практических целей, а также имеет общеприкладное значение. К сожалению, интенсивных исследований в этом направлении не ведется. По мнению Ушатинской, анабиоз относится к «заброшенным проблемам» [4].

Несмотря на длительную историю вопроса, в понимании физико-химических процессов при переходе живых систем в это состояние до сих пор имеется много неясного и спорного. Однако очевиден тот факт, что определяющими факторами в реализации механизмов анабиоза являются физические параметры внешней среды и вызываемые ими изменения структуры и свойств цитоплазмы и клеточных органелл. Большинство исследователей переход биосистемы в состояние холодого анабиоза связывают с замедлением биохимических реакций, а также с процессами кристаллизации льда и стеклования в цитоплазме и окружающем клетки растворе [5–8] при понижении температуры.

Известно, что цитоплазма представляет собой многокомпонентный водный раствор с большим содержанием полимеров, и при понижении температуры в ней возможны как фазовые переходы жидкость–кристалл, так и критические фазовые переходы жидкость–жидкость (ФПЖ–Ж). При ФПЖ–Ж первично однородная (матричная) жидкая фаза распадается на две или большее количество фаз, отличающихся по концентрации компонентов между собой и от исходной фазы. Отметим, что в таких системах первым актом фазовых превращений наиболее вероятным будет ФПЖ–Ж, так как для образования зародыша новой аморфной фазы требуется только соответствующая флуктуация по концентрации, без трехмерной упорядоченности, необходимой для появления зародыша критического размера кристаллической фазы. При спиноподобном механизме фазового превращения достаточными оказываются очень малые флуктуации по составу. Они имеют тенденцию резко увеличиваться за счет возрастания различия в составе соседних элементов объема. В результате оказывается, что, в отличие от механизма зародышеобразования, распад по спиноподобному механизму протекает чрезвычайно быстро. Только после этого, причем не всегда в конечные сроки экспериментального наблюдения (большие времена установления равновесия — индукционный период), становится возможной кристаллизация [9]. По представлениям Френкеля и Каргина, кристаллизация является вторичным процессом [10].

Такой двухступенчатый механизм кристаллизации Vekilov называет «неклассической» нуклеацией [11].

В области биотехнологии растений используются методы вегетативного размножения с помощью эксплантов, т.е. частей растения, содержащих тотипатентную зародышевую ткань — меристему, имеющую способность дифференцироваться во все типы клеток и из которых можно вырастить целый новый организм. В качестве эксплантов могут выступать черенки, почки и др. Также из них выделяют практически индивидуальную недифференцированную зародышевую ткань, что используется, например, для получения безвирусного материала. Создание запасов таких генетических ресурсов, в том числе и в состоянии анабиоза, в целях сохранения биоразнообразия и селекции, является актуальной научной проблемой.

В работе [12] было показано, что при относительно медленном охлаждении зародышевой растительной ткани (корневой меристемы чеснока (*Allium sativum* L.)) наблюдалась близкая к 100% ее сохранность. Особый интерес представляет тот факт, что наряду с тканью, криоконсервированной под защитой криопротекторов, выживала и нативная ткань, т.е. криоконсервированная без предварительной обработки криозащитными растворами.

Повышенный интерес к сохранению этого объекта связан с тем, что в ходе биологической эволюции это растение утратило способность производить семена. Для создания запасов генетических ресурсов чеснока необходимо криоконсервировать вегетативную ткань.

Отметим, что семена растений находятся в состоянии покоя естественным образом.

Имеются сообщения о выживании при охлаждении до температуры жидкого азота нативных меристем картофеля [13], пазушных почек ивы и шелковицы [14], апексов земляники садовой [15]. Все описанные здесь наблюдения согласуются с гипотезой А.М. Голдовского.

С целью выяснения природы фазовых переходов в цитоплазме при криоконсервировании нами было предварительно проведено изучение фазового поведения клеточного сока, полученного из всего комплекса тканей зубка чеснока, представляющего собой видоизмененную почку. Такая модель максимально близка по составу к цитоплазме клеток меристемы, но обладает объемом, позволяющим провести более детальное изучение происходящих в ней фазовых превращений. Регистрируя критические явления оптическим методом и оценивая консистенцию образовавшегося продукта, в работе [16] было установлено, что при охлаждении–отогреве в клеточном соке реализовывался ФПЖ–Ж, в результате которого образовывалась грубодисперсная система — высококонцентрированная эмульсия (псевдогель) типа «вода в масле». Известно (см. например, [17]), что именно макрофазное жидкостное фазовое разделение характерно для растворов полиме-

ров, обладающих пониженной, по сравнению с растворами низкомолекулярных веществ, суммарной энтропией и, как правило, не способных к образованию мицелл. Признаков образования льда в биологической жидкости в работе [16] выявлено не было.

Рожков [18] наблюдал критические явления и ФПЖ–Ж в водно-солевых растворах альбумина, как модели цитоплазмы, при изменении концентрации соли.

В экспериментах Hirsh, Bent и Erbi [19] исследовались почки и черенки тополя (*Populus balsamifera L.*), которые в состоянии зимнего покоя были помещены в жидкий азот. Сочетая методы дифференциального термического анализа, динамического механического анализа и электронной микроскопии, авторы [19] пришли к выводу, что в цитоплазме этих объектов имел место ФПЖ–Ж.

Таким образом, анализ результатов работ [13–19] позволяет сформулировать представление, что ФПЖ–Ж является главной причиной перехода зародышевых растительных тканей из жизнедеятельного состояния в анабиоз (см. также [20]).

Данное представление [20] основывалось на допущении, что фазовые превращения в ткани меристемы, малый объем которой затрудняет детальное изучение свойств выделяемой из нее жидкости, и в клеточном соке, полученном из целого зубка чеснока, идентичны по своей природе.

Целью данной работы является определение природы фазового перехода непосредственно в живой ткани меристемы и обоснование режимов ее охлаждения до температуры жидкого азота, при которой происходит хранение биоматериала.

Материалы и методы

Корневую меристему чеснока сорта «Мерефанский белый» выделяли в условиях стерильного ламинарного бокса из основания побега, находящегося в зубке. Средняя масса одной меристемы, определенная по результатам взвешивания 6 экземпляров, составила 0,5 мг.

Для криоконсервирования образцы ткани помещались в стерильные контейнеры на основе полиимидно-фторопластовой пленки ПМФ-351 (ТУ-6-19-226-89), которые герметизировались путем термической сварки.

Для оптического наблюдения процессов при охлаждении, исследуемую ткань помещали на поверхность чашки Петри из силикатного стекла и накрывали предметным стеклом (имитация контейнера), чтобы уменьшить скорость охлаждения и испарения воды от непосредственного контакта со струей паров азота. В данном исследовании выделение растительного биологического материала производилось без соблюдения правил асептики.

Микроскопию в проходящем свете лампы накаливания с увеличением $\times 80$ проводили на микроскопе PZO Warszawa (Польша). Результаты фиксировали в

видео режиме цифровой микроскопической камерой «LEVENHUK C 130» (Китай) с частотой 30 кадров в секунду.

Охлаждение исследуемых биообъектов проводилось способами, приведенными в табл. 1.

Таблица 1. Используемые режимы охлаждения

Номер режима	Описание режима охлаждения
Режим №1	Прямое погружение с покачиванием контейнеров с биообъектами в жидкий азот.
Режим №2	Помещение контейнеров с биообъектами в пары жидкого азота на высоте 35–50 мм от зеркала на 30 мин с последующим погружением в жидкий азот.
Режим №3	Обдув с расстояния 40–50 мм парами жидкого азота биообъекта, находящегося на столике микроскопа между предметным стеклом и чашкой Петри.

Срок хранения образцов в жидком азоте составлял трое суток. Отогрев контейнеров осуществляли на воздухе при комнатной температуре до исчезновения инея на поверхности контейнера, что занимало 2–3 мин. Вскрытие контейнера производилось с соблюдением правил асептики и антисептики.

Жизнеспособность меристем оценивалась методом культивирования их после деконсервации на среде Murashige и Skoog [21] в фитотроне в режиме шестнадцатичасового светового дня при температурах 15–17 °С.

Эксперименты проводились в конце января – начале февраля. Количество параллельных опытов при культивировании криоконсервированного материала равнялось 6, при оптическом наблюдении — 5.

Результаты и обсуждение

В образцах, криоконсервированных по режиму №1, выживших экземпляров обнаружено не было.

Результаты культивирования контрольных образцов и охлаждавшихся по режиму №2 на 30-е сутки эксперимента представлены на рис. 1(а), (б). Данное наблюдение однозначно свидетельствует о наличии состояния анабиоза в процессе низкотемпературного хранения. Отметим, что рост и развитие растений из экспериментальных образцов меристемы (рис. 1(б)) отстает от контрольных (рис. 1(а)), не подвергавшихся охлаждению. Это достоверно указывает на наличие нелетальных повреждений, имевших место в процессе криоконсервирования.

Морфологическая картина препарата меристемы чеснока представлена на рис. 2.

В верхней и левой части препарата видна жидкость, вытекающая из ткани. По химическому составу она близка к цитоплазме. Некоторые различия могут быть связаны с процессом смешения цитоплазмы с межклеточ-

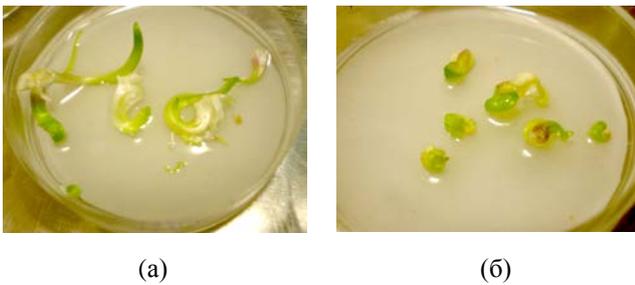


Рис. 1. (Онлайн в цвете) Культивирование контрольных образцов (а) и охлажденных по режиму №2 (б) на 30-е сутки эксперимента.

ной жидкостью, но в зародышевой ткани клетки плотно прилегают друг к другу, и подавляющую часть объема составляют именно они. Резко очерченная черная дуга — это край образовавшейся капли. Зернистая структура, занимающая основную площадь препарата, — клеточная масса. Мелкие черные точки в ней — ядра клеток. Клеточная стенка в меристеме находится на начальном этапе своего формирования.

По мере охлаждения по режиму №3 система достигает температуры фазового перехода, и препарат резко затемняется за время около 1 с в пределах поля зрения микроскопа. Начальный этап этого процесса представлен на рис. 3(а). Состояние системы через 1 с представлено на рис. 3(б). Потемнение происходит в клеточной массе и вытекшей из нее жидкости одновременно, что свидетельствует об идентичности их химического состава и фазового поведения при охлаждении. За пределы ткани и вытекшей из нее жидкости, ограниченной дугообразной границей, процесс потемнения не распространился. Во всех экспериментах были получены схожие результаты.

Температурный диапазон фазового превращения непосредственно в изучаемом живом биообъекте технически определить затруднительно из-за малых размеров и неравновесности системы, создающей значительный градиент температур. В модельном объекте — клеточном соке чеснока — нами было установлено, что он находился в диапазоне (-2) – (-5) °C [16].

Высокая скорость фазового перехода говорит о его кооперативной природе, что характерно для вещества, находящегося в критическом состоянии [22].

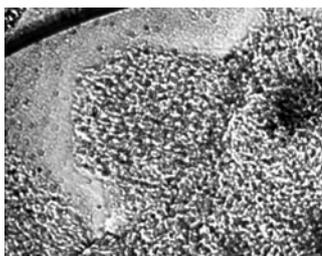


Рис. 2. Морфологическая картина препарата меристемы чеснока. Увеличение $\times 80$.

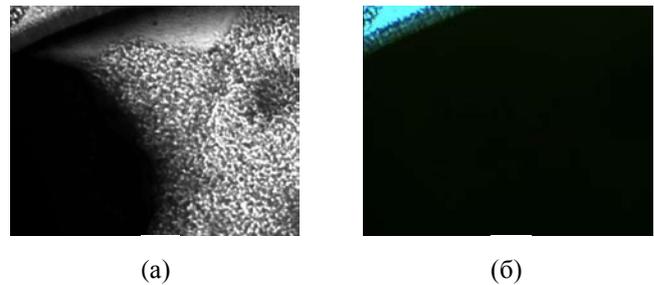


Рис. 3. (Онлайн в цвете) (а) Начальный этап процесса критической опалесценции, (б) состояние через 1 с от состояния на рис. 3(а). Увеличение $\times 80$.

В целях более детального изучения динамики процесса критической опалесценции нами было проведено наблюдение за этим явлением в листе высшего водного растения — элодеи (*Elodea L.*). Это растение обладает гораздо более крупными клетками, по сравнению с клетками меристемы чеснока, и является удобным модельным объектом.

При охлаждении в условиях, аналогичных вышеописанным, наблюдалось потемнение клеток, распределение которых по листу было случайным. Фрагмент видеogramмы этого процесса представлен на рис. 4. При кадровом просмотре не удалось зарегистрировать процесс развития потемнения в отдельной клетке, это указывает, что он занимает время менее 1/30 с. Данный результат подтверждает кооперативный характер критического состояния в клетках листа.

Похожие наблюдения были описаны ранее. Так, высокую скорость процесса изменения внешнего вида клеток корней пшеницы при охлаждении в процессе изучения явления вымерзания растений отмечал Бугаевский еще в 1939 г. [23].

Усиление светорассеяния преимущественно в сторону возбуждающего света, носящее название критической опалесценции [24], обусловлено флуктуацией параметра порядка (концентрация для растворов) и появлением капиллярных волн на границе раздела фаз вследствие низких значений поверхностного натяжения в окрестности критического состояния [25]. Коэффициент поверхностного натяжения и интенсивность рассеянного света находятся в обратной зависимости. Разработка теории рассеяния света на молекулярных «шероховато-

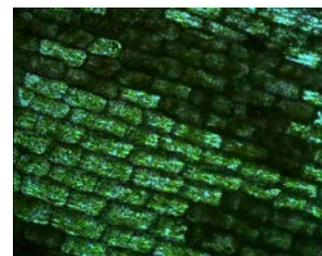


Рис. 4. (Онлайн в цвете) Критическая опалесценция в клетках листа элодеи при охлаждении. Увеличение $\times 80$.

стях» поверхности раздела фаз и первое экспериментальное наблюдение этого явления принадлежит Мандельштаму [24]. Теоретическое объяснение процесса опалесценции вблизи критической точки растворов, как следствие флуктуаций концентрации компонентов, было дано Эйнштейном в 1910 г. [26].

Если ФПЖ–Ж реализуется по механизму нуклеации–роста зародышей, то это ведет к образованию на его начальных этапах низкоразмерных неупорядоченных структур, представляющих собой капли, отличающиеся по концентрации компонентов от матричной фазы. По мере их роста и реализации процессов коагуляции и коалесценции формируется грубодисперсная система — эмульсия.

Критические явления могут быть только при фазовых переходах между изотропными фазами, например, жидкость–газ и жидкость–жидкость. В случае перехода жидкость–кристалл параметр порядка меняется скачком и сразу принимает конечное значение, что исключает возможность его флуктуаций [27]. В данной работе низкоразмерные неупорядоченные структуры являются не предметом, а инструментом исследования, позволяющим понять природу и механизм фазового перехода. Исследования методом светорассеяния показали, что эффективные размеры микрокапелек в критических эмульсиях составляют несколько десятков нанометров [28]. Частицы дисперсной фазы таких размеров способны к участию в броуновском движении [25]. Это повышает энтропию системы и, соответственно, понижает ее свободную энергию, что делает ультрамикрорегетерогенные критические эмульсии, в отличие от прочих эмульсий, термодинамически стабильными системами.

Полученные результаты позволяют заключить, что при охлаждении в цитоплазме клеток меристемы чеснока имеет место переход через критическую точку раствора и последующий фазовый переход типа жидкость–жидкость, протекающий по механизму нуклеации–роста зародышей.

Резкое замедление диффузии в окрестности критического состояния ведет к практической остановке бимолекулярных биохимических реакций [22]. После прохождения критической точки раствора восходящая (против градиента концентрации — «эффект Горского») диффузия [29] формирует в цитоплазме связнодисперсную систему — высококонцентрированную эмульсию, иначе называемую псевдогель. Она обладает так называемой «структурной вязкостью», которая значительно превышает исходную вязкость однофазного раствора. Совокупность вышеперечисленных факторов делает жизнедействующее состояние невозможным.

Возобновление жизнедеятельности системы после отогрева достоверно указывает на наличие в охлажденных образцах меристемы состояния холодового анабиоза. Для его реализации одним из условий является прак-

тическое отсутствие диффузии в цитоплазме. В состоянии анабиоза она, главным образом, определяет скорость биохимических процессов жизнедеятельности. Наряду с этим изменяется состояние гидратных оболочек ионов и макромолекул, что потенциально также должно сказаться на жизнедеятельности.

В системе полимер–растворитель ФПЖ–Ж может быть обусловлен как изменением температуры, так и концентрации компонентов раствора [9]. Анабиоз при высыхании — ангидробиоз, — впервые и был описан Левенгуком. Гелеподобная структура цитоплазмы микроорганизмов, высушенных путем сублимации и находящихся в этом состоянии, описана в работе [30]. Краткий литературный обзор по процессам, протекающим при переходе биологических объектов в ангидробиоз и реактивации после него, был осуществлен Харчук [31].

В качестве примера ФПЖ–Ж, реализуемых при изменении различных термодинамических параметров, можно привести следующее наблюдение. На рис. 5(а) показана микроскопическая картина фазового распада среды культивирования, в которой находятся клетки семенников порослят, при охлаждении, а на рис. 5(б) — фазовый распад этой же капли при ее высыхании при комнатной температуре на столике микроскопа. Во втором случае фазовое превращение вызвано изменением содержания воды в растворе. Регулярная (модулированная) дендритная структура характерна для промежуточных стадий ФПЖ–Ж, который реализуется по спиноподобному механизму. Модулированные структуры интерпретируются как системы упругих концентрационных доменов, образование которых приводит к достижению абсолютного минимума суммы химической свободной энергии и энергии внутренних механических напряжений в системе [32].

Вероятней всего, в основе обоих видов анабиоза лежит одно и то же явление — ФПЖ–Ж, но вызываемое изменением различных параметров состояния. По сути, явление анабиоза обусловлено свойствами растворов, частным случаем которых является цитоплазма, и не определяется специфическими свойствами биологического уровня организации материи. По нашему мнению,

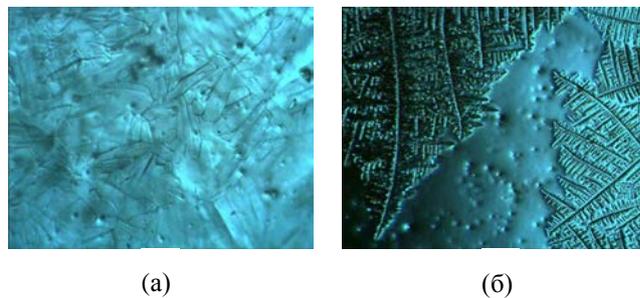


Рис. 5. (Онлайн в цвете) Фазовый распад среды культивирования при охлаждении (а) и в этой же капле при высыхании (б). Увеличение $\times 80$.

такое представление о механизмах перехода биосистем в нежизнedeйствующее состояние подтверждает правильность гипотезы, сформулированной Голдовским о первичности и всеобщности анабиоза [1].

Как видно из изложенного, в процессе фазового перехода в цитоплазме происходят значительные изменения, но возобновление после деконсервации процессов жизнедеятельности достоверно свидетельствует о возможности восстановления жизнеспособной структуры. Вероятно, это явление частично обусловлено фундаментальным свойством полимеров — малой способностью к смешению, определяемой низкой, по сравнению с эквивалентным числом независимых молекул, энтропией полимерных цепей [33]. Полимерные молекулы практически не изменяют своих индивидуальных свойств, концентрируясь в дисперсионной среде [34]. После смешения с водой из дисперсионной фазы в случае охлаждения либо из окружающей среды в случае высушивания биологическая система, как показывает практика, в ряде случаев способна вернуться к жизнедеятельному состоянию.

Смерть клеток могут вызывать причины, сопутствующие фазовому переходу, — повреждение мембран и клеточных органелл в результате увеличения объема при ФПЖ–Ж, изменение агрегатного состояния самих мембран, растрескивание в затвердевающей цитоплазме (в жизнедеятельном состоянии представляющей собой многокомпонентный раствор), нарушение межклеточных контактов в многоклеточных структурах ткани в результате термоиндуцируемых деформаций при быстром охлаждении. Из биохимических факторов криоповреждений следует учитывать явление, именуемое «температурный шок». Под этим понимается значительное повышение процента погибших клеток при резком охлаждении клеточной суспензии в положительной области температурной шкалы Цельсия, которое отсутствует при относительно медленном охлаждении до этой же температуры. Это явление хорошо известно в области низкотемпературного консервирования генетических ресурсов сельскохозяйственных животных, и на практике оно было замечено при разбавлении спермы производителей холодными растворами [35]. Эксперименты показали, что в клеточном соке чеснока быстрое охлаждение вызывало растрескивание образцов [16]. Возможно, этими факторами в наших наблюдениях определяется факт выживания как нативной, так и обработанной растворами криопротекторов зародышевой ткани чеснока только при относительно медленном режиме охлаждения.

Переход клетки в нежизнedeйствующее состояние происходит при прохождении цитоплазмы через критическую точку и далее в температурную область ФПЖ–Ж (–2)–(–5) °С для клеточного сока чеснока). При дальнейшем охлаждении до температуры хранения биообъекта (–196 °С) такая система вследствие постепенного увеличения вязкости превратится в твердое аморфное тело — стекло. Как резкое охлаждение,

так и быстрый отогрев цитоплазмы, может вызывать растрескивание, связанное с неодновременным сжатием при охлаждении и расширением при нагреве наружных и внутренних слоев образца [36].

Успешная реализация криоконсервирования нативной ткани меристемы чеснока только при относительно медленных режимах глубокого охлаждения находится в согласии с вышеизложенными представлениями о фазовых переходах и изменениях агрегатного (физического) состояния в криобиологических системах.

Явление анабиоза при высушении и охлаждении широко распространено в природе, но в естественных условиях на поверхности Земли достижение температуры стеклования цитоплазмы маловероятно, однако при разработке технологии криоконсервирования этот фактор должен обязательно учитываться.

Фазовое разделение в жидких растворах может происходить также и при добавлении небольших количеств некоторых веществ, способных изменить критическую температуру смешения [22]. Этим эффектом Габуда обосновывает гипотезу о механизме наркоза, который, вероятно, можно рассматривать как анабиоз части клеток в многоклеточном организме [37].

При переходе из анабиоза в жизнедеятельное состояние биообъекта, очевидно, возобновляется близкое к исходному, супрамолекулярное строение цитоплазмы [38] и гидратных оболочек ионов и макромолекул. В результате нежизнеспособная двух- или более фазная дисперсная структура цитоплазмы превращается в жизнеспособную и жизнедеятельную структуру однофазного студня [34]. При этом нужно помнить, что связанная вода в гидратных оболочках не может рассматриваться как полноценная фаза, поскольку она не может быть механически отделена от ионов или макромолекул.

Криоконсервирование без использования криопротективных веществ позволяет избежать их токсического и дегитратирующего действия на биообъекты. Однако, как уже было отмечено, растения, выращиваемые из криоконсервированного материала, задерживаются в развитии по сравнению с контрольными, выращиваемыми из нативного.

Это указывает на то, что помимо цитотоксичности имеются иные факторы криоповреждений, и вопрос целесообразности применения криопротекторов может являться предметом дальнейшего изучения.

Затронутые в настоящей статье аспекты фазовых превращений в растительных тканях при охлаждении имеют отношение как к проблеме криоконсервирования, так и к проблеме вымерзания растений. При криоконсервировании цитоплазма находится в стеклообразном состоянии, которое является термодинамически метастабильным, но кинетически устойчивым, что препятствует образованию льда по мере постепенного приближения системы к состоянию термодинамического равновесия с окружающей средой.

На основе результатов, изложенных в данной работе, разработаны технологии криоконсервирования, подтвержденные патентами Украины [39,40].

Заключение

В жизнедействующем состоянии цитоплазма представляет собой однофазный полимерный студень, в котором возможен обмен веществ путем пассивной диффузии и активного транспорта. При реализации в цитоплазме фазового перехода типа жидкость–жидкость путем охлаждения либо при изменении концентрации раствора путем дегидратации (испарением или осмотически) образуется многофазная грубодисперсная система — высококонцентрированная эмульсия типа «вода в масле».

Резкое повышение вязкости цитоплазмы из-за фазовых превращений приводит к блокированию процессов внутриклеточного массообмена, в результате чего биологическая система переходит в нежизнедействующее состояние — анабиоза или смерти, достоверно различить которые можно, только вернув ее к параметрам состояния жизнедеятельности.

Процесс стеклования стабилизирует сохранность биологического материала.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. А.И. Божкову, проф. С.М. Логвинкову, проф. Н.О. Мчедлову-Петросяну, проф. А.Н. Рассохе, доц. И.И. Морозовой и к.б.н. К.Б. Миксону за консультативную помощь и поддержку.

1. А.М. Голдовский, *Основы учения о состояниях организмов*, Наука, Ленинград (1977).
2. О. Смит, *Биологическое действие замораживания и переохлаждения*, Изд-во иностр. лит, Москва (1963).
3. Н.А. Максимов, *Известия С.-Петербургск. лесн. и-та* **25**, 1 (1913).
4. Р.С. Ушатинская, *Скрытая жизнь и анабиоз*, Наука, Москва (1990).
5. Л.К. Лозина-Лозинский, *Очерки по криобиологии*, Наука, Ленинград (1972).
6. П.Ю. Шмидт, *Анабиоз*, Изд-во АН СССР, Москва-Ленинград (1955).
7. А.И. Жмакин, *УФН* **3**, 243 (2008).
8. *Life in the frozen state*, Barry J. Fuller, Nick Lane, and Erica E. Benson (eds.), Boca Raton, London–New York–Washington (2004).
9. С.П. Папков, *Равновесие фаз в системе полимер–растворитель*, Химия, Москва (1981).
10. Г.М. Бартенев, С.Я. Френкель, *Физика полимеров*, Химия, Ленинград (1990).
11. P.G. Vekilov, *Crist. Growth Des.* **10**, 5007 (2010).
12. Ю.С. Лысак, А.Т. Ходько, Т.Ф. Стрибуль, А.М. Компаниец, *Пробл. криобиологии* **3**, 257 (2012).
13. Н.О. Шевченко, *Автореф. дис. ... канд. біол. наук.: ШКіК НАН України, Харків* (2006).
14. Tie-Gang Lu and Ling-Ceng Jiam, *Cryopreservation of tropical plant germeplasm*, (2000).
15. О.Н. Высоцкая, Т.В. Никишина, А.Ю. Балекин, *Биофизика живой клетки* **10**, 63 (2014).
16. А.Т. Ходько, Ю.С. Лысак, *Біофізич. Вісник* **32(2)**, 48 (2014).
17. К. Холмберг, Б. Йенссон, Б. Кронберг, Б. Линдман, *Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах*, БИНОМ. Лаборатория знаний, Москва (2007).
18. С.П. Рожков, *Журн. физ. химии* **70**, 1982 (1996).
19. A. Hirsh, T. Bent, and E. Erbe, *Thermochimica Acta* **155**, 163 (1989).
20. А.Т. Ходько, Ю.С. Лысак, *Биофизика живой клетки* **10**, 206 (2014).
21. М.К. Зубко, И.В. Кириченко, В.Б. Кускова, *Методы культивирования растительных объектов in vitro*, Препринт / АН УССР, Институт ботаники, Киев (1988).
22. М.А. Анисимов, *Критические явления в жидкостях и жидких кристаллах*, Наука, Москва (1987).
23. М.Ф. Бугаевский, *ДАН СССР*, **22**, 132 (1939).
24. И.Л. Фабелинский, *Молекулярное рассеяние света*, Наука, Москва (1965).
25. М.И. Гельфман, О.В. Ковалевич, В.П. Юстратов, *Коллоидная химия*, Лань, СПб (2004).
26. А. Эйнштейн, *Сборник научных трудов*. Наука, Москва (1966) т. 3, с. 216.
27. А.З. Паташинский, В.П. Покровский, *Флуктуационная теория фазовых переходов*, Наука, Москва (1982).
28. Е.Д. Щукин, *Коллоидная химия*, Высш. школа, Москва (2004).
29. А. Вест, *Химия твердого тела. Теория и приложения*, ч. 2, Мир, Москва (1988).
30. М.Е. Беккер, Б.Э. Дамберг, А.И. Рапопорт, *Анабиоз микроорганизмов*, Зинатне, Рига (1981).
31. И.А. Харчук, *Экология моря* **70**, 62 (2005).
32. А.Г. Хачатурян, *Теория фазовых превращений и структура твердых растворов*, Наука, Москва (1974).
33. А.Л. Вольнский, *Природа* **3**, 44 (2014).
34. С.П. Папков, *Студнеобразное состояние полимеров*, Химия, Москва (1974).
35. Ф.И. Осташко, *Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей*, Урожай, Киев (1978).
36. Ю.А. Гуляян, *Технология стеклотары и сортовой посуды*, Легбытпромиздат, Москва (1986).
37. С.П. Габуда, *Связанная вода. Факты и гипотезы*, Наука, Новосибирск (1982).
38. Ж.-М. Лен, *Супрамолекулярная химия. Концепции и перспективы*, Наука, Новосибирск (1998).
39. Ю.С. Лысак, О.Т. Ходько, Т.Ф. Стрибуль, *Способ криоконсервования меристем чеснока*, Пат. 79464 Україна МПК А01N1/02, № u201211630; заявл. 08.10.2012; опубл. 25.04.2013, Бюл. №8.
40. Ю.С. Лысак, О.Т. Ходько, *Способ криоконсервования меристем сельскохозяйственных растений*, Пат. 100791 Україна МПК А01N3/00, А23В4/06, А23В7/055, № u201501645; заявл. 25.02.2015; опубл. 10.08.2015, Бюл. №15.

Physico-chemical processes in embrionik plant tissue during transition to cool anabiosis state and storage at liquid nitrogen temperature

A.T. Khodko and Yu.S. Lysak

Critical opalescence phenomenon was discovered in the cytoplasm of meristem-embryonic tissue of garlic while cooling in the gas phase of liquid nitrogen. Liquid-liquid phase transition was proved to take place in the system. The fact of meristemic cells survival was fixed during cooling-warming. It is assumed that there is a dramatic slowdown of diffusion in the cytoplasm. The latter is stipulated by the system's transition through the liquid-liquid critical point with subsequent formation of a disperse system – a highly

concentrated emulsion resulting from the multicomponent liquid solution conjugation. The macrophase separation is typical for the polymer-solution system. The cooling regime to liquid nitrogen temperature and the following warming regime for the biological system under study were determined in order to ensure surviving of the meristematic tissue.

PACS: 64.70.P– Glass transitions of specific systems;
64.70.Ja Liquid-liquid transitions;
64.70.pj Polymers.

Keywords: anabiosis state, cryopreservation, phase transition (changes) liquid-liquid, liquid phase separation, glass formation.